

**PROGNÓSTICO DE PACIENTES PORTADORES
DE CARCINOMA DO PÊNIS: PAPEL DO
PAPILOMAVÍRUS HUMANO**

ARTUR LÍCIO ROCHA BEZERRA

**SÃO PAULO
2000**

**EXEMPLAR
ESPECIAL**

**FUNDAÇÃO ANTONIO
PRUDENTE
BIBLIOTECA**

**PROGNÓSTICO DE PACIENTES PORTADORES
DE CARCINOMA DO PÊNIS: PAPEL DO
PAPILOMAVÍRUS HUMANO**

ARTUR LÍCIO ROCHA BEZERRA

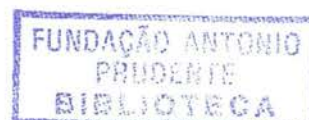
**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente para
obtenção do título de Doutor em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Ademar Lopes

Co-orientadora: Prof^a Dra. Luisa Lina Villa

**São Paulo
2000**



FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa
Hospital do Câncer A.C. Camargo

Bezerra, Artur Licio Rocha

Prognóstico de pacientes portadores de carcinoma do pênis: papel do papilomavírus humano / Artur Licio Rocha Bezerra. -- São Paulo, 2000.

p. 155

Tese (doutorado)–Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Ademar Lopes.

Descritores: 1. CÂNCER DE PÊNIS/prognóstico. 2. PAPILOMAVIRUS HUMANO.

**"A força não provém da capacidade física
e sim de uma vontade indomável"**

Mahatma Gandhi



DEDICO ESTE ESTUDO:

À **JOSÉ AUGUSTO SIMÃO BEZERRA**, cujo exemplo vivo de honradez, trabalho, perseverança e amor nortearam os caminhos da minha vida. Peço sua bênção, meu pai.

À **LUCY ROCHA BEZERRA** (in memoriam) que encontra-se presente, através de seu espírito de luz, em cada frase deste trabalho e em cada segundo da minha vida. Seu grandioso amor, que só as verdadeiras mães conseguem vivenciar, continua iluminando minha existência.

À **SIMONE MUNIZ**, minha mulher, companheira amada, cuja força, dedicação e carinho foram absolutamente fundamentais para a realização desta tese.

Aos pequenos **MARIA CAROLINA** e **ARTUR LÍCIO JR.**, cuja alegre presença está indissociavelmente ligada a minha felicidade e que são o grande incentivo para tudo o que faço.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Ademar Lopes**, Diretor do Departamento de Cirurgia Pélvica do Hospital A.C.Camargo, meu orientador. Cirurgião exemplar e pesquisador, tornou possível a realização desta tese através de sua participação efetiva e enriquecedora.

À **Profa. Dra. Luisa Lina Villa**, cientista do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, minha co-orientadora, por demonstrar tão claramente que mais importante do que o profundo conhecimento que um indivíduo possa ter, é a capacidade singular de saber e querer transmiti-lo.

Ao **Dr. Humberto Torloni**, do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, pela sua competência e disponibilidade em ajudar a quem o procure; tornou-se, no transcorrer deste trabalho, um grande amigo.

A **Marcelo Rocha Bezerra e Marconi Rocha Bezerra**, meus irmãos, com quem compartilho uma imensa amizade e dos quais sou um admirador.

Ao **Prof. Dr. Fernando Menezes**, Reitor da Universidade Federal de Roraima e amigo, cujo espírito científico tem sido um exemplo na minha atividade acadêmica.

A **Antônio Gonçalves de Melo Júnior**, pela amizade enriquecedora.

A todos os **amigos e familiares** que mesmo distantes, em Recife, torceram por mim.

Ao **Dr. Gilles Landman**, do Departamento de Patologia do Hospital A.C.Camargo, pelas orientações, presteza e participação nos manuscritos originados deste estudo.

À **Dra. Maria do Rosário Latorre**, da Faculdade de Saúde Pública da USP e **Karina Ribeiro**, do Registro Hospitalar de Câncer do Hospital A.C. Camargo, pela imprescindível ajuda e orientações na análise estatística.

À **Inês Nishimoto**, do setor de Epidemiologia e Bioestatística do Hospital A.C. Camargo, pela ajuda na confecção e análise do banco de dados.

À **Suely Francisco (Bibliotecária), Rosinéia Aguiar, Anselmo Fabian e Alessandro Francisco**, da biblioteca do Hospital A.C. Camargo, por trabalharem com uma alegria incomum. Agradeço, sobretudo à sra. **Suely Francisco**, a ajuda e presteza na laboriosa pesquisa bibliográfica.

À **Andrea Machado**, do laboratório de Biologia Molecular do Hospital A.C. Camargo, e **João Sobrinho**, do laboratório de Virologia do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, pela ajuda e ensinamentos.

À Sra. **Ana Maria e Srta. Márcia Hiratani**, da coordenação do curso de pós-graduação do Hospital A.C. Camargo, pela organização exemplar deste curso.

À Sra. **Hirde Contesini** e demais funcionários do Serviço de Arquivo Médico e Estatística do Hospital A.C. Camargo, pela presteza na obtenção dos prontuários médicos.

Aos **colegas da pós-graduação**, em especial ao **Dr Alberto Igreja**, pela construtiva troca de experiências.

Aos que compõem a direção da **Universidade de Pernambuco (UPE), Hospital do Câncer de Pernambuco e Hospital Otávio de Freitas (Recife)** que, ao permitirem o meu afastamento das atividades profissionais nessas instituições, propiciaram a realização desta tese.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo financiamento de parte deste estudo.

RESUMO

Bezerra ALR. **Prognóstico de pacientes portadores de carcinoma do pênis: papel do papilomavírus humano**. São Paulo; 2000. (Tese de Doutorado – Fundação Antônio Prudente)

O carcinoma espinocelular infiltrativo do pênis dissemina-se principalmente para os linfonodos regionais. O tratamento dessa neoplasia, na presença de metástases linfonodais, baseia-se na amputação e linfadenectomia bilateral. Não existe consenso, no entanto, em relação às linfadenectomias profiláticas. Considerando os altos índices de morbidade desse procedimento, a identificação de fatores prognósticos do tumor primário ajudaria na seleção dos reais candidatos à ressecção cirúrgica dos linfonodos regionais. Um destes fatores poderia ser o HPV, que vem sendo identificado tanto em lesões pré-invasivas como nos carcinomas invasivos desse órgão. Neste estudo avaliamos a importância prognóstica da presença do DNA do HPV no tumor primário de 82 pacientes, submetidos a amputação do pênis e linfadenectomia bilateral no Hospital A.C. Camargo, São Paulo, no período de janeiro de 1953 a dezembro de 1992. A presença do HPV foi relacionada a variáveis clínicas (idade, estado civil, raça, tempo de evolução da doença, antecedentes venéreos, estadiamento cT, estadiamento cN e cirurgia do tumor primário) e anatomopatológicas do tumor primário (grau de diferenciação, espessura do tumor, presença de permeação linfática e venosa, infiltração de corpos cavernosos, infiltração de uretra, presença de infiltrado mononuclear e eosinofílico e presença de coilocitose), assim como avaliada na sua provável

interferência com a sobrevida e risco de óbito dos pacientes. O DNA do HPV foi detectado em 25 (30,5%) pacientes, sendo 18 (72%) HPV 16 e/ou 18, 3 (12%) HPV 31/33/35, 2 (8%) HPV 6/11, 1 (4%) HPV 45 e 1 (4%) HPV 51/52. A análise morfológica da infecção viral através da presença de coilocitose foi um método com baixa sensibilidade (54,2%) e especificidade (50,8%), com altas taxas de resultados falso-negativos (27,5%) e falso-positivos (68,3%). Através de análise univariada, a presença do DNA do HPV foi significativamente associada com faixa etária e estado civil; nos pacientes abaixo de 40 anos ($p=0,046$) e casados ($p=0,025$) houve maior detecção do DNA viral. Houve também correlação significativa entre a presença do DNA do HPV e a ausência de permeação linfática ($p=0,007$), sendo este o único fator que permaneceu com significância estatística na análise multivariada (OR:0,27; IC: 0,10-0,75) ($p=0,012$). A presença ou ausência do DNA do HPV não esteve associada com metastatização linfonodal ($p=0,386$) nem foi considerado fator de risco para óbito (HR: 1,85; IC:0,77-4,45). A sobrevida específica por doença aos 5 e 10 anos foi de 68,4% para os pacientes HPV negativos e de 69,1% para os pacientes HPV positivos ($p=0,830$). O único fator que foi significativamente associado com menor sobrevida, após análise multivariada, foi o comprometimento metastático dos linfonodos (HR=8,25; IC 2,74-24,85), enquanto que a presença de permeação linfática (OR:10,82; IC:2,68-43,59) e o estadiamento cN1 (OR:11,47; IC:1,50-87,64) e cN3 (OR7,23; IC1,10-47,26) foram fatores de risco para maior incidência de metástases em linfonodos. Os resultados da presente investigação permitem concluir que, embora o HPV esteja associado com um certo número de carcinomas de pênis, a presença do DNA viral não parece influir na evolução da doença nem na sobrevida desses pacientes.

SUMMARY

Bezerra, ALR **Prognóstico de pacientes portadores de carcinoma do pênis: papel do papilomavírus humano** [Penile carcinoma: Role of human papillomavirus on prognosis]. São Paulo (BR); 2000. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

Squamous cell carcinoma of the penis spreads locally to ilioinguinal lymph nodes. In the presence of lymph node metastases, the gold standard for the treatment remains partial or total amputation of the penis, followed by bilateral lymphadenectomy. There is no consensus, however, about prophylactic lymphadenectomies. Considering the high morbidity rates of this procedure, the identification of prognostic factors for the incidence of metastases could help to select candidates to lymphadenectomies. The human papillomavirus (HPV), recently recognized as a possible etiologic agent for pre-invasive and invasive penile carcinomas, could be one of this factors. A retrospective study of 82 patients with penile carcinoma submitted to amputation and bilateral lymphadenectomy at A.C. Camargo Hospital, from 1953 to 1992, was undertaken to evaluate the possible prognostic value of HPV DNA. The relevance of HPV DNA presence was studied with other clinicopathological parameters (age, marital status, race, disease evolution time, previous venereal disease, staging, treatment of primary tumor, histological grade, tumor thickness, vascular embolization, corpora cavernosa and corpus spongiosum infiltration, urethral infiltration, mononuclear infiltrate, eosinophilic infiltrate and presence of koilocytosis), survival rates and risk of death of the patients.



Overall, HPV DNA was detected in 30.5% (25/82) of the samples. Eighteen (72%) of 25 HPV DNA-positive tumors contained HPV 16 and/or 18, 3 (12%) had HPV 31/33/35, 2 (8%) HPV 6/11, 1 (4%) HPV 45 and 1 (4%) HPV 51/52. The sensitivity and specificity of the presence of koilocytosis for viral infection diagnosis was of 54.2% and 50.8%, respectively, which correlates with the high false negative (27.5%) and false-positive (68.3%) rates. At univariate analysis, HPV detection rates were higher among younger (40ys or less) ($p=0.046$) and married patients ($p=0.025$). Patients with tumors HPV DNA-positive had less lymphatic embolization by neoplastic cells than HPV negative ones ($p=0.007$). Multiple logistic regression analysis revealed that HPV status was related only with lymphatic embolization (OR:0.27; IC:0.10-0.75) ($p=0.012$). There was no difference between HPV DNA-negative and HPV DNA-positive patients according to presence of lymph node metastases ($p=0.386$). HPV DNA was also not considered a risk factor for patients death (HR:1.85; CI 0.77-4.45). Disease specific survival rate at 5 and 10 years for HPV DNA-negative and HPV DNA-positive patients were 68.4% and 69.1%, respectively ($p=0.830$). The multivariate analysis revealed that only node status was significantly associated with disease specific survival (HR:8.25; CI 2.77-24.85). The lymphatic embolization by neoplastic cells (OR 10.82; CI 2.68-43.59), clinical staging N1 (OR 11.47; CI 1.50-87.64) and N3 (OR7.23; CI 1.10-47.26) were significant for the incidence of lymph node metastasis. Although HPV is associated with some penile carcinomas, the results of the present investigation suggest that HPV DNA does not influence prognosis in this neoplasm.

LISTA DE TABELAS

1.	Estadiamento TNM - Harmer, 1978.....	13
2.	Frequência de todas as variáveis clínicas estudadas.....	73
3.	Frequência de todas as variáveis anatomopatológicas estudadas.....	74
4.	Número e porcentagem de pacientes segundo estadiamento clínico T e N.....	75
5.	Número e porcentagem de pacientes segundo número de linfonodos metastáticos.....	76
6.	Número e porcentagem de linfonodos segundo tipo de esvaziamento linfonodal.....	76
7.	Número e porcentagem de pacientes segundo nível dos linfonodos metastáticos.....	77
8.	Número e porcentagem de pacientes segundo complicações pós-operatórias relacionadas às amputações.....	78
9.	Número e porcentagem de pacientes segundo complicações pós-operatórias relacionadas às linfadenectomias.....	78
10.	Frequência dos tipos de HPV em 25 pacientes.....	79
11.	Associação entre a presença do DNA do HPV no tumor primário com variáveis clínicas.....	81
12.	Associação entre a presença do DNA do HPV no tumor primário com variáveis anatomopatológicas.....	82
13.	Relação entre a presença de coilocitose e detecção do DNA do HPV.....	83



14. Associação entre a presença do DNA do HPV 16 e/ou 18 no tumor primário e variáveis clínicas.....	84
15. Associação entre a presença do DNA do HPV 16 e/ou 18 no tumor primário e variáveis anatomopatológicas.....	85
16. Associação entre variáveis clínicas e metástases linfonodais.....	86
17. Associação entre variáveis anatomopatológicas do tumor primário e presença do DNA do HPV com metástases linfonodais.....	87
18. Fatores de risco na incidência de metástases linfonodais.....	88
19. Análise das diferenças de médias entre os pacientes perdidos de vista e não perdidos de vista.....	89
20. Análise de algumas variáveis qualitativas entre os pacientes perdidos de vista e não perdidos de vista.....	89
21. Probabilidade acumulativa de sobrevida específica por doença de acordo com variáveis clínicas.....	94
22. Probabilidade acumulativa de sobrevida específica por doença de acordo com variáveis anatomopatológicas.....	95
23. Fatores prognósticos para óbito através de análise multivariada.....	96
24. Associação entre HPV e recidiva tumoral.....	98
25. Estadiamento do carcinoma de pênis em diversas séries da literatura.....	101
26. Frequência de detecção do DNA do HPV em diversas séries da literatura.....	104

LISTA DE FIGURAS

1. Maiores incidências mundiais de câncer de pênis.....	6
2. Genoma do HPV 16	27
3. Fotomicrografia: carcinoma espinocelular moderadamente diferenciado.....	51
4. Fotomicrografia: células neoplásicas empurrando parede endotelial de um linfático.....	52
5. Fotomicrografia: embolização linfática por células neoplásicas.....	53
6. Fotomicrografia: embolização vascular por células neoplásicas.....	54
7. Fotomicrografia: infiltração de corpos cavernosos.....	55
8. Fotomicrografia: infiltração tumoral adjacente às glândulas periuretrais.....	56
9. Fotomicrografia: presença de infiltrado linfoplasmocitário.....	57
10. Fotomicrografia: presença de coilocitose.....	58
11. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo os produtos de PCR do gene da β -Globina.....	63
12. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo os produtos de PCR dos iniciadores GP5 e GP6.....	64
13. Autoradiograma ilustrando hibridização com sonda específica para HPV 16.....	67
14. Curva atuarial de sobrevida global dos 82 pacientes.....	90
15. Curva atuarial de sobrevida específica por doença dos 82 pacientes.....	91

16. Sobrevida específica por doença aos 5 e 10 anos de acordo com a presença do HPV.....	92
17. Sobrevida específica por doença aos 5 e 10 anos de acordo com a presença do HPV 16 e/ou 18.....	93
18. Sobrevida específica por doença aos 5 e 10 anos de acordo com a presença de metástases linfonodais.....	97

ÍNDICE

RESUMO

SUMMARY

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	5
	2.1 Epidemiologia e aspectos etiológicos.....	5
	2.2 Fatores clínicos e anatomopatológicos.....	8
	2.3 Estadiamento.....	11
	2.4 Tratamento cirúrgico.....	15
	2.5 Variáveis prognósticas.....	18
	2.6 HPV.....	22
	2.6.1 Histórico.....	22
	2.6.2 Biologia.....	24
	2.6.3 Métodos de detecção.....	29
	2.6.4 Associação com câncer de pênis.....	35
	2.6.5 Associação com prognóstico.....	38
3	OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA	44
	3.1 Objetivos.....	44
	3.2 Justificativa.....	44

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS	46
4.1 Casuística.....	46
4.2 Métodos.....	47
4.2.1 Diagnóstico e estadiamento clínico.....	47
4.2.2 Procedimento cirúrgico.....	48
4.2.3 Exame anatomopatológico do tumor primário.....	48
4.2.4 Exame anatomopatológico dos linfonodos.....	59
4.2.5 Detecção do DNA do HPV no tumor primário.....	59
4.2.5.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	60
4.2.5.2 Análise dos produtos amplificados.....	61
4.2.5.3 Hibridização <i>dot blot</i>	65
4.2.5.4 Critérios de positividade para HPV.....	68
4.2.6 Recorrência da neoplasia.....	68
4.2.7 Critérios de seguimento dos pacientes.....	68
4.2.8 Análise estatística.....	69
5 RESULTADOS	71
5.1 Aspectos clínicos.....	71
5.2 Aspectos cirúrgicos.....	75
5.3 Aspectos anatomopatológicos e detecção do DNA do HPV no tumor primário.....	79
5.4 Análise de sobrevida.....	88
5.5 Recidivas.....	98

6	DISCUSSÃO	99
6.1	Aspectos gerais.....	99
6.2	Detecção do DNA do HPV e aspectos metodológicos.....	103
6.3	Associação do HPV com variáveis clínicas e anatomopatológicas.....	108
6.4	Análise de sobrevida.....	113
6.5	Perspectivas futuras.....	116
7	CONCLUSÕES	119
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
9	ANEXOS	
9.1	Formulário para obtenção de dados relativos aos 82 pacientes	
9.2	Banco de dados com as principais variáveis analisadas nos 82 pacientes	

INTRODUÇÃO

acometidos (ASHLEY e EDWARDS 1957, LOWE et al. 1983, GOLDMINZ et al. 1989).

A cirurgia é a principal forma de tratamento e baseia-se na ressecção do tumor primário e linfadenectomia bilateral (SKINNER et al. 1972, DEKERNION et al. 1973, DERRICK et al. 1973, CATALONA 1980, JOHNSON e LO 1984, HORENBLAS et al. 1993, POMPEU 1993, LOPES et al. 1996b); a abordagem dos linfonodos apresenta, no entanto, alto índice de morbidade (50 a 90% dos casos) representada principalmente por necrose dos retalhos dermogordurosos, infecção da ferida operatória e linfedema de membros inferiores (SKINNER et al. 1972, KAMAT et al. 1993, LOPES et al. 1996b).

Existem controvérsias quanto à seleção dos reais candidatos às linfadenectomias. A avaliação pré-operatória dos linfonodos inguinais não é simples, pois cerca de 40 a 50% dos linfonodos clinicamente metastáticos apresentam histologia normal e aproximadamente 20% dos linfonodos clinicamente normais podem conter êmbolos tumorais (CATALONA 1980, SUFRIN e RUBIN 1987, LOPES et al. 1996b). Os métodos de imagem (DEKERNION et al. 1973, SRINIVAS et al. 1987) e a biópsia do linfonodo sentinela proposta por CABANAS (1977) não são confiáveis nessa avaliação. CATALONA (1988), na tentativa de identificar um procedimento com melhor acurácia do que a biópsia do linfonodo sentinela e menor morbidade do que a linfadenectomia padrão, propôs uma linfadenectomia inguinal modificada (quadrantes mediais) com preservação da veia safena; esse procedimento, no entanto, também não se mostrou confiável devido à possibilidade de metástases e recorrência da neoplasia nos linfonodos não excisados (LOPES et al. 1996a). A identificação do linfonodo sentinela através de linfocintilografia com material radioativo, semelhante ao que vem sendo avaliado em

melanomas e neoplasias mamárias (GLASS et al. 1995, O'HEA et al. 1998) só recentemente foi utilizada no câncer de pênis (HORENBLAS et al. 2000) e sua utilidade ainda precisa ser confirmada em estudos posteriores.

Considerando que um percentual importante dos pacientes são operados desnecessariamente por apresentarem linfonodos histologicamente normais, a identificação de fatores prognósticos nessa neoplasia visa uma melhor seleção dos candidatos a cirurgias, com conseqüente realização de procedimentos menos extensos.

A presença de metástases linfonodais é aceita como a variável prognóstica mais importante no câncer de pênis (DEKERNION 1973, CABANAS 1977, CATALONA 1980, SUFRIN e RUBIN 1987). Outras variáveis prognósticas citadas são a idade do paciente, estágio clínico T, grau de diferenciação histológica e espessura da lesão, embora existam divergências sobre o seu valor (FRALEY 1985, SRINIVAS et al. 1987, CUBILLA, 1993). A presença de êmbolos tumorais linfáticos ou venosos no tumor primário é um fator que contribui significativamente para a maior incidência de metástases linfonodais (LOPES et al. 1996b).

Embora o HPV, como visto, seja detectado em cerca de 20 a 60% das neoplasias malignas do pênis, na literatura consultada encontramos apenas 1 estudo (WIENER et al. 1992) que avalia o seu valor prognóstico e em um pequeno número de pacientes (22 casos). O assunto é controverso pois, mesmo no carcinoma do colo uterino, neoplasia em que a infecção viral tem sido muito mais estudada, os resultados são conflitantes (KING et al. 1989, RIOU et al. 1990, ROSE et al. 1991, GARZETTI et al. 1998).

O estudo do HPV no prognóstico dos pacientes portadores de tumor infiltrativo do pênis pode resultar em uma contribuição importante na seleção de candidatos a linfadenectomias, evitando morbidade desnecessária.

REVISÃO DE LITERATURA

2 Revisão da literatura

2.1 Epidemiologia e aspectos etiológicos

O câncer de pênis é uma doença rara. Nos Estados Unidos o coeficiente de incidência anual é de 1/100000, representando cerca de 0,5% de todas as malignidades do homem (BUDDINGTON et al. 1963, WATERHOUSE et al. 1982, BURGERS et al. 1992). Anualmente, são diagnosticados cerca de 750 a 1000 novos casos dessa neoplasia naquele país, número que tem se mantido constante nos últimos 50 anos (SCHELLHAMMER et al. 1992).

A maior incidência mundial do câncer de pênis é nas regiões de Barshi, Paranda e Bhum, na Índia, com taxas de 3,32/100000, enquanto as menores incidências são para os judeus nascidos em Israel, judeus nascidos nos EUA e Europa e judeus nascidos na África ou Ásia, com taxas de 0/100000, 0,07/100000 e 0,09/100000, respectivamente (PARKIN et al. 1997)

Em algumas áreas da Ásia, América do Sul e África o câncer de pênis representa cerca de 10 a 20% das neoplasias malignas do sexo masculino (PERSKY 1977, BURGERS et al. 1992). WOOLRICH (1964), no México, relata que o câncer de pênis corresponde a 10,4% dos tumores malignos genitourinários, enquanto que no Paraguai essa incidência atinge cerca de 50% dos casos, ocupando o 1º lugar entre as neoplasias malignas urológicas (RIVEROS e LEBRÓN 1963). Em Bali, ilha da Indonésia que tem uma população basicamente hindú, BOON et al. (1989), analisando 730 neoplasias malignas no homem diagnosticadas entre 1985-1986, relatam um total de 83 casos de

câncer de pênis (11,4%), representando o 2º lugar em incidência global (perde apenas para o carcinoma nasofaríngeo).

No Brasil, as cidades de Belém e Goiânia apresentam a 9ª e 10ª maiores incidências mundiais de câncer de pênis com taxas ajustadas por idade de 1,98 e 1,88/100000 habitantes, respectivamente (PARKIN et al. 1997). As regiões de maior incidência mundial de câncer de pênis são mostradas na figura 1.

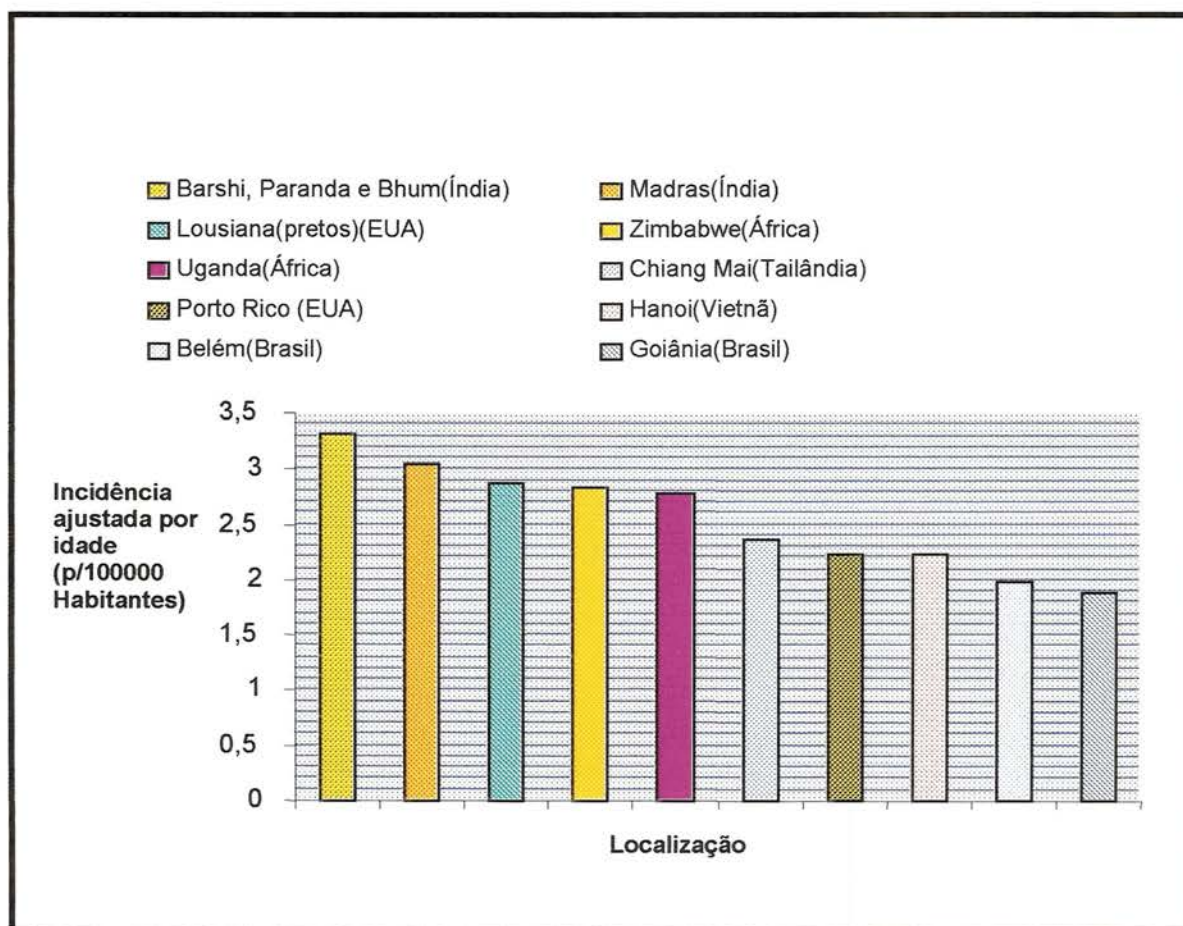


Figura 1. Maiores incidências mundiais de câncer de pênis.

BRUMINI (1982), considerando um total de 170.541 neoplasias malignas no homem, registradas no período de 1976 a 1980 no Brasil, relata 3548 casos de carcinoma do pênis, correspondendo a uma incidência relativa de 2,1%. A distribuição percentual desta doença entre as diversas regiões, considerando os dez tipos mais comuns de neoplasia maligna primária, é de 5,7% no Nordeste, 5,3% no Norte, 3,8% no Centro-Oeste, 1,4% no Sudeste e 1,2% na região Sul.

A etiologia precisa do câncer de pênis permanece indeterminada, embora a associação dessa neoplasia com a ausência de circuncisão esteja bem estabelecida (BURGERS 1992). PAYMASTER e GANGADHARAN (1967) estudaram a presença da neoplasia em 3 grupos de indivíduos: os que não se submeteram a circuncisão ou o fizeram tardiamente, os que se submeteram à circuncisão entre os 3 e 12 anos de vida e aqueles que se submeteram à circuncisão ao nascimento; a incidência da neoplasia foi de 3,3%, 0,15% e 0%, respectivamente. MADEN et al. (1993), em estudo caso-controle, relatam que o risco para o desenvolvimento de câncer do pênis é 3,2 vezes maior entre homens que nunca foram circuncidados em relação aqueles circuncidados ao nascimento e 3 vezes maior em relação aqueles que foram circuncidados após o período neonatal.

A baixa condição sócio-econômica dos pacientes e as más condições de higiene peniana, associados com a fimose, são os fatores de risco mais significativos para o desenvolvimento do câncer de pênis. No entanto, outros fatores podem estar presentes na etiologia dessa neoplasia (BRINTON et al. 1991).

Não se sabe ao certo em que extensão as chamadas neoplasias intraepiteliais penianas (doença de Bowen, eritroplasia de Queyrat e papulomatose bowenóide) evoluem para lesões francamente invasivas (BURGERS et al. 1992). Irritação crônica e

agentes infecciosos ou químicos são citados como potenciais agentes etiológicos, mas sem real comprovação. Observa-se frequentemente uma história pregressa de sífilis e gonorréia nos pacientes portadores de câncer de pênis, embora não exista nenhuma evidência que essas doenças contribuam diretamente no processo oncogênico (RIVEROS e LEBRÓN 1963, SCHELLHAMMER et al. 1992, HUBEN 1997a).

O esmegma tem sido implicado na carcinogênese do câncer do pênis, como demonstrado experimentalmente por PRATT-THOMAS et al. (1956). Esses autores inocularam esmegma na vagina de camudongas e observaram o desenvolvimento de neoplasia após alguns meses de observação. O provável carcinógeno específico presente nessa secreção, no entanto, ainda não foi identificado (BURGERS et al. 1992).

Um dos tópicos de maior interesse na pesquisa sobre a etiologia do câncer de pênis é a possível participação do HPV nesse processo, pois existem evidências epidemiológicas (BRINTON et al. 1991, MADEN et al. 1993, FRANCO, 1997), referendadas por trabalhos de biologia molecular (MCCANCE et al. 1986, VILLA e LOPES 1986, HIGGINS et al. 1992, IWASAWA et al. 1993), que evidenciam a associação desse vírus no desenvolvimento da neoplasia. O estudo do HPV e de sua associação com o câncer de pênis será descrito adiante.

2.2 Fatores clínicos e anatomopatológicos

O câncer de pênis normalmente incide entre a 4ª e 7ª décadas de vida. PERSKY e DEKERNION (1986), analisando 77 pacientes em Cleveland, EUA, relatam que a idade variou de 31 a 85 anos (média: 63 anos), enquanto LOPES (1996b), no nosso meio,

relatam uma idade média de 53 anos para os 145 pacientes analisados. Essa neoplasia não parece estar associada com diferenças raciais (RIVEROS e LEBRÓN 1963).

Frequentemente observa-se atraso no diagnóstico da neoplasia decorrente de falta de atenção do próprio paciente, que associa a lesão do pênis a processos inflamatórios, ou devido a diagnósticos errados dos médicos, muitas vezes não treinados para diagnosticar e tratar esse tumor. O início do tratamento é retardado por períodos que variam de 6 meses a 2 anos (BUDDINGTON et al. 1963, LOPES et al. 1994).

O carcinoma do pênis apresenta-se geralmente como um tumor que pode apresentar dois tipos de crescimento: exofítico (vegetante) ou infiltrativo (ulcerado); localiza-se principalmente na glândula, prepúcio e sulco coronal, evoluindo com infiltração e destruição dos tecidos locais e metastatizando para os linfonodos inguinais e ilíacos (NARAYAMA et al. 1982, PERSKY e DEKERNION 1986). Outros sintomas descritos são secreção, sangramento, prurido, dor e linfadenomegalia (NARAYAMA et al. 1982)

O tumor peniano com crescimento vegetante, verrucoso, frequentemente se acompanha de deficiente suprimento sanguíneo, o que resulta em necrose, ulceração e infecção secundária (BURGERS et al. 1992). Os pacientes geralmente apresentam estado geral regular, embora a presença de anemia, decorrente de sangramentos contínuos da lesão, possa ocorrer. As metástases à distância ao diagnóstico são raras. NARAYAMA et al. (1982) relatam ausência de metástases à distância em 219 carcinomas invasivos estudados.

O exame físico dos pacientes portadores de neoplasia do pênis exige uma cuidadosa palpação da lesão, caracterizando sua conformação, tamanho e localização

específica; os corpos cavernosos devem ser palpados para determinação da extensão proximal do tumor e pode haver necessidade de retração ou secção de um prepúcio exuberante nos casos em que a lesão localiza-se abaixo dessa estrutura (LOPES et al. 1994, HUBEN 1997b).

A palpação das regiões inguinais e caracterização de prováveis linfadenomegalias é fundamental, pois essa região é o primeiro sítio de disseminação metastática; existem, no entanto, altas taxas de falso-positivo e falso-negativo nesse exame. Além de um cuidadoso exame físico, exames complementares como linfangiografia, ultrassonografia, tomografia computadorizada (TC) e ressonância nuclear magnética (RM) podem ser usados na propedêutica dos portadores de neoplasia do pênis. Esses exames, no entanto, apresentam um valor discutível, pois a sensibilidade e especificidade na detecção de metástases inguinais, ilíacas e paraaórticas ainda não estão estabelecidas (HORENBLAS et al. 1991, BURGERS et al. 1992).

O diagnóstico definitivo do câncer de pênis é realizado através de biópsia da lesão com posterior estudo anatomopatológico. Esse procedimento deve ser feito em áreas não necróticas e obtendo-se, sempre que possível, parte de tecido normal. Nos pequenos tumores a biópsia pode ser do tipo excisional, isto é, retirando-se toda a lesão (LOPES et al. 1994).

Cerca de 95 a 97% das neoplasias malignas do pênis são representadas por carcinomas espinocelulares (epidermóide), histologicamente caracterizados por queratinização, formação de pérolas córneas e vários graus de atividade mitótica (SCHELLHAMMER et al. 1992). Carcinomas de células basais, melanomas e sarcomas

raramente acometem esse órgão (FEGEN et al. 1970, DEHNER et al. 1970, JOHNSON e AYALA 1973).

O carcinoma verrucoso ou tumor de Busch-Loewenstein é outra forma rara de neoplasia do pênis. Foi descrita inicialmente como uma variante do condiloma acuminado e, embora possa invadir estruturas adjacentes, raramente evolui com metástases. Apresenta, portanto, um bom prognóstico (JOHNSON et al. 1985, SROUGI e SIMON 1990).

2.3 Estadiamento

O estadiamento das neoplasias, procedimento que consiste em avaliar a extensão da doença do ponto de vista local, regional e à distância, é um passo fundamental para definir o melhor tratamento. Não existe, no entanto, um sistema universalmente aceito para se estadiar o carcinoma do pênis (HUBEN 1997).

O estadiamento do câncer do pênis mais utilizado foi sugerido por JACKSON (1966), que classificava a doença em 4 estádios clínicos:

- I- Tumor limitado à glândula ou prepúcio
- II- Tumor invadindo o corpo peniano
- III- Tumor com metástases inguinais, porém ressecáveis
- IV- Tumor invadindo estruturas adjacentes e/ou tumor associando-se com metástases inguinais irresssecáveis e/ou metástases à distância.

A classificação de Jackson é clínica e não informa sobre características importantes tanto do tumor primário como das metástases, tais como tamanho e grau de

infiltração da lesão primária, grau de diferenciação tumoral, número e localização dos linfonodos comprometidos (SCHELLHAMMER et al. 1992).

Outro sistema de classificação é o TNM da UICC (HARMER 1978), que leva em consideração o tamanho do tumor e/ou seu grau de infiltração em profundidade (T), a situação dos linfonodos regionais (N) e a presença ou ausência de metástases à distância (M) (tabela 1). A avaliação dos linfonodos inguinais nessa classificação, no entanto, continua sendo clínica. Com o objetivo de fornecer mais informações sobre a extensão da doença e seus aspectos prognósticos, a classificação TNM de HERMANEK e SOBIN (1987) incorporou parâmetros histopatológicos do tumor primário e dos linfonodos, como infiltração de corpo cavernoso e uretra, metástases em um ou múltiplos linfonodos inguinais e metástases em linfonodos pélvicos.

Estudo recente relata que a presença de êmbolos tumorais em vasos linfáticos e venosos no tumor primário contribui significativamente para maior incidência de metástases linfonodais, sugerindo a incorporação desses fatores no estadiamento do câncer de pênis (LOPES et al. 1996b).

Tabela 1 - Estadiamento TNM (Harmer 1978)

ESTADIAMENTO DO TUMOR PRIMÁRIO	
Tis	Carcinoma in situ
T0	Sem evidência de tumor primário
T1	Tumor de 2cm ou menos em sua maior dimensão estritamente superficial ou exofítico
T2	Tumor maior que 2cm mas que não ultrapassa 5cm em sua maior dimensão ou tumor com extensão profunda mínima
T3	Tumor maior que 5cm em sua maior dimensão ou tumor com extensão profunda incluindo a uretra
T4	Tumor infiltrando estruturas adjacentes
Tx	Tumor primário não pode ser avaliado
ESTADIAMENTO DOS LINFONODOS REGIONAIS	
N0	Ausência de metástases em linfonodos regionais
N1	Metástases em linfonodos regionais unilaterais e móveis
N2	Metástases em linfonodos regionais bilaterais móveis
N3	Metástases em linfonodos regionais fixos
Nx	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
ESTADIAMENTO DAS METÁSTASES À DISTÂNCIA	
M0	Ausência de metástases à distância
M1	Metástases à distância
Mx	Metástases à distância não pode ser avaliada

Embora exames de imagem tenham acurácia discutível, como citado anteriormente, a TC e RM podem ser utilizados na avaliação dos linfonodos regionais. Esses exames, no entanto, são mais importantes na pesquisa de metástases à distância (Schellhamer et al. 1992, Vapnek et al. 1992). A punção por agulha fina dos linfonodos suspeitos para estudo citológico é um método que também pode ser utilizado na avaliação loco-regional. Em virtude de sua pouca sensibilidade, no entanto, apenas os resultados positivos devem ser valorizados (HORENBLAS et al. 1991, BURGERS et al. 1992, VAPNEK et al. 1992).

A pouca acurácia dos métodos clínicos e de imagem na avaliação dos linfonodos regionais no câncer de pênis levou CABANAS (1977) a propor uma forma de estadiamento cirúrgico. Esse autor utilizou linfangiografias a partir dos linfáticos dorsais do pênis em 100 indivíduos (10 voluntários normais, 10 pacientes com doenças inflamatórias do pênis e 80 pacientes com carcinoma infiltrativo) e identificou o que ele chamou de “linfonodo sentinela” (LS), que seria o primeiro sítio de metástases linfonodais. O LS localiza-se anteromedialmente à veia epigástrica superficial, acima da junção safeno-epigástrica. Considerando 46 casos nos quais a biópsia do LS foi realizada, 15 eram positivos para metástases; em 12 (80%) desses casos nenhum outro linfonodo foi positivo. Analisando-se os 31 pacientes nos quais o LS foi negativo para metástases, também não foram encontradas metástases em nenhum outro linfonodo, além do que 90% desses pacientes sobreviveram 5 anos.

A biópsia do LS, segundo CABANAS (1977), define melhor o estadiamento da doença e a conduta a ser tomada, pois evita a linfadenectomia nos casos em que esse

linfonodo for negativo. Outros autores (PERINETTI et al. 1980, WESPES et al. 1986), no entanto, relataram desenvolvimento de metástases linfonodais em pacientes cujo LS era negativo, questionando o real valor do LS no estadiamento do câncer de pênis.

A linfadenectomia ilioinguinal permanece como a conduta definitiva para avaliar os linfonodos. A videocirurgia para estadiamento e linfadenectomia íliaca pode ser um procedimento importante para diminuir os altos índices de morbidade desse procedimento.

2.4 Tratamento cirúrgico

A cirurgia é a principal forma de tratamento do câncer de pênis e baseia-se na ressecção do tumor primário e linfadenectomia ilioinguinal bilateral (CATALONA 1980 e 1988, MOHS et al. 1985, HORENBLAS et al. 1991, LOPES et al. 1996b).

As lesões pequenas, em estadiamentos iniciais, podem ser ressecadas conservadoramente, através de circuncisão, excisões locais ou laserterapia, havendo necessidade de controle rigoroso das margens cirúrgicas para diminuir as taxas de recorrência local (MOHS et al. 1985, ODLAND et al. 1997). SHIRAYAMA et al. (1998), em recente estudo, relatam bons resultados da associação de hipertermia por laser, radioterapia e quimioterapia em 2 pacientes com carcinoma infiltrativo (T2).

A amputação parcial ou total do pênis é a cirurgia mais utilizada nas neoplasias desse órgão em virtude do tumor ser diagnosticado, na maioria das vezes, em fase localmente avançada. Nas amputações parciais procura-se oferecer uma margem de 1,5 a 2cm de tecido normal proximalmente ao tumor; lesões que infiltrem a base do pênis são

melhor tratadas com amputação total e reimplante uretral na região perineal (SAKTI DAS 1992).

As taxas de recorrência local após realização de amputações parciais ou totais, com boa margem cirúrgica, são baixas. DEKERNION et al. (1973), por exemplo, não observaram nenhuma recorrência local em 45 pacientes tratados por amputação parcial.

Além do tratamento da lesão primária, a cura dos pacientes com carcinoma do pênis depende de uma adequada abordagem terapêutica dos linfonodos regionais. Mesmo na vigência de metástases linfonodais, os índices de cura com linfadenectomias variam de 30 a 70%; pacientes não tratados, por outro lado, morrem dentro de 2 anos geralmente antes de desenvolverem metástases à distância (DEKERNION et al. 1973, CATALONA 1980, JOHNSON e LO 1984, POMPEU 1993). Apesar da importância da linfadenectomia, ainda existem muitas controvérsias sobre o assunto.

Nos casos em que existem linfonodos inguinais histologicamente metastáticos, diagnosticados por punção e citologia ou biópsias isoladas, o esvaziamento ilioinguinal é mandatório. As dúvidas surgem quando não existe confirmação histológica de metastatização linfonodal; a principal delas é optar entre a realização de linfadenectomia profilática, definida como aquela realizada junto com o tratamento do tumor primário ou em até 6 semanas do pós-operatório em pacientes sem adenopatia inguinal, ou linfadenectomia terapêutica, utilizada na presença de metástases linfonodais que surgem durante o seguimento do paciente (ABI-AAD e DEKERNION 1992).

Embora alguns estudos tenham demonstrado que a realização de linfadenectomia terapêutica propicia uma sobrevida dos pacientes semelhante à linfadenectomia profilática (EKSTROM e EDSMYR 1958, BEGGS e SPRATT, 1964), trabalhos mais

recentes não confirmam esses resultados. A sobrevida a 5 anos dos pacientes que se submeteram a linfadenectomia profilática no estudo de MCDUGAL et al. (1986) foi de 88% e 66% para os estádios II e III de JACKSON (1966), respectivamente, comparada com taxas de 38% e 0% nos casos de linfadenectomia terapêutica. FRALEY et al. (1989), de maneira semelhante, demonstraram maiores taxas de sobrevida para os pacientes que se submeteram a linfadenectomia profilática em comparação à terapêutica (75% e 8%). A tendência atual é a realização da linfadenectomia profilática nos tumores infiltrantes (T2 e T3). Segundo ABI-AAD e DEKERNION (1992): “seguir pacientes até que a doença metastática se torne clinicamente evidente é permitir que uma neoplasia potencialmente curável se torne incurável”.

A linfadenectomia deve ser bilateral pois cerca de 30% ou mais dos pacientes com câncer invasivo do pênis apresentam linfonodos metastáticos bilateralmente (EKSTROM e EDSMYR 1958, SRINIVAS et al. 1987, LOPES et al. 1996b). A extensão da linfadenectomia para a região pélvica, por outro lado, só deve ser feita quando houver linfonodos inguinais metastáticos já que nesses casos 15 a 30% dos pacientes apresentarão metástases em linfonodos pélvicos, como relatado por PURAS et al. (1978) e SRINIVAS et al. (1987). A disseminação tumoral para linfonodos pélvicos sem envolvimento dos linfonodos inguinais é bastante rara (ABI-AAD e DEKERNION 1992).

Em razão da alta morbidade das linfadenectomias (BEGGS e SPRATT 1964, ORNELLAS et al. 1991), como já referido, torna-se importante a identificação de fatores prognósticos no tumor primário e caracterização de pacientes de alto risco para

desenvolver metástases linfonodais, nos quais o tratamento cirúrgico agressivo pudesse ser justificável.

2.5 Variáveis prognósticas

Alguns aspectos clínicos são citados como variáveis prognósticas importantes nos pacientes portadores de câncer de pênis. EKSTROM e EDSMYR (1958) relatam que pacientes mais jovens, abaixo de 40 anos de idade, tiveram uma maior incidência de metástases linfonodais do que pacientes acima dessa idade. A maioria dos autores, no entanto, não considera a faixa etária como fator prognóstico significativo (STAUBITZ et al. 1955, HORENBLAS e VANTINTEREN 1994, THEODORESCU et al. 1996, LOPES et al. 1996b). O tempo de duração dos sintomas antes do tratamento, embora aparentemente importante, também não tem sido considerado significativo para o prognóstico desses pacientes (STAUBITZ et al. 1955, EKSTROM e EDSMYR 1958).

O fator prognóstico mais importante no câncer de pênis é, sem dúvida, a presença de metástases em linfonodos (STAUBITZ et al. 1955, WAJSMAN et al. 1977, NARAYAMA et al. 1982, YOUNG et al. 1991, KAMAT et al. 1993, HORENBLAS et al. 1993 e 1994, ORNELLAS et al. 1994, LOPES et al. 1996b). HORENBLAS e VANTINTEREN (1994) relatam taxas de sobrevida a 5 anos de 93% e 50% para pacientes com e sem metástases linfonodais, respectivamente, enquanto no estudo de SRINIVAS et al. (1987) esses índices foram de 74% e 28%. Embora esses percentuais obviamente variem entre os diversos autores, existe consenso de que a disseminação linfonodal piora o prognóstico.

Alguns estudos correlacionam a extensão do comprometimento linfonodal com o prognóstico. SRINIVAS et al. (1987) classificaram os casos com metástases nos linfonodos em N1, N2 e N3a, correspondendo a positividade de metástases em 1, 2 a 6 e mais de 6 linfonodos, respectivamente; linfonodos metastáticos bilaterais foram classificados como N3b e doença extranodal como N4. Pacientes com envolvimento linfonodal mínimo (N1 e N2) tiveram uma taxa de sobrevivência a 5 anos de 50 a 80%, enquanto que naqueles com comprometimento mais extenso (N3b e N4) a sobrevivência foi de 4 a 12%. Alguns autores (BAKER et al. 1976, JOHNSON e LO 1984, FRALEY et al. 1989) relatam que pacientes com metástases em até 2 linfonodos ainda podem apresentar um bom prognóstico. Na série de HORENBLAS et al. (1993) pacientes com metástases em mais de 2 linfonodos inguinais apresentaram maior incidência de metástases contralaterais e pélvicas, com aumento da probabilidade de recorrência e morte pela doença.

A correlação de informações clínicas e histológicas do tumor primário com a presença de metástases linfonodais é outro aspecto que vem sendo analisado na literatura. Com exceção das lesões localizadas no prepúcio, que apresentam metástases em menos de 10% dos casos e permitem cirurgias conservadoras, o sítio do tumor primário não parece influir no prognóstico (DEKERNION et al. 1973, WAJSMAN et al. 1977).

A maioria dos estudos concorda que tumores maiores, invasivos, tem uma maior probabilidade de metastatizar do que tumores com menor tamanho (DEKERNION et al. 1973, WAJSMAN et al. 1977, FRALEY et al. 1985 e 1989, HORENBLAS et al. 1993, KAMAT et al. 1993, ADEYOJU et al. 1997). HORENBLAS et al. (1993) relatam que

tumores que mediam de 2 a 5cm apresentaram maior incidência de metástases em linfonodos do que tumores menores do que 2cm (79% e 47%), enquanto que FRALEY et al. (1985) citam taxas de sobrevida de 82% e 74% para pacientes com tumores menores e maiores ou iguais a 3cm, respectivamente.

DEKERNION et al. (1973) relatam que 17/25 (68%) pacientes com tumores que comprometiam o corpo cavernoso apresentavam metástases linfonodais, enquanto todos os 6 pacientes ECI (comprometimento do prepúcio ou glande) evoluíram sem metástases e sem recidivas. De maneira semelhante, SOLSONA et al. (1992) relatam que 27/42 (64,3%) pacientes com invasão de corpo cavernoso apresentaram metástases linfonodais, comparado a 1/24 (4,2%) quando não havia essa infiltração.

CUBILLA et al. (1993) demonstraram que tumores que apresentavam um crescimento vertical tinham maior incidência de metástases linfonodais do que aqueles com crescimento mais superficial (82% e 42%, respectivamente), enquanto que HALL et al. (1998) relataram que tumores com crescimento em profundidade maior do que 5mm apresentaram um pior prognóstico, com maior incidência de metástases em linfonodos. LOPES et al. (1996b), analisando variáveis anatomopatológicas no tumor primário, relatam que a espessura do tumor (limite de 5mm) foi fator significativo para metástases linfonodais quando realizada análise univariada ($p=0,02$); em análise multivariada, no entanto, apenas a embolização vascular por células neoplásicas influenciou a incidência de metástases nos linfonodos. A presença de invasão vascular também foi um fator prognóstico significativo no estudo de FRALEY et al. (1989), pois apenas 1/11 pacientes com essa característica ficou curado.

Embora alguns estudos não tenham demonstrado relação entre o grau de diferenciação histológica do carcinoma do pênis e a incidência de metástases linfonodais (ADEYOJU et al. 1997, HALL et al. 1998), a maioria dos trabalhos evidencia essa associação (FRALEY et al. 1985 e 1989, SOLSONA et al. 1992, HORENBLAS et al. 1993 e 1994, ORNELLAS et al. 1994). HORENBLAS et al. (1993) observaram que 9/11(82%) pacientes com tumores pouco diferenciados apresentaram metástases linfonodais, comparados com 13/28 (46%) e 17/59 (29%) com tumores medianamente e bem diferenciados, respectivamente. THEODORESCU et al. (1996), analisando 42 pacientes, relatam que o grau de diferenciação do tumor foi o único fator prognóstico para a recorrência da doença.

A hipótese de que o tumor pode induzir uma reação de defesa do organismo, caracterizada por um infiltrado mononuclear e eosinofílico no tecido, levou alguns autores a pesquisarem a presença desses infiltrados com o prognóstico (NGAI 1933, KURUVILA et al. 1971, PRETLOW et al. 1983). NGAI (1933) relata que houve um menor infiltrado mononuclear em tumores pouco diferenciados enquanto que KURUVILLA et al. (1971) não encontraram nenhuma associação da presença de infiltrados mononuclear e eosinofílico no tumor com o prognóstico dos pacientes.

O valor prognóstico do HPV no câncer do pênis praticamente não tem sido estudado. Os aspectos etiológicos e patogênicos da presença desse vírus serão discutidos a seguir.

2.6 HPV

2.6.1 Histórico

Os primeiros estudos relacionados à carcinogênese viral datam do início deste século, quando a transmissibilidade de uma leucemia de aves foi descrita por Ellerman e Bang, citados por HOWLEY (1995, p.38).

PEYTON ROUS, em 1911, demonstrou que extratos celulares de sarcomas de aves, contendo um “agente filtrável”, poderia induzir tumores em galinhas, enquanto que a transmissibilidade de tumores fibromatosos de um tipo de coelho silvestre (*cottontail rabbit*) para coelhos domésticos, através da inoculação de extratos celulares, foi demonstrada por RICHARD SHOPE, em 1932. Tentava-se, nessa década, relacionar as infecções virais com o câncer.

A epidermodisplasia verruciforme (EV), descrita inicialmente por Lewandowsky e Lutz em 1922, citados por ZUR HAUSEN (1996, p.55), e caracterizada pela presença de verrugas planas na pele (principalmente da face, dorso das mãos e pernas), tornou-se posteriormente em modelo no estudo da relação papilomavirus-câncer. Esta rara síndrome familiar é um protótipo da associação do vírus com câncer, de uma maneira combinada com outros fatores (deficiência imunológica e um co-carcinógeno – luz ultravioleta) (JABLONSKA et al. 1972, SMITH e CAMPO 1985, VILLA 1998)

Poucos estudos foram realizados nas décadas de 40 e 50 provavelmente pela impossibilidade da propagação rotineira do HPV em cultura e pela aparente benignidade das lesões produzidas pelos papilomavírus (HOWLEY 1995). O interesse parece ter

ressurgido com os estudos de OLSON et al. (1959). Esses autores induziram tumores vesicais em 13 de 15 vacas estudadas, através da inoculação submucosa de uma suspensão de papilomavírus bovino proveniente de fibropapilomas de pele. Quando examinada 80 dias após a inoculação, a bexiga apresentava sinais de malignidade precoce.

No início da década de 70, ZUR HAUSEN et al. (1974), baseados na hipótese de que células tumorais humanas, se originalmente transformadas por vírus, abrigariam no seu genoma a informação genética viral, iniciaram uma série de estudos para avaliar a relação dos DNA vírus com alguns tumores. As investigações culminaram com a caracterização bioquímica e imunológica dos vírus das verrugas plantar e comum (GISSMAN et al. 1976, ORTH et al. 1977). ORTH et al (1977) passaram a chamá-los HPV 1 e HPV 2, respectivamente.

A relação do condiloma acuminado com a neoplasia cervical foi pouco avaliada até 1976. Nessa época MEISELS e FORTIN (1976) propuseram a origem viral das atipias colicitóticas da cérvix uterina, separando-as das “verdadeiras” lesões pré-neoplásicas. Os vírus, tradicionalmente associados com verrugas venéreas, tipo couve-flor, também poderiam produzir lesões planas, esbranquiçadas, no trato genital. Surgiu o interesse pela análise pormenorizada do colo do útero e vagina, mesmo naqueles casos aparentemente normais.

A demonstração de partículas do papilomavírus em típicas células coilocitóticas através de estudos de microscopia eletrônica fortaleceram os estudos de MEISELS e FORTIN (1976). As partículas virais eram intranucleares e tinham um contorno esférico, com um diâmetro entre 40 e 50 nm (HILLS e LOVERTZ 1978).

Os estudos experimentais rapidamente se expandiram com a identificação do HPV 6 a partir de verrugas genitais (GISSMAN e ZUR HAUSEN 1980) e HPV 16 a partir do câncer cervical uterino (DURST et al. 1983). Atualmente, em torno de 100 subtipos distintos de HPV tem sido identificados. O tamanho relativamente pequeno do genoma permite uma análise das funções individuais dos genes e da interação das proteínas virais com componentes celulares do hospedeiro. O principal interesse tem sido identificar os mecanismos de carcinogênese do HPV, a maneira como os genes desses vírus influenciam a proliferação celular, como suas oncoproteínas interagem com os componentes celulares do hospedeiro e em que extensão a falha nas defesas celulares está relacionada à oncogênese viral (ZUR HAUSEN 1996).

2.6.2 Biologia

Os papilomavírus são uma das cerca de 25 famílias de vírus identificadas nos mamíferos. A sua designação inclui uma letra que indica a espécie hospedeira (papilomavírus humano: HPV; papilomavírus bovino: BPV , etc) seguida de um número que indica o tipo viral (HPV 16, HPV 18, etc) (O'CONNOR et al. 1997). Vários tipos virais podem infectar uma mesma espécie, como humanos, bovinos e coelhos; a transmissão cruzada entre as espécies, no entanto, é rara ou inexistente e

apenas alguns tipos virais são capazes de transformação maligna (SMITH e CAMPO 1985).

A classificação dos tipos de HPV depende da sua composição de DNA; um tipo de HPV é único quando seu genoma é menos que 50% homólogo ao genoma de outros tipos já definidos. Os diferentes tipos de HPV apresentam uma preferência exclusiva pelos tecidos que infectam, fato ainda não totalmente explicado (HOWLEY 1995).

Após infecção pelo HPV podem acontecer 3 eventos: a) estabilização do genoma como um epissoma não integrado, que se mantém latente no hospedeiro, sem causar alterações no epitélio escamoso; b) replicação vegetativa do HPV (infecção ativa) e indução de proliferação do epitélio escamoso em tumores benignos (verrugas, papilomas) e c) integração do genoma do HPV no genoma do hospedeiro levando à carcinogênese (HINES et al. 1995).

No caso das infecções latentes, praticamente nada é conhecido sobre o modo de persistência do genoma viral e os indivíduos são geralmente assintomáticos (ZUR HAUSEN 1996). Na infecção ativa ocorre proliferação celular descontrolada, com resultante aumento da espessura do epitélio, designado como acantose; ocorrem degenerações no núcleo e citoplasma, reconhecidas citológica e histologicamente como coilocitose (HINES et al. 1995). Nos tumores benignos o DNA do HPV não se integra ao genoma celular, permanecendo na sua forma epissomal, enquanto que nos tumores malignos ocorre essa integração (DURST et al. 1985, SCHWARZ et al. 1985, MATSUKURA et al. 1986).

O genoma dos papilomavírus consiste de uma molécula de DNA dupla fita, circular, de aproximadamente 7900 pares de bases e divide-se, basicamente, em 3 regiões: precoce, tardia e LCR (long control region) (ZUR HAUSEN, 1996). A designação de “precoce” (*early – E*) ou tardia (*late – L*) decorre do fato que os genes dessas regiões são expressos, respectivamente, logo após a infecção ou em uma fase mais posterior nesse processo (LOWY et al. 1980, ENGEL et al. 1983).

Em geral, nove a dez genes são encontrados por genoma nos papilomavírus, sendo 7 a 8 na região precoce e dois na região tardia. Os genes precoces, cuja função é conhecida, estão envolvidos na transcrição e replicação do DNA viral (E1 e E2) e na transformação celular (E5, E6 e E7). Os genes tardios (L1 e L2) codificam para as proteínas do capsídeo viral (DOORBAR et al. 1986, DIMAIO et al. 1986, USTAV e STENLUND 1991, CHIANG et al. 1992, PIM et al. 1992, HWANG et al. 1995). A LCR, correspondente a cerca de 10% do genoma viral, localiza-se entre o final do gene L1 e o início do gene E6. Essa região não codifica proteínas mas contém elementos regulatórios virais e fatores de transcrição (O'CONNOR et al. 1997). O genoma do HPV 16 é ilustrado na figura 2.

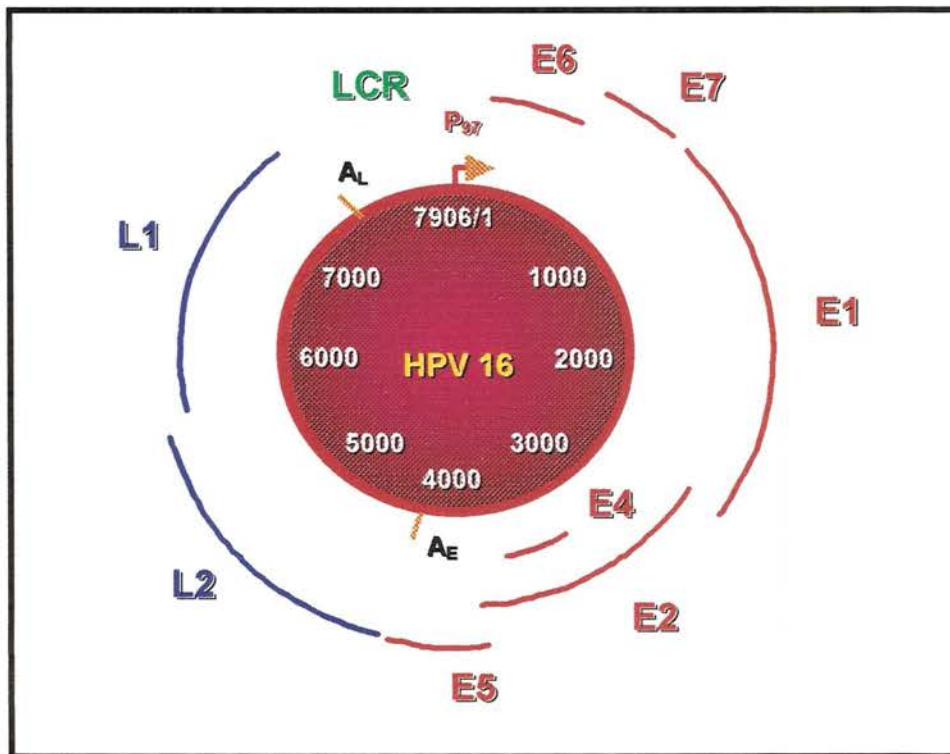


Figura 2. Representação do genoma do HPV 16, mostrando os genes precoces (E1 a E7) e os genes tardios (L1 e L2). À montante do gene E6 encontra-se a região regulatória (LCR).

A atuação do HPV no processo oncogênico decorre fundamentalmente da participação dos genes E6 e E7. A clivagem do DNA circular do vírus durante o processo de integração ocorre na região dos genes E1-E2, o que leva a perda da função controladora de E2 e síntese contínua das proteínas E6 e E7, como demonstrado por

SCHWARZ et al. (1985) e BAKER et al. (1987). Ensaios de laboratório demonstraram que os genes E6 e E7 podem levar a alterações na diferenciação e indução de imortalização de ceratinócitos (MCCANCE et al. 1988, HAWLEY-NELSON et al. 1989, MUNGER et al. 1989); além disso, os produtos dos genes E6 e E7 podem interagir com genes de supressão tumoral, como pRb e p53, alterando o crescimento e diferenciação celular (LINZER e LEVINE 1979, MUNGER et al. 1989, DYSON et al. 1989, WERNESS et al. 1990).

O gene p53, constitutivamente expresso em baixos níveis na maioria dos tecidos normais, previne a replicação celular na presença de dano ao DNA (LINZER e LEVINE 1979, HINDS et al. 1989, KUERBITZ et al. 1992); sua ativação bloqueia o ciclo celular quando a célula ainda encontra-se na fase precoce de divisão (G1), permitindo reparo do DNA, ou pode induzir a apoptose (morte celular programada) em casos específicos. A proteína E6 do HPV 16 é capaz de se ligar à proteína p53, estimulando a sua degradação, o que oferece uma vantagem de crescimento para as células (WERNESS et al. 1990, SCHEFFNER et al. 1990 e 1991, BARBOSA et al. 1991).

A forma hipofosforilada da proteína pRb paralisa a célula na fase de G0/G1 do ciclo celular, bloqueando o avanço através da fase S (DECAPRIO et al. 1989, GOLDWIN et al. 1997); associa-se com o fator transcricional E2F, outro importante controlador da proliferação celular, impedindo-o de funcionar como um transativador (BANDARA et al. 1991, HELIN e HARLOW 1993). A proteína E7 dos HPVs de alto risco tem a capacidade de formar um complexo com a proteína pRb, deslocando e liberando o E2F, com consequente ativação da proliferação celular (DECAPRIO et al. 1988, DYSON et al. 1989, BANDARA et al. 1991). A formação do complexo E7-pRb

também ocorre com os HPVs 6 e 11 (baixo risco), porém com uma afinidade bem menor (MUNGER et al. 1989).

A demonstração das propriedades transformantes das oncoproteínas E6 e E7 dos HPVs de alto risco enfatiza o papel desses vírus no processo de carcinogênese. Esses efeitos são claramente decorrentes da interação das oncoproteínas com p53 e pRb, proteínas-chave no controle do ciclo celular.

2.6.3 Métodos de detecção

Existem várias maneiras para identificar a infecção por HPV. O diagnóstico morfológico pode ser realizado tanto em esfregaços celulares quanto em cortes de tecido e é baseado na identificação de alterações celulares provocadas pelo vírus (coilocitos ou disqueratócitos) (KOSS e DUNFEE 1957, MEISELS e FORTIN 1976). Com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular e identificação dos genomas virais ficou evidenciada a baixa sensibilidade do diagnóstico morfológico (MORSE et al. 1988, SCHNEIDER 1989, LOWHAGEN et al. 1993).

Diagnóstico morfológico

A infecção tecidual pelo HPV leva frequentemente ao aparecimento de uma alteração morfológica definida como atipia coilocitótica. KOSS e DUNFEE (1957) caracterizaram essa alteração, associando-a com o carcinoma *in situ* e invasivo da cérvix uterina, embora não suspeitassem da sua etiologia viral.

O coilócito (“célula em balão”) é uma célula escamosa do tipo intermediário que mostra um amplo halo perinuclear, com bordos bem definidos e atipia nuclear. Binucleação ou multinucleação são frequentemente encontradas. Embora essas células comecem a aparecer nas camadas intermediárias da epiderme, estendem-se também até as camadas superficiais, onde geralmente ocorrem de forma mais exuberante. Uma vez bem caracterizado, o coilócito é patognômico da infecção por HPV (SCHNEIDER 1989). A infecção por HPV também induz uma alteração morfológica celular denominada disqueratose (disqueratocitose) e caracterizada por pequenas células superficiais, com citoplasma eosinofílico. Os núcleos são opacos, hipercromáticos e irregulares (SCHNEIDER 1989).

O diagnóstico microscópico das alterações morfológicas produzidas pelo HPV, através de esfregaços celulares ou cortes histológicos, ainda é o meio mais comum e simples de identificar a infecção viral (KOTOULAS et al. 1996). A acurácia desse procedimento, no entanto, vem sendo avaliada e questionada por vários estudos que, em geral, relatam uma baixa sensibilidade do método quando comparada aos testes de hibridização molecular (SCHNEIDER et al. 1987 e 1989, MORSE et al. 1988, ALVES et al. 1988, SONNEX et al. 1991, HIPELLAINEN et al. 1993, LOWHAGEN et al. 1993)

Um problema adicional para o diagnóstico morfológico é que os critérios citológicos para diagnóstico da infecção por HPV foram definidos para esfregaços do colo uterino, o que leva a uma dificuldade maior para o diagnóstico viral em outras topografias. KREBS e SCHNEIDER (1987) relatam material insatisfatório em quase 90% de esfregaços retirados em vários sítios da região genital de 66 homens, enquanto

SONNEX et al. (1991) relatam que a coilocitose foi raramente observada em esfregaços anais de 225 pacientes portadores de lesões verrucosas nessa região. LOPES et al. (1996b) encontraram coilocitose em 60/145 (44,8%) carcinomas invasivos do pênis.

A sensibilidade do diagnóstico morfológico da presença do HPV é aumentada quando, além da presença dos coilócitos, associam-se outras alterações sugestivas da infecção viral, como presença de disqueratócitos, binucleação, multinucleação, hipercromasia, cariorrexis e macrocitose (MORSE et al. 1988, STRAND et al. 1996). LOWHAGEN et al. (1993), analisando 94 homens com lesões condilomatosas do pênis, relatam que coilocitose concomitante com sinais de displasia indica fortemente a presença de HPV de alto risco.

Mesmo considerando sinais não específicos de infecção por HPV na avaliação morfológica, a frequência de detecção de achados citológicos sugestivos de infecção por HPV é baixa. Pequenas quantidades de DNA viral podem estar presentes e não induzir efeito citopático evidente.

Imunohistoquímica

Pode-se determinar a presença do HPV utilizando anticorpos policlonais contra as proteínas do capsídeo viral, pois partículas virais intactas são encontradas nas lesões benignas, distribuídas de forma regular dentro do núcleo das células infectadas. Os métodos imunohistoquímicos como, por exemplo, a técnica de peroxidase antiperoxidase, podem detectar quantidades relativamente pequenas de antígeno, inclusive em amostras parafinadas. ALVES et al. (1988), comparando achados colposcópicos, histológicos e imunohistoquímicos em condilomas do colo uterino

relatam uma positividade de imunohistoquímica em 63,3% dos casos que apresentavam aspectos morfológicos característicos de infecção pelo HPV.

A expressão das proteínas virais não ocorre em lesões precursoras ou francamente malignas, resultando em resultados falso-negativos. O estudo imunohistoquímico para detecção do HPV em lesões malignas, portanto, não é um método confiável.

Diagnóstico molecular

A hibridização molecular, baseada na formação de fitas duplas (híbridos) entre fitas simples de ácidos nucleicos, é a base para análise dos genes. As moléculas híbridas são formadas pela complementaridade das sequências de nucleotídeos das fitas de DNA ou RNA; na fita complementar do DNA ocorre pareamento das moléculas de adenina com timina e das moléculas de guanina com citosina (DOWNEY et al. 1995).

As técnicas de detecção molecular do HPV empregam princípios de hibridização molecular DNA-DNA e DNA-RNA, envolvendo de um lado o DNA ou RNA extraído do espécime clínico que se quer analisar e do outro os DNAs dos diferentes HPVs já clonados. Baseados nesses princípios, os principais métodos utilizados são: a) hibridização em filtro (*Southern blot*); b) hibridização *in situ* e c) reação da polimerase em cadeia (PCR), seguida de hibridização.

a) Hibridização Southern blot

Neste método, o DNA extraído de células ou tecidos é digerido com enzimas de restrição, submetido a eletroforese em gel para separação dos fragmentos gerados e

transferido para filtros de nitrocelulose, procedimento idealizado por SOUTHERN (1975). Após a transferência realiza-se a hibridização, com imersão da membrana em uma solução que contém a sonda molecular, isto é, segmento específico de DNA que se liga à sequência de DNA que se está investigando. A sonda molecular é previamente marcada com radioisótopos ou enzimas, o que permite a visualização da reação por métodos colorimétricos ou através de autoradiografias.

A hibridização tipo Southern *blot* foi muito utilizada no passado. Suas principais desvantagens são a necessidade de isolamento de quantidades relativamente grandes e de alta pureza do DNA a ser estudado, além da impossibilidade de sua utilização em tecidos fixados (VILLA e MEDEIROS 1995).

b) Hibridização *in situ*

É realizada através da adição de solução de hibridização contendo a sonda molecular sobre o fragmento de tecido aderido à lâmina, com prévio tratamento do tecido com proteases. A hibridização *in situ* permite analisar a localização do DNA em células definidas ou em cromossomos. A localização inequívoca do genoma do HPV nas células epiteliais pode ser determinada. É, no entanto, uma metodologia muito laboriosa e de relativa sensibilidade (STOLER et al. 1992).

c) Reação da polimerase em cadeia (PCR)

Atualmente a PCR é o método mais utilizado em virtude de permitir a produção de um grande número de cópias de uma sequência específica de DNA, sem necessidade de clonagem. Após denaturação da fita dupla do DNA (através de aquecimento) a DNA

polimerase, enzima responsável pela replicação, utiliza uma molécula de DNA fita simples como molde para sintetizar uma nova fita complementar. Durante o processo de síntese se faz necessário a presença de desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs); ocorre anelamento dos iniciadores em pontos específicos da cadeia de fita simples do DNA molde e, a partir desses pequenos segmentos de DNA dupla fita, se processa a formação da nova molécula de DNA utilizando-se os nucleotídeos precursores. Novo aquecimento da reação separa as fitas originais e as recém sintetizadas que tornam-se disponíveis para o anelamento com os iniciadores e síntese de novas fitas complementares. Pode-se repetir *n* vezes esses ciclos, resultando em ampliações de regiões específicas de um DNA (ERLICH et al. 1991, DOWNEY et al. 1995, VILLA e MEDEIROS 1995).

A PCR é uma técnica altamente sensível e específica, podendo ser utilizada mesmo com quantidades muito pequenas de DNA da amostra biológica. Permite também pesquisa de DNA em tecidos fixados e emblocados em parafina (VILLA e MEDEIROS 1995).

O diagnóstico final da infecção pelo HPV só é possível através de análise do DNA. Os achados citológicos e histológicos podem representar uma evidência importante, mas não constituem uma prova formal da infecção viral. As pesquisas nessa área requerem uma integração dos aspectos epidemiológicos com as informações da biologia molecular.

2.6.4 Associação com câncer de pênis

O primeiro relato de detecção do DNA do HPV em câncer do pênis foi feito por DURST et al. em 1983, na Alemanha. A participação do vírus na patogênese do câncer peniano, no entanto, tem recebido pouca atenção devido, principalmente, a baixa incidência da neoplasia em países desenvolvidos.

O câncer do colo do útero, uma das neoplasias mais incidentes nas mulheres, há muito tem sua etiologia associada à infecção viral (LORINCZ et al. 1987, FRANCO 1995 e 1999). Importantes estudos epidemiológicos consideram a infecção por HPV como a causa dessa neoplasia (MUNHOZ et al. 1992, SCHIFFMAN et al. 1993, BOSCH et al. 1995), além do que a integração e expressão regular dos genes E6 e E7 do HPV dentro da célula cancerosa, a promoção da proliferação celular e a indução de instabilidade cromossômica são dados que demonstram a importância desse vírus na determinação do fenótipo maligno (DURST et al. 1985, SCHWARZ et al. 1985, MCCANCE et al. 1988, HAWLEY-NELSON et al. 1989, MUNGER et al. 1989, WERNESS et al. 1990).

O câncer peniano é o correlato, no homem, ao câncer cervical da mulher, existindo uma associação entre as taxas de incidência dessas duas neoplasias em áreas geográficas diferentes (GRAHAM et al. 1979). Mesmo considerando uma incidência muito menor do câncer de pênis, a relação câncer de pênis-câncer de colo uterino é mantida em áreas de alta, média e baixa prevalência, sugerindo que os fatores etiológicos dessas duas doenças possam ser os mesmos (HOWLEY 1995, VARMA et al. 1990).

O HPV afeta o epitélio escamoso da genitália masculina de maneira similar ao trato genital feminino, incluindo a formação de condilomas planos ou exofíticos e transformação neoplásica (carcinomas *in situ* ou invasivos) (SARKAR et al. 1992). A infecção natural do epitélio ocorre geralmente através de pequenos traumas e soluções de continuidade, o que permite acesso físico direto das partículas virais às células basais (BROKER 1987). A identificação da presença do DNA do HPV, tanto em lesões pré-invasivas como nos carcinomas invasivos do pênis, é uma forte evidência para o papel etiológico do vírus nessa neoplasia (CUPP et al. 1995, DIANZANI et al. 1998).

As neoplasias intraepiteliais do pênis (PIN) podem estar associadas com carcinoma invasivo, embora apresentem um menor potencial maligno do que as NIC do colo do útero (CRUM et al. 1992, DEMETER et al. 1993); a diferença parece ser decorrente do aspecto morfohistológico distinto dos epitélios do pênis e trato genital feminino, além da existência da zona de transformação na cérvix (AYNAUD et al. 1994). Essa região é provavelmente susceptível ao desenvolvimento de NIC após infecção com HPV, em contraste à pele do pênis, onde a maioria das lesões que se formam são condilomas (LEVINE et al. 1984).

Considerando apenas as neoplasias invasivas do pênis, as taxas de detecção do DNA do HPV tem sido bastante variáveis; em média, 50% dos CEC penianos são HPV positivos (VILLA E LOPES 1986, MCCANCE et al. 1986, TORNESELLO et al. 1992, HIGGINS et al. 1992, SARKAR et al. 1992, IWASAWA et al. 1993). Semelhante ao câncer do colo uterino, ocorre integração do genoma do HPV na célula hospedeira, com consequente interrupção do gene E2, como demonstrado por TORNESELLO et al. (1997).

IWASAWA et al. (1993), analisando pacientes com CEC de pênis através de PCR, identificaram o DNA do HPV em 63% (70/111); o HPV16 foi encontrado em 97,2% dos casos positivos. MCCANCE et al. (1986), analisando pacientes provenientes do Recife, Brasil, detectaram DNA do HPV em 31/53 (58%) neoplasias penianas invasivas, sendo 26 (49%) HPV16 e 5 (9%) HPV18, enquanto que VILLA e LOPES (1986), também no Brasil, identificaram DNA do HPV em 7/18 (39%) CEC de pênis, sendo todos HPV18. As taxas de detecção do DNA do HPV nos estudos de TORNESELLO et al. (1992), na África, e WIENER et al. (1992), nos EUA, foram de 100% e 31%, respectivamente; em ambos estudos o HPV16 foi o mais prevalente.

O HPV16 é identificado em aproximadamente 80 a 90% das neoplasias malignas do pênis positivas para a infecção viral, enquanto que o HPV 18 está presente em cerca de 10% dos casos (CUPP et al. 1995). O DNA do HPV tem sido identificado tanto nos tumores primários do pênis como nas lesões metastáticas (BARRASSO et al. 1987, WIENER et al. 1992). Recente estudo demonstra a presença de uma mutação no oncogene c-ras em metástase linfonodal de CEC de pênis positivo para HPV18, sugerindo que a ativação desse oncogene pode ser um evento tardio na progressão da doença (LEIS et al. 1998).

Embora as pesquisas mostrem uma taxa importante de detecção do DNA do HPV no câncer do pênis, a discrepância entre a incidência dessa neoplasia e a prevalência da infecção viral indica que o HPV é apenas um cofator e que outras condições precisam estar presentes para a completa carcinogênese. Outros vírus, como herpes simples, ou o fumo, por exemplo, podem atuar como promotores na progressão da doença, enquanto deficiências no sistema imune do indivíduo podem permitir que o vírus libere-se de um

período de latência e promova a proliferação celular (WIENER e WALTHER 1995). FRISCH et al. (1996) relatam um caso de associação de câncer de pênis e câncer de ânus em um mesmo paciente, imunodeprimido por tratamento quimioterápico e uso de corticóides após tratamento de linfoma de Hodgkin. Câncer peniano associado com HPV tem sido relatado em pacientes com evidente deficiência imunológica, HIV positivos (POBLET et al. 1999).

2.6.5 Associação com prognóstico

A associação do HPV com vários cânceres do homem, principalmente na região anogenital, é bastante clara. O valor prognóstico da presença do vírus, no entanto, é controverso. Existem divergências sobre o assunto mesmo no carcinoma do colo uterino, onde a patogênese viral é mais bem estudada.

A relação clinicopatológica mais consistente entre HPV e câncer do colo do útero é a observação que o HPV18 é encontrado predominantemente em adenocarcinomas, enquanto que o HPV16 é o mais comum em tumores com histologia escamosa (KING et al. 1989, RIOU et al. 1990, HIGGINS et al. 1991, CHEN et al. 1994, BURGER et al. 1996, NAKAGAWA et al. 1996).

Alguns estudos sugerem associação da presença do HPV no tumor do colo uterino com a faixa etária das pacientes (BARNES et al. 1988, KING et al. 1989, HIGGINS et al. 1991, BURGER et al. 1996, NAKAGAWA et al. 1996). BURGER et al. (1996), por exemplo, analisando 291 pacientes, observaram que o grupo HPV positivo (247 pacientes) teve uma tendência a ser mais jovem (≤ 45 anos), quando comparado ao

grupo HPV negativo (44 pacientes). Outros estudos, no entanto, não identificaram diferenças na média de idade das pacientes quando considerada a positividade do HPV nessa neoplasia (CHEN et al. 1994, GARZETTI et al. 1998).

Não parece haver associação da presença do HPV no carcinoma do colo uterino com o tamanho e estadiamento da lesão (CHEN et al. 1994, BURGER et al. 1996, GARZETTI et al. 1998). Apesar disso, tem-se sugerido que o vírus tem uma participação importante na progressão tumoral em virtude de sua associação com maior incidência de metástases linfonodais e recorrência da doença (GIRARDI et al. 1992, CHEN et al. 1994, GARZETTI et al. 1998). CHEN et al. (1994) relatam que 24,3% das pacientes portadoras de CEC HPV positivo tinham metástases linfonodais, enquanto essa taxa foi de apenas 11% nas pacientes HPV negativo ($p < 0,05$). No estudo de GARZETTI et al. (1998) as taxas de metástases linfonodais nos grupos de pacientes HPV positivo e negativo foram de 45% e 10%, respectivamente.

A associação da presença do HPV no carcinoma do colo do útero com incidência de metástases linfonodais é negada por outros estudos, como o de KING et al. (1989). Esses autores, analisando 85 pacientes, sendo 47 HPV negativas, 20 HPV18 positivas e 18 HPV16 positivas, não observaram diferença significativa entre esses 3 grupos quando considerada a incidência de metástases em linfonodos pélvicos e paraaórticos. KENTER et al. (1993), estudando especificamente o HPV 16 em 70 pacientes portadoras de CEC de colo uterino EC Ia e IIb, também não observaram associação da presença do vírus com metástases linfonodais.

A participação de um tipo específico de HPV na evolução e prognóstico dos carcinomas do colo uterino também tem sido estudado. Algumas observações sugerem

que o HPV18 pode levar a um comportamento mais agressivo do câncer cervical quando comparado a outros tipos. BARNES et al. (1988), analisando 30 pacientes, observaram que 83% do grupo HPV18 positivo foi associado com tumores mal diferenciados (5/6 casos), enquanto que essa associação esteve presente em apenas 7% dos HPV16 positivos (1/14) ($p=0,002$). Considerando apenas o estadiamento Ib houve mais metástases linfonodais nas pacientes HPV18 positivas (3/5) do que naquelas HPV16 positivas (4/11). A maior agressividade das neoplasias HPV18 positivas, quando comparadas aquelas HPV16 positivas ou HPV negativas também tem sido relatada por outros autores (KURMAN et al. 1988, WALKER et al. 1989, NAKAGAWA et al. 1996).

Alguns estudos sugerem que tumores onde não foi detectado o DNA do HPV apresentam-se com comportamento biológico mais agressivo, aumentando as controvérsias sobre o assunto (RIOU et al. 1990 e 1992, HIGGINS et al. 1991 e 1992). RIOU et al. (1990), por exemplo, analisando 106 pacientes portadoras de carcinoma do colo do útero em estádios iniciais (Ib, IIa e IIb), relatam que as pacientes HPV negativo tiveram 2,6 vezes maior taxa de recorrência global ($p<0,05$) e 4,5 vezes maior risco de metástase à distância ($p<0,01$) do que as pacientes HPV positivo. A taxa de sobrevivência livre de doença nas pacientes HPV positivo foi significativamente maior do que nas pacientes HPV negativo (77% x 40%). HIGGINS et al. (1991), analisando 212 pacientes e utilizando análise uni e multivariada, concluíram que a ausência do HPV foi significativamente associada com pior prognóstico e evolução fatal. Os autores comentam que, considerando a importância da inativação dos genes de supressão tumoral pRb e p53 para o desenvolvimento do câncer do colo uterino, é provável que

esses genes estejam mutados ou deletados nos tumores HPV negativos, o que poderia levar a um pior prognóstico.

ROSE et al. (1991) e KENTER et al. (1993) não observaram influência do presença do HPV no carcinoma do colo do útero em relação à evolução e/ou prognóstico das pacientes, com taxas de recorrência da neoplasia e sobrevida das pacientes semelhantes nos grupos HPV positivo e negativo.

Existem dificuldades em comparar grupos positivos e negativos para HPV em câncer de colo uterino porque as neoplasias verdadeiramente negativas são raras. Segundo BURGER et al. (1996): "é provável que os tumores HPV negativos compreendam um grupo heterogêneo que inclui tumores verdadeiramente negativos, tumores com baixo número de cópias virais e tumores com subtipos de HPV ainda não identificados através das técnicas moleculares atuais".

As controvérsias sobre o valor prognóstico da presença do HPV nas neoplasias se estendem a outras localizações. HUSSEINZADEH et al. (1991), estudando 28 pacientes portadoras de CEC de vulva, relatam que todos os cânceres multifocais foram associados com alterações morfológicas sugestivas da presença do HPV (coilocitose), enquanto que essa associação esteve presente em apenas 35% das lesões unifocais. Metástases nodais ocorreram em 59% das pacientes com lesões unifocais e em nenhuma paciente com lesões multifocais, sugerindo um melhor prognóstico quando o vírus está presente. PINTO et al. (1999a), por outro lado, analisando 184 carcinomas vulvares no Brasil, relatam que a presença do HPV não influenciou a sobrevida das pacientes, apesar da sua clara associação com histologia basalóide.

PAZ et al. (1997), analisando 167 carcinomas de cabeça e pescoço e esôfago, relatam que os pacientes HPV positivos apresentaram-se com tumores maiores e em estadiamentos mais avançados do que os pacientes HPV negativos ($p=0,01$). Apenas 4/24 (16,7%) pacientes com DNA do HPV nos tumores tinham linfonodos negativos, comparado a 73/140 (52,1%) do grupo sem o vírus. A sobrevida dos dois grupos, no entanto, foi similar. PINTOS et al. (1999), também analisando tumores de cabeça e pescoço (101 casos), relatam que a taxa de detecção do HPV foi maior nos casos sem metástases linfonodais do que naqueles com doença metastática (21,4 x 6,5%), diferença marginalmente significativa ($p=0,06$). A sobrevida dos pacientes HPV positivo e negativo foi semelhante. WILLIAMS et al. (1996), analisando 35 pacientes portadores de carcinoma anal, não observaram diferenças significantes em relação à idade ou sobrevida das pacientes quando considerados os grupos HPV positivo (24 casos) e HPV negativo (11 casos).

O único estudo encontrado que analisa o valor prognóstico do HPV no carcinoma invasivo de pênis foi o de WIENER et al. (1992). Esses autores analisaram 29 pacientes utilizando PCR e hibridização específica com iniciadores do HPV16 e 18. Nove pacientes foram positivos para HPV16/18 e 20 foram negativos. Não houve diferença entre os dois grupos quando considerados os fatores idade, presença de metástases linfonodais e presença de doença recorrente. As sobrevidas global e específica por doença também foram semelhantes.

A discrepância dos resultados entre as diversas séries, quando se considera o valor prognóstico do HPV, pode ser decorrente de amostras algumas vezes pequenas,

técnicas cirúrgicas diferentes e métodos de detecção do DNA viral com sensibilidade diferente.

OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

3 Objetivos e justificativa

3.1 Objetivos

3.1.1 Estudar o possível valor prognóstico do HPV em pacientes portadores de câncer de pênis.

3.1.2 Estudar a correlação da coilocitose e HPV no câncer de pênis.

3.2 Justificativa

O câncer do pênis, embora raro em países desenvolvidos, apresenta importantes taxas de incidência no Brasil. É uma doença essencialmente loco-regional e pode ter altos índices de cura, mesmo na vigência de metástases linfonodais.

A linfadenectomia ilioinguinal, método de eleição para tratamento dos linfonodos, se acompanha de altos índices de morbidade. Além disso, a pouca sensibilidade e especificidade dos exames clínicos e complementares no estadiamento pré-operatório, induz a realização de cirurgias desnecessárias, com retirada de linfonodos histologicamente negativos.

A identificação de fatores prognósticos ajuda na seleção de grupos de baixo e alto risco para metastatização linfonodal, com melhor indicação do procedimento cirúrgico a ser utilizado e conseqüente menor morbidade. O DNA do HPV, presente em cerca de 50% dos carcinomas do pênis, encontra-se integrado nas células cancerosas e poderia participar na evolução da neoplasia. O diagnóstico morfológico da infecção pelo HPV, caracterizado principalmente pela presença de coilocitose, embora seja o mais

comumente utilizado, tem sua acurácia contestada quando comparada com testes de hibridização molecular.

Na literatura consultada não encontramos estudos com casuística representativa de carcinoma de pênis, apresentando informações histopatológicas do tumor primário e dos linfonodos regionais, que avaliassem o valor prognóstico do HPV.

A presente investigação, baseada na análise de uma série considerável de pacientes submetidos a amputação e linfadenectomia ilioinguinal, e utilizando-se de metodologia adequada para detecção do DNA do HPV em amostras parafinadas, pode contribuir no estudo das variáveis prognósticas dessa neoplasia, ajudando para um melhor planejamento terapêutico.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

4 Casuística e métodos

4.1 Casuística

Foi realizada uma análise retrospectiva de 82 pacientes consecutivos, selecionados a partir de 730 portadores de carcinoma espinocelular primário do pênis, atendidos no Departamento de Cirurgia Pélvica do Hospital A.C. Camargo, Fundação Antônio Prudente, São Paulo, no período de janeiro de 1953 a dezembro de 1992. Os dados foram coletados a partir dos prontuários do Serviço de Arquivo Médico Estatístico (SAME) do referido hospital, sendo sumarizados em formulário padronizado (Anexo 1).

Foram avaliados apenas os pacientes que seguiram os seguintes critérios de inclusão: a) diagnóstico histológico de carcinoma espinocelular primitivo do pênis; b) ausência de tratamento oncológico prévio; c) ausência de outras neoplasias concomitantes; d) tumor primário tratado por amputação ou ressecção ampla; e) linfadenectomia inguinal ou ilioinguinal bilateral, concomitante ou após a cirurgia do tumor primário; f) disponibilidade de dados clínicos e anatomopatológicos do tumor primário e linfonodos dissecados; g) disponibilidade dos blocos de parafina referentes às lâminas originais do tumor primário e h) gene da β -globina amplificável por PCR (controle de viabilidade do DNA extraído do tecido parafinado)

4.2 Métodos

4.2.1 Diagnóstico e estadiamento clínico

A avaliação inicial de todos os pacientes foi feita através de exame clínico geral, analisando-se os diversos sistemas orgânicos, e exame loco-regional, onde se definia o aspecto, localização e extensão local do tumor primário. O tamanho da neoplasia foi baseado no seu maior diâmetro. A avaliação das regiões inguinais foi feita através de palpação dessas áreas, com identificação ou não de linfonodos clinicamente metastáticos. O exame loco-regional foi complementado com a realização de toque retal, para investigação de possível infiltração da raiz do pênis e próstata.

A confirmação diagnóstica foi feita através de estudo histopatológico de fragmento tecidual proveniente de biópsia incisional da lesão, em área limítrofe entre o tecido neoplásico e o sadio. O material obtido foi fixado em formol a 10% com posterior inclusão em parafina e os cortes foram corados pela hamatoxilina-eosina. Quando os pacientes tinham sido biopsiados em outras instituições, procedia-se sempre à revisão das lâminas.

Foram realizadas radiografias de tórax, nas incidências pósterio-anterior e perfil, para investigação de possíveis metástases à distância. O estadiamento clínico utilizado foi o TNM (HARMER 1978) (Tabela 1), onde não se recomenda o agrupamento dos pacientes por estádios clínicos e se considera linfonodos regionais aqueles localizados nas regiões inguinais.

4.2.2 Procedimento cirúrgico

Todos os pacientes foram tratados por cirurgia, sendo realizada a ressecção do tumor com margem macroscópica mínima de 2cm. De acordo com a extensão do tumor primário, foi realizada ressecção ampla, amputação parcial ou total do pênis. Nos casos de amputação total a uretra foi reimplantada no períneo.

Os linfonodos regionais foram tratados por linfadenectomia inguinal ou ilioinguinal bilateral. A linfadenectomia ilioinguinal consistiu na ressecção em monobloco de linfonodos, vasos linfáticos e tecido areolar de sustentação da cadeia ilíaca primitiva, externa e interna, do conteúdo da fossa obturadora e da região inguinal, conforme técnica preconizada no Departamento de Cirurgia Pélvica do Hospital A.C.Camargo (GENTIL et al. 1986). No caso das linfadenectomias inguinais, a cirurgia limitou-se a essa região, sendo excisados os linfonodos superficiais e profundos.

4.2.3 Exame anatomopatológico do tumor primário

As peças operatórias foram fixadas em formol a 10%. Verificou-se inicialmente o tamanho da lesão baseando-se no seu maior diâmetro, extensão em relação à glândula, prepúcio, corpo do pênis, uretra e estruturas adjacentes. No mínimo dois cortes representativos da peça cirúrgica, além de fragmentos da margem de ressecção, foram incluídos em parafina e corados pela hematoxilina-eosina.

Todas as lâminas foram revistas por um único patologista (Dr. Geraldo Santiago Hidalgo – Hospital A.C.Camargo), sendo analisadas as seguintes variáveis:

a) Espessura do tumor: medida a partir da superfície até a região de infiltração mais profunda, usando-se uma escala milimétrica aplicada sobre o corte histológico. De acordo com essa variável os tumores foram divididos em dois grupos: 1) entre 1 e 5mm e 2) maior que 5 mm.

b) Grau de diferenciação histológica: os carcinomas espinocelulares foram classificados, de acordo com o grau de diferenciação celular, em:

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

Grau II (moderadamente diferenciado), caracterizado pela presença de células poligonais estratificadas, com poucas pontes intercelulares. Pérolas córneas escassas ou ausentes. Pleiomorfismo nuclear evidente com mitoses numerosas e atípicas.

Grau III (pouco diferenciado), caracterizado pela raridade de células poligonais, com difícil visualização de pontes intercelulares. Predomínio de células pequenas, alongadas e indiferenciadas. Acentuado pleiomorfismo e hipercromasia nuclear com mitoses atípicas e frequentes. Os tumores que apresentavam diferentes características morfológicas foram classificados de acordo com o aspecto predominante.

c) Embolização vascular linfática, caracterizada pela presença de células neoplásicas, livres ou agrupadas, no lúmen vascular de paredes delgadas, revestidos por células endoteliais desprovidas de fibras musculares lisas ou de hemácias.

- d) Embolização vascular venosa, caracterizada pela presença de células neoplásicas, livres ou agrupadas, no lúmen vascular com hemácias e com revestimento endotelial e fibras musculares.
- e) Infiltração de corpos cavernosos e/ou esponjoso, caracterizada pela invasão dessas estruturas, parcial ou totalmente, pelas células neoplásicas.
- f) Infiltração da uretra, caracterizada pela infiltração de células neoplásicas no epitélio e/ou córion subjacente.
- g) Infiltrado mononuclear e eosinofílico, avaliados como ausentes, leves, moderados, acentuados e não determinados. O infiltrado mononuclear acentuado caracterizou-se por grande acúmulo de células inflamatórias, de maneira difusa ou focal e ao redor da neoplasia. Na forma leve havia poucas e esparsas células inflamatórias ao redor do tumor. A infiltração moderada foi representada por uma situação intermediária entre a acentuada e a leve. Os mesmos critérios foram utilizados para definir os infiltrados eosinofílicos.
- h) Presença de coilocitose, caracterizada pelo achado de células coilocitóticas, uni ou binucleadas, com cromatina grosseira ou hipercrômica, circundadas por citoplasma opaco ou vacuolizado.

Alguns dos aspectos histológicos supracitados estão ilustrados nas figuras 3 - 10.

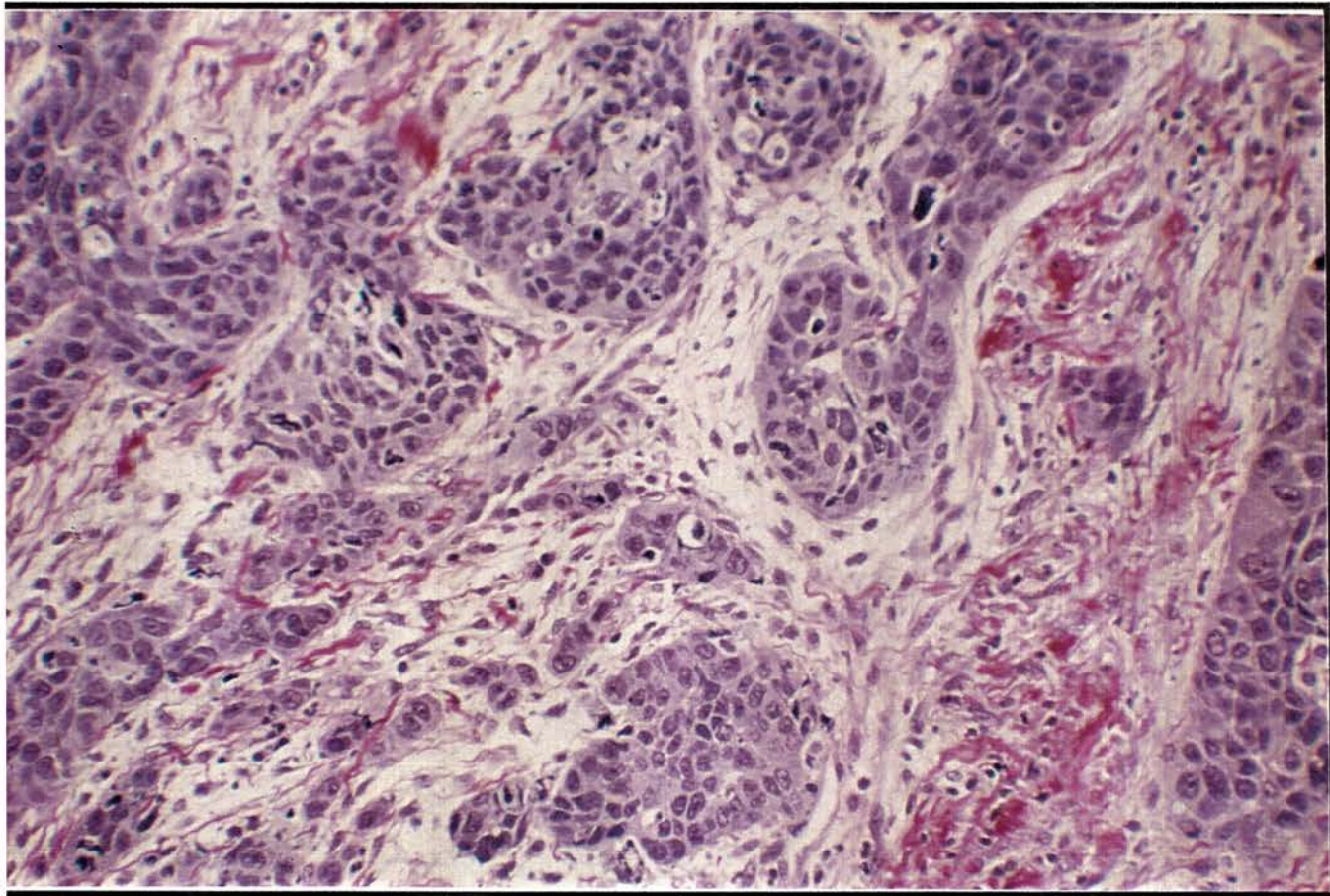


Figura 3. Padrão infiltrativo de carcinoma espinocelular moderadamente diferenciado do pênis. (Picro-Sirius hematoxilina – 20x)

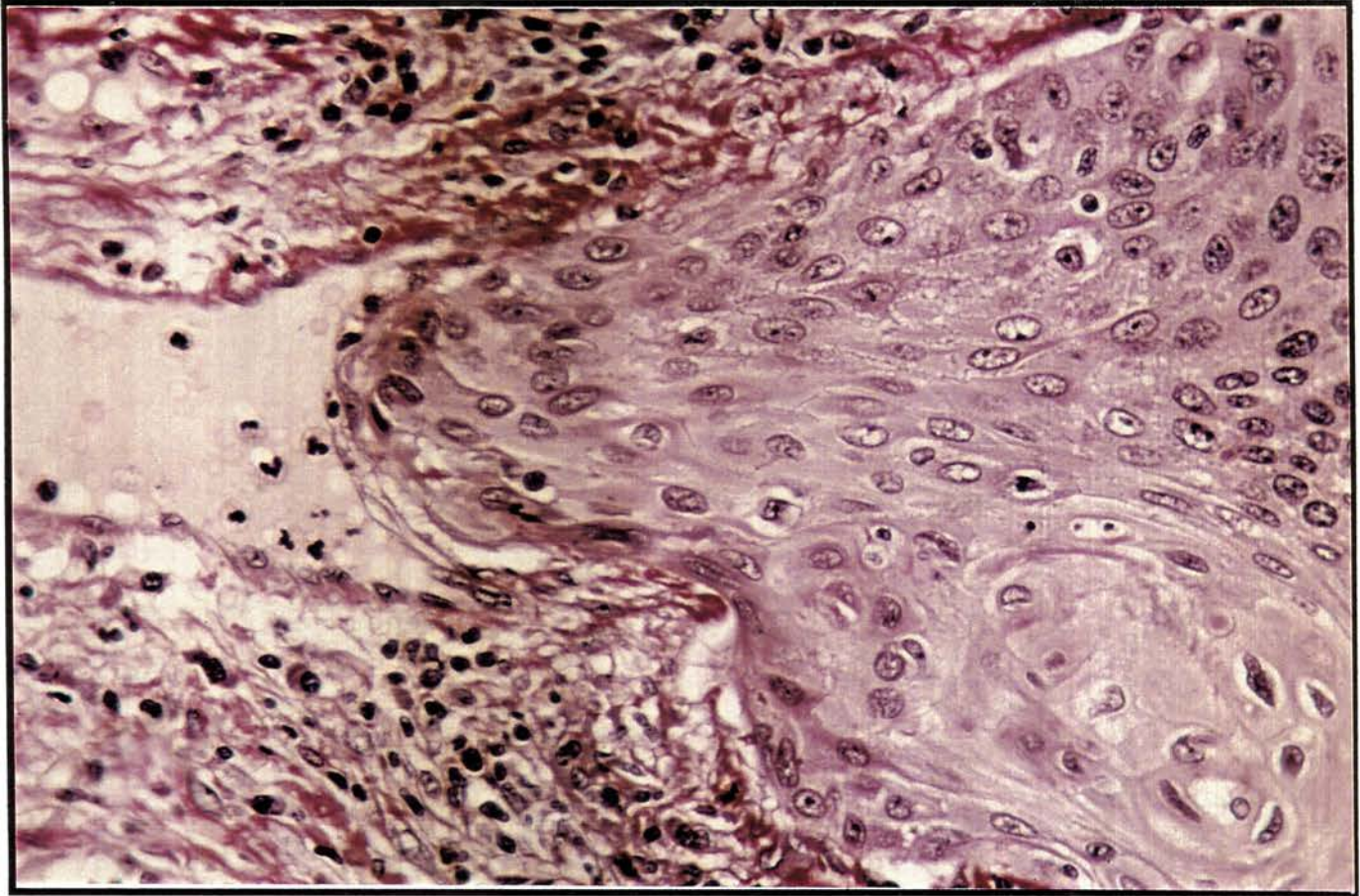


Figura 4. Imagem de crescimento de carcinoma espinocelular de pênis “empurrando” a parede endotelial de um linfático. Infiltrado linfoplasmocitário evidente (HE, 100x)

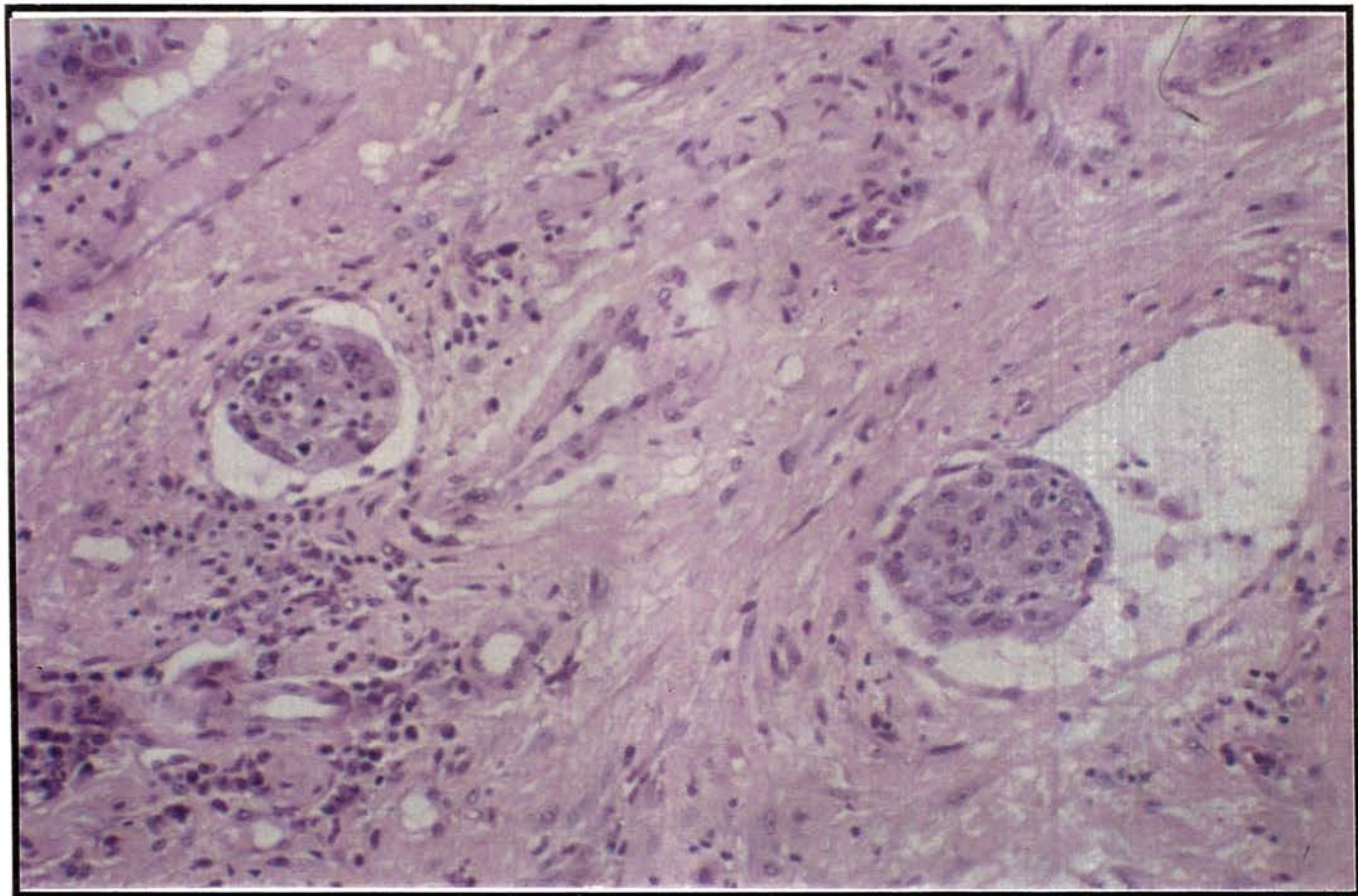
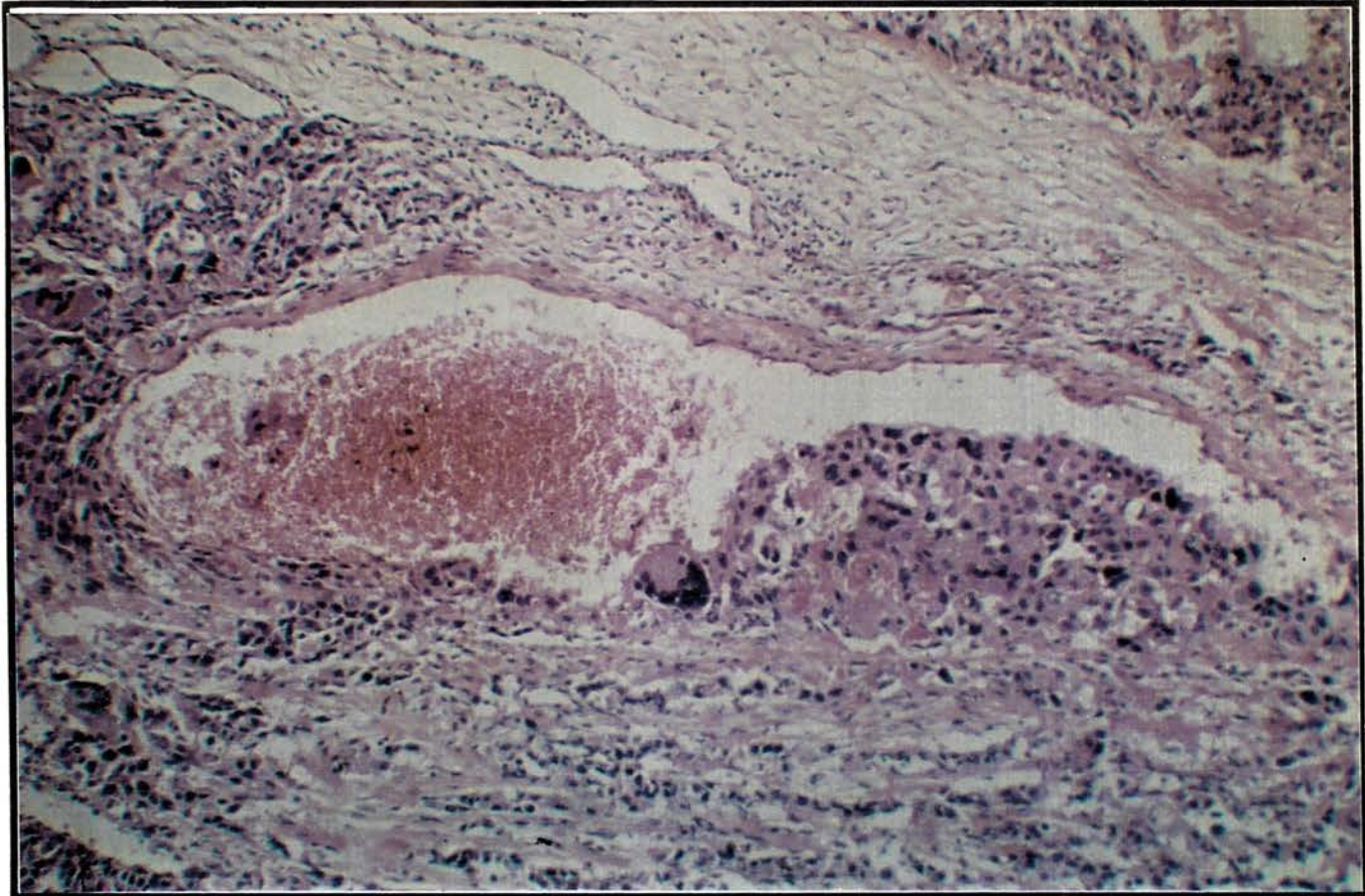


Figura 5. Embolia linfática por células neoplásicas com leve infiltrado linfocitário perivascular (HE, 20x)



**Figura 6. Infiltração tumoral perivascular e embolia venosa por células neoplásicas
(HE, 20x)**

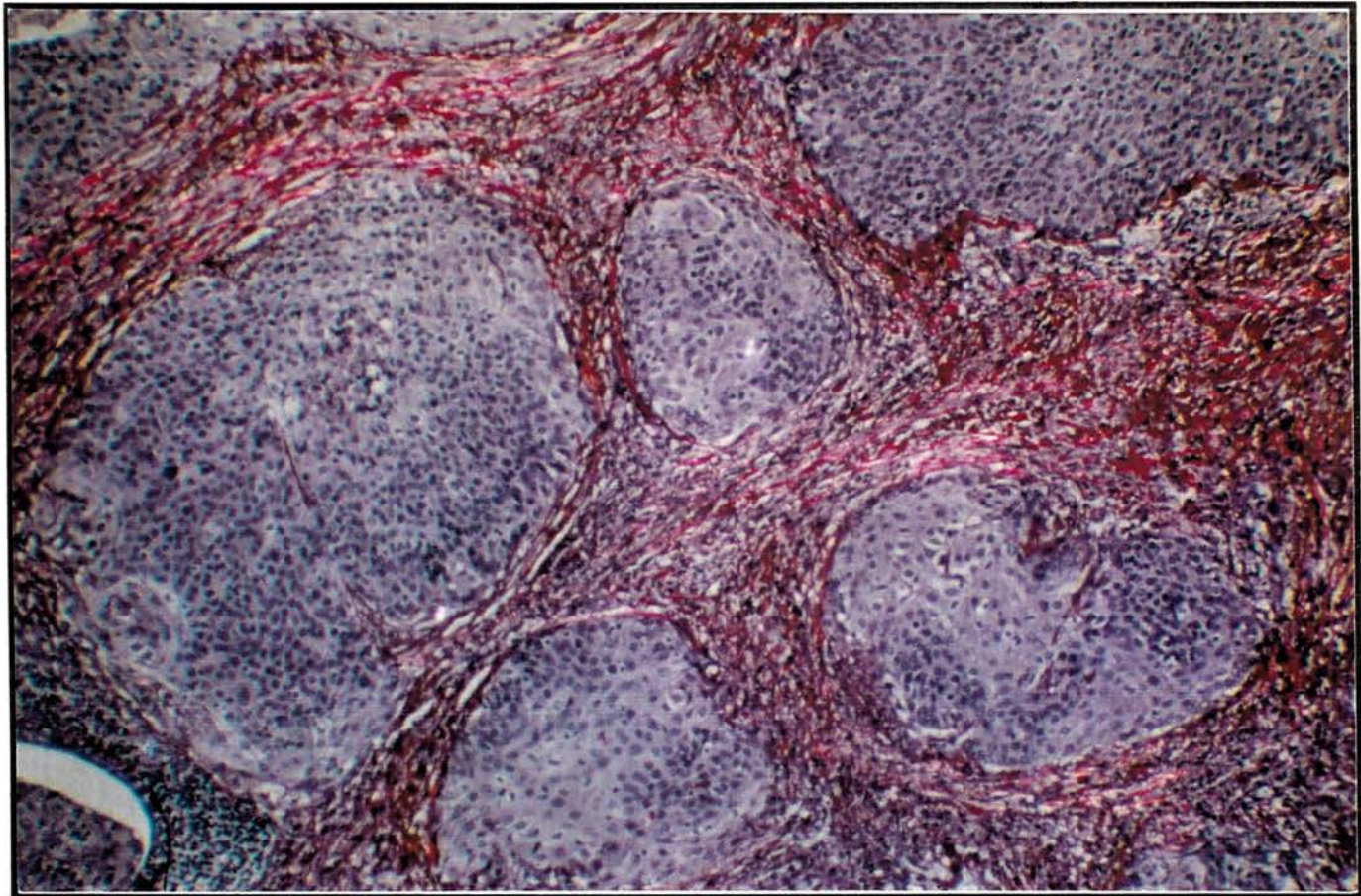


Figura 7. Extensa infiltração dos corpos cavernosos por células neoplásicas (Picro-Sirius hematoxilina, 20x)

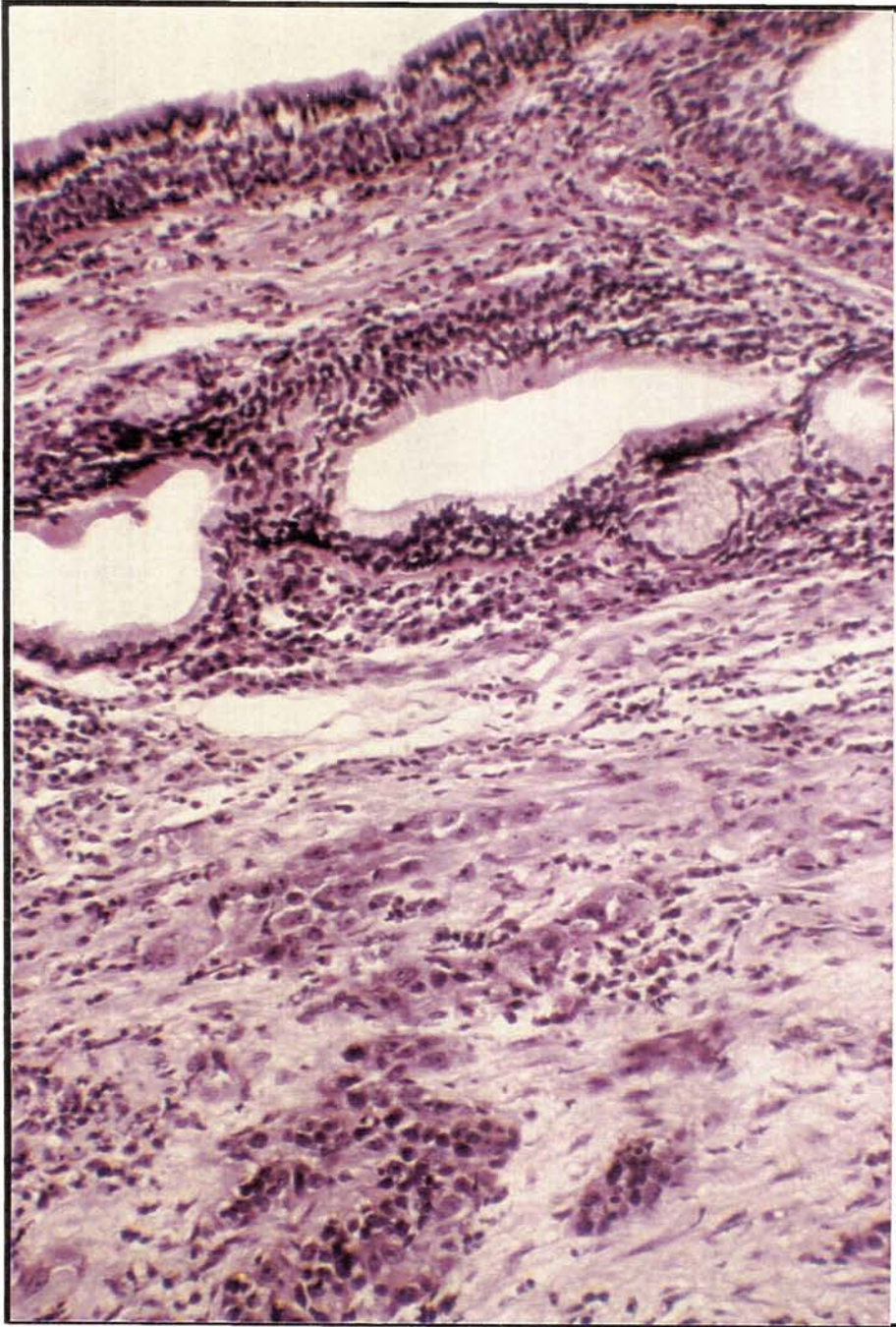


Figura 8. Infiltração tumoral adjacente às glândulas periuretrais (HE, 40x)

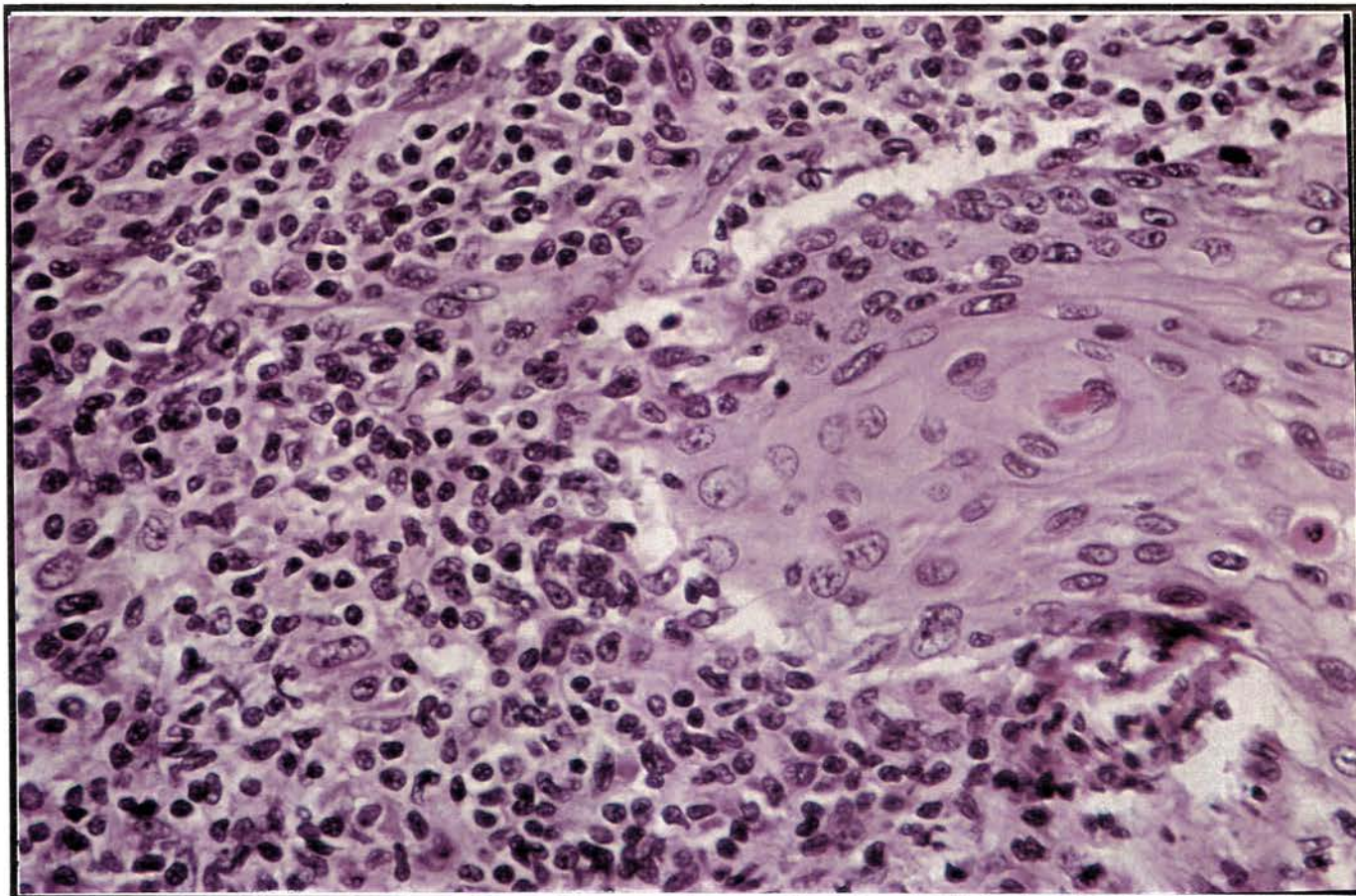


Figura 9. Extenso infiltrado linfoplasmocitário ao redor de crescimento invasivo de carcinoma espinocelular de pênis bem diferenciado (HE, 20x)

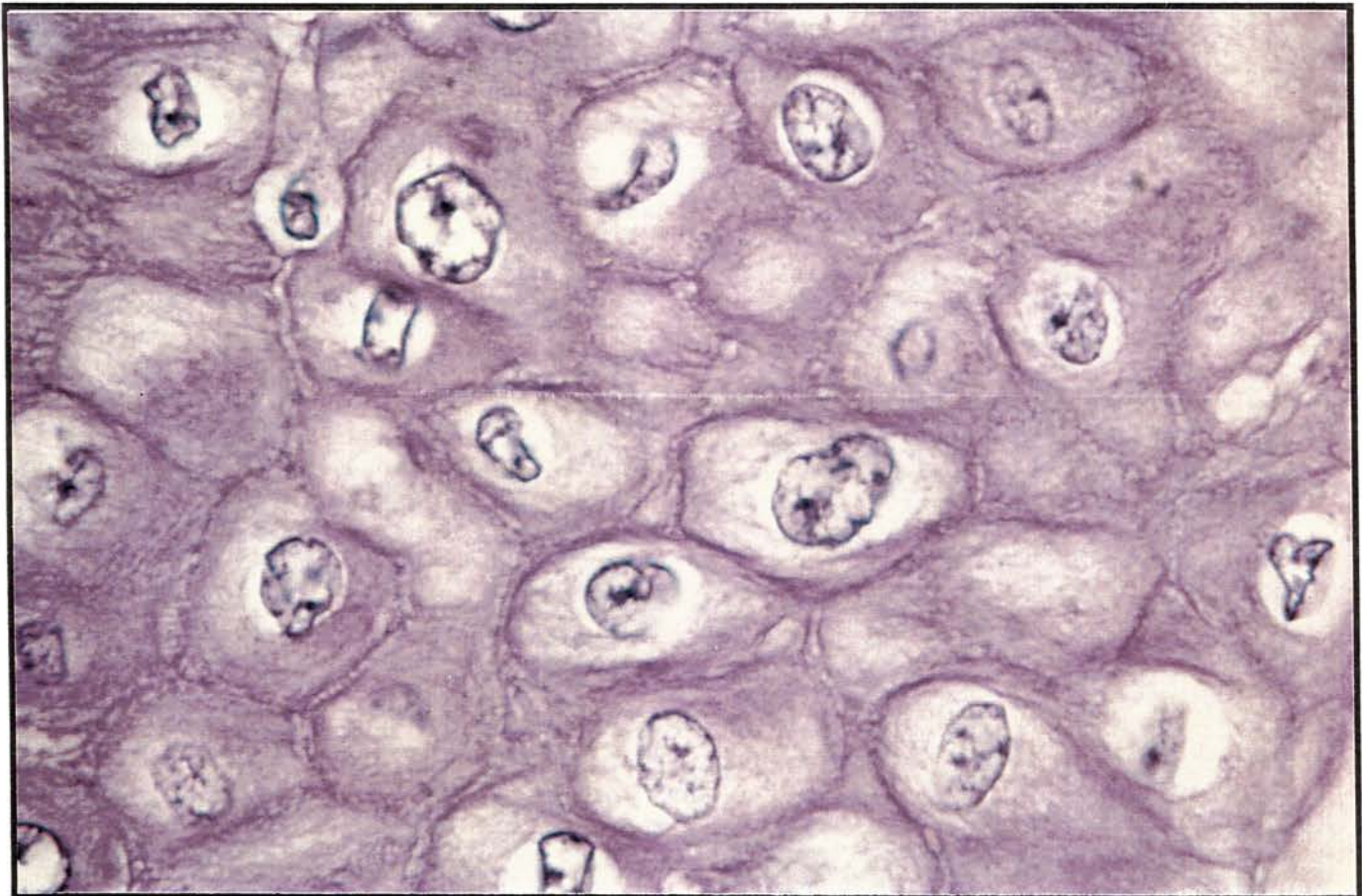


Figura 10. Grande aumento de coilocitose encontrada em papilas de áreas de acantose. Além do pleomorfismo nuclear, é evidente o aspecto opaco citoplasmático perinuclear. (HE, 100x)

4.2.4 Exame anatomopatológico dos linfonodos

As peças operatórias das linfadenectomias foram fixadas em formol a 10%. Identificou-se o número de linfonodos dissecados e, em 20 pacientes, o nível (inguinal ou ilíaco). Procedeu-se a secção dos linfonodos em cortes longitudinais passando pelo hilo. No mínimo dois fragmentos representativos foram incluídos em parafina e os cortes histológicos foram corados pela hematoxilina-eosina. Os linfonodos foram classificados como metastáticos, quando estavam infiltrados pela neoplasia, e não metastáticos, quando livres de células neoplásicas.

4.2.5 Detecção do DNA do HPV no tumor primário

Após pesquisa no arquivo do Departamento de Anatomia Patológica, identificaram-se as lâminas histológicas referentes à peça cirúrgica (tumor peniano). Em virtude de haver, em vários casos, mais de uma lâmina representativa do tumor primário, todas as lâminas foram revistas por um único patologista (Dr. Humberto Torloni – Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer), identificando-se aquela mais representativa da lesão. Os blocos de parafina referentes a essas lâminas foram cortados e os fragmentos (4 cortes de 5 μ) acondicionados em tubos de polipropileno de 1,5ml.

Os fragmentos de tecido foram digeridos com proteinase K (200 μ g/ml) a 56°C, por 2 a 4 dias. Nesta temperatura a parafina apresenta-se em estado líquido. Procedeu-se, então, a extração do DNA através do método do fenolclorofórmio, seguindo-se as seguintes etapas:

- a) Adição de fenol saturado (1vol.Amostra : 1 vol.Fenol), homogenizando-se durante no mínimo 10 seg. em agitador de tubos do tipo *vortex*. Acrescentou-se clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) (1vol.amostra:1vol.clorofórmio) e agitou-se por, no mínimo, 10 seg. Centrifugou-se por 3 min.
- b) Remoção da fase aquosa (superior), transferindo-a para tubo limpo, onde se adicionou clorofórmio/álcool isoamílico (1:1). Agitou-se por, no mínimo, 10 seg. realizando-se nova centrifugação em microcentrifuga, transferindo-se a fase aquosa para outro tubo limpo.
- c) Para a precipitação do DNA, adicionou-se à fase aquosa acetato de sódio 3M, pH 6,0 (10% do volume da amostra-concentração final 0,3M) e etanol 100%, gelado (2,5x o volume da amostra-concentração final 70%). Misturou-se por inversão, incubando-se no freezer a -70°C, por pelo menos 1 hora.
- d) Centrifugação por 20 min à baixa temperatura. Aspiração do etanol com pipeta de vidro fina acoplada ao aspirador, secando-se em bomba de vácuo.
- e) Ressuspensão em 50 µl de tampão TE (10mM Tris-HCL, pH 7.4, 1mM EDTA), misturando-se em *vortex* por 2 min.

4.2.5.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Previamente à realização da PCR com iniciadores específicos para o HPV, a viabilidade do DNA foi testada por meio de outra PCR e amplificação de um segmento do gene da beta-globina (100pb), utilizando-se iniciadores para PCO3 e G74 (BAUER et al. 1991). A reação foi padronizada da seguinte maneira:

Iniciadores: PCO3: 5'- ACACA ACTGTGTGTTCACTAGC-3'

G74: 3'- CAACTTCATCCACGTTAC-5'

Concentrações dos reagentes (Perkin Elmer, New Jersey, USA):

50mM KCL

10mM TRIS-HCL (pH 8,5)

200µM de cada dNTP

2,5U de Taq Polimerase (Cenbiot, RS, Brasil)

50nM de cada primer

1,5 mM de Cloreto de Magnésio

Volume de DNA aplicado: 1, 3 ou 6µl

Volume final por tubo: 50 µl

Número de ciclos:40

Desnaturação: 95°C- 1 min.

Anelamentos: 55°C- 1 min.

Extensão: 72°C- 2 min (último ciclo-7min)

Para a amplificação de um fragmento de 140pb do gene L1 do HPV utilizaram-se iniciadores GP5+/GP6+ (HUSMAN et al. 1995). As condições utilizadas para essa PCR foram as seguintes:

Iniciadores: GP5+: 5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3'
GP6+: 3'-CTTATACTAAATGTCAAATAAAAAG-5'

Concentrações dos reagentes (Perkin Elmer, New Jersey, USA):

50mM KCL

10mM TRIS-HCL (pH 8,5)

200 μ M de cada dNTP

2,0U de Taq Polimerase (Cembiot, RS, Brasil)

50pM de cada primer

3,0 mM de Cloreto de Magnésio

Volume de DNA aplicado: 1, 3 ou 6 μ l

Volume final por tubo: 50 μ l

Número de ciclos:40

Desnaturação: 95°C- 1 min.

Anelamentos: 40°C- 1 min.

Extensão: 72°C- 1,5 min (último ciclo-4min)

4.2.5.2 Análise dos produtos amplificados

Para análise dos produtos amplificados foram utilizados géis de poliacrilamida a 7%, corados pela prata, cuja confecção seguiu as seguintes etapas:

Solução Acrilamida:bisacrilamida 30% (29:1)-3,5ml

Água MilliQ-9,9ml

BTE 10x pH8,3 (Tris-borato-EDTA)- 1,5ml

APS 10% (Persulfato de amônio) - 150 μ l

TEMED 0,1%-15 μ l

Volume final para dois géis- 15ml.

O tampão de amostra utilizado é composto de azul de bromofenol e xilenocianol à 0,25% cada e ficoll 15% (SAMBROOK e FRITSCH, 1989). O tampão da corrida foi o BTE1x e a voltagem utilizada variou de 50 a 100V. Para a visualização dos resultados utilizou-se a técnica de impregnação argêntica (SANGUINETTI et al. 1994), conforme descrito abaixo:

Fixador: Etanol 10%; ac. Acético 0,5%

Corante: Nitrato de prata (AgNO_3) 0,2%

Revelador: NaOH 0,75M e formaldeído 0,1M

- a) Colocou-se o gel no fixador por, no mínimo, 2 min, agitando.
- b) Adicionou-se o corante por 10 min, sob agitação suave.
- c) Lavou-se com água MilliQ duas vezes, adicionando-se o revelador e agitando-se por tempo suficiente
- d) Colocou-se no fixador novamente

Montou-se em placa de vidro envolto em celofane, deixando-se secar a temperatura ambiente.

Exemplos de gel de poliacrilamida contendo os produtos de PCR para o gene da β -Globina e gene L1 do HPV são apresentados nas figuras 11 e 12, respectivamente.

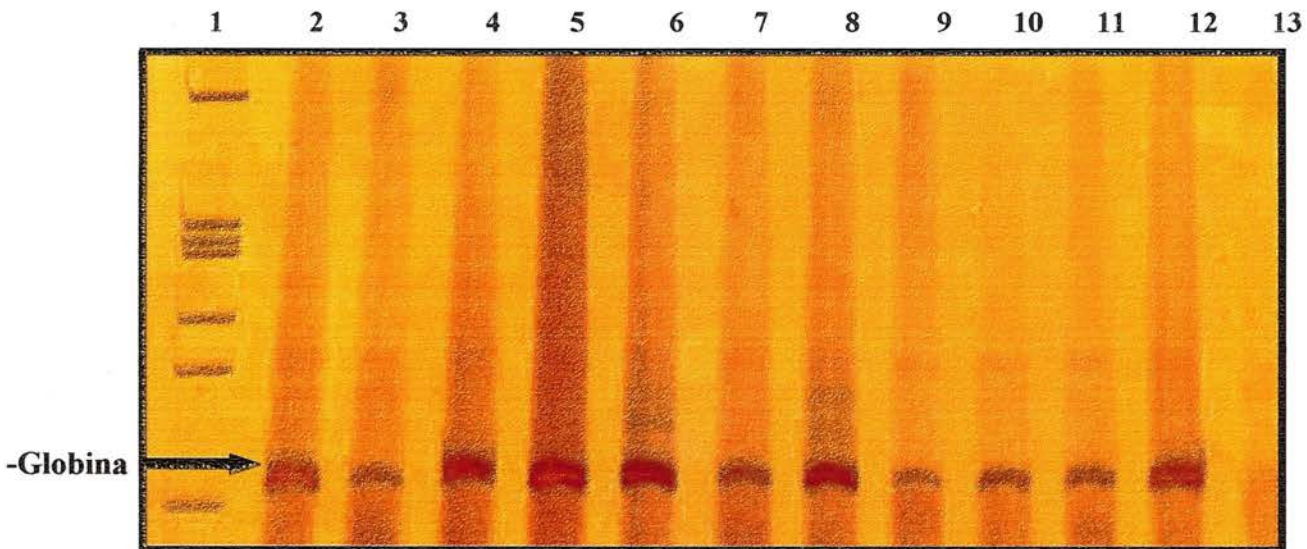


Figura 11. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7%, corado por nitrato de prata, contendo os produtos de PCR (130 pares de bases) do gene da β -Globina de diversos casos (amostras 2-12) e controle negativo (amostra 13 – mistura de todos os reagentes sem adição do DNA). A canaleta 1 mostra o marcador de peso molecular.

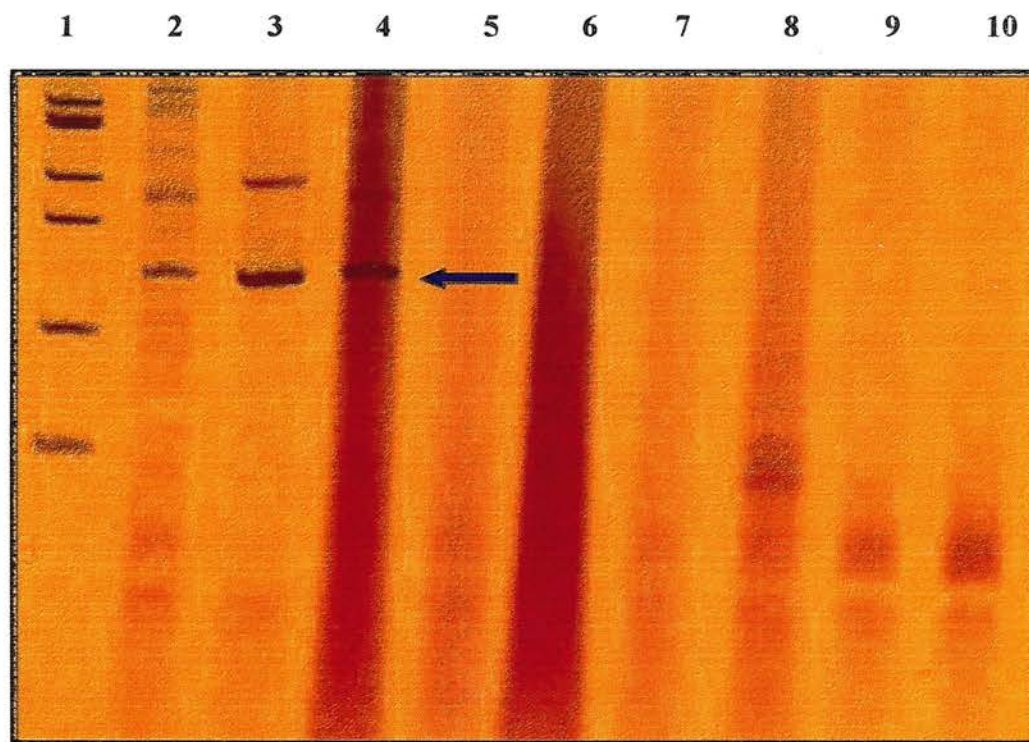


Figura 12. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7%, corado por nitrato de prata, representando os produtos da PCR realizada com iniciadores GP5 e GP6. A amostra 4 é positiva para HPV (seta) e as amostras 5 a 8 são negativas. As amostras 2 (SiHa) e 3 (Hela) são controles positivos, enquanto as amostras 9 (DNA de linhagem celular humana, HPV-negativa) e 10 (mistura de todos os reagentes sem adição de DNA) são controles negativos. Na canaleta 1 está o marcador de peso molecular (DNA de bacteriófago ØX174, digerido com Hae III)

4.2.5.3 Hibridização *dot blot*

Os produtos amplificados a partir dos iniciadores genéricos foram tipados por hibridização *dot blot*. Estes produtos foram hibridizados com as seguintes sondas de HPV (isoladamente ou em coquetéis), marcadas pelo fósforo radioativo (P^{32}): 6,11,16,18,31,33,34,35,39,40,42,43,44,45,51,52,54,56,58.

Em cada membrana utilizou-se, além dos controles positivos e negativos dos produtos da PCR, controles para diferentes tipos de HPV, provenientes de ampliações por PCR de plasmídios e amostras clínicas, como segue:

- Plasmídios: contendo o genoma completo dos HPVs tipo 6,11,16,18,31,33,39,42,45,54,55, HeLa (linhagem celular derivada de carcinoma do colo do útero, apresentando 20-40 cópias de HPV18/célula) e SiHa (linhagem celular derivada de carcinoma do colo do útero, apresentando 1-2 cópias de HPV16/célula)
- Amostras clínicas, cujo tipo de HPV foi previamente determinado.

A hibridização seguiu as seguintes etapas:

- a) Desnaturação de 8µl do produto da reação de PCR com solução NaOH 1,6N, EDTA 0,1M. Dos controles, foram utilizados 2 e 5µl, respectivamente. Pipetou-se a mistura sobre uma membrana de nylon ajustada a uma *dot machine*, com vácuo ligado constantemente. As posições das amostras foram marcadas. As membranas, então, foram removidas e deixadas para secar sob papel de filtro.
- b) Para fixação do DNA, as membranas foram expostas à luz ultravioleta por 5 min.
- c) As membranas foram umedecidas com solução 2xSSC e colocadas em um saco plástico com 5ml da solução 6xSSC, 10x Denhardt's, 0,5% SDS e 100µg/ml de esperma de salmão desnaturado, sendo em seguida incubadas a 55°C por 3 horas (pré-hibridização).

- d) Adicionaram-se as sondas radioativas à solução anterior, permanecendo incubadas a mesma temperatura, por 12 a 24 horas (hibridização).
- e) Lavaram-se as membranas com solução 3xSSC, 0,5%SDS, em três etapas: a primeira, por 10 min. à temperatura ambiente; as outras duas, por 30 min cada, a 55°C.
- f) As membranas foram expostas a filme RX, por 18 a 36 horas a -70°C.

A hibridização foi verificada, após a revelação do filme, pela presença de pontos escuros no local correspondente às amostras adicionadas à membrana, conforme gabarito (figura 13).

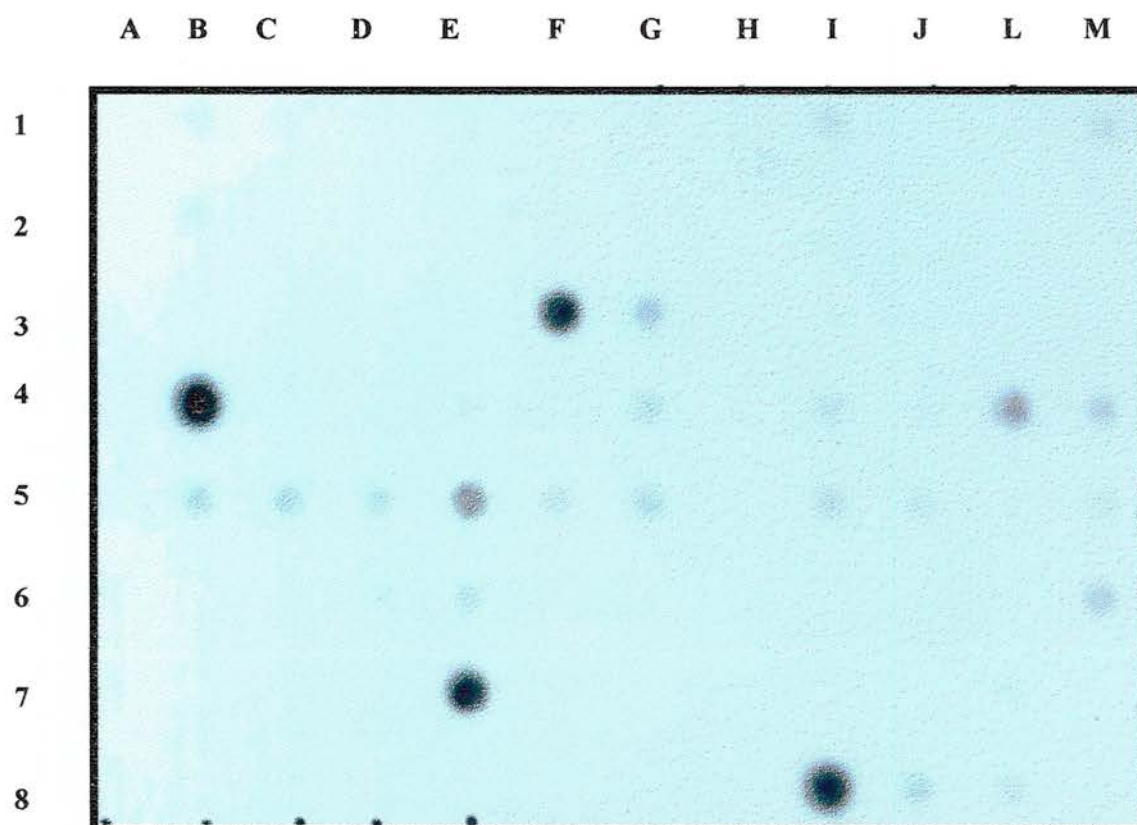


Figura 13. Autoradiograma de membrana submetida à hibridização em pontos com sonda específica para HPV16. As amostras B4 e F3 correspondem a 2 casos de câncer de pênis positivos. As amostras E7 (plasmídeo contendo o genoma completo do HPV 16) e I8 (SiHa – linhagem derivada de carcinoma cervical, HPV16-positiva) são controles positivos. As membranas foram preparadas adicionando-se a cada ponto produtos de PCR oriundos dos casos (posições A1 – M6). Nas demais posições entre A7 e L8 foram colocados os controles positivos para HPVs dos tipos 6,18,31,33,35,39,42,45,51,52,53,54,55,56,58.

4.2.5.4 Critérios de positividade para HPV

Os casos foram considerados HPV positivos quando observou-se um produto do tamanho esperado, representado por uma banda na mesma altura do controle positivo no gel de poliacrilamida após PCR por iniciadores genéricos e/ou havia um sinal indiscutível na hibridização *dot blot*.

4.2.6 Recorrência da neoplasia

A expressão “recorrência da neoplasia” foi utilizada neste estudo para indicar recidiva local, regional ou metástases à distância. As recidivas locais foram aquelas que aconteceram no coto peniano e/ou nos tecidos adjacentes à região do pênis amputado, enquanto que as recidivas regionais ocorreram em local de esvaziamento prévio. Tumores recidivantes fora dessas regiões foram considerados como metástases à distância.

4.2.7 Critérios de seguimento dos pacientes

O acompanhamento dos pacientes foi realizado em consultas ambulatoriais, mensais no primeiro semestre após a cirurgia e bimestrais no segundo semestre. Do segundo ao terceiro anos as consultas foram trimestrais e, a partir do terceiro ano, anuais. As avaliações periódicas incluíam sistemático exame clínico loco-regional. Radiografias de tórax foram feitas anualmente ou na vigência de quaisquer queixas respiratórias.

Segundo o seguimento, os pacientes foram classificados nas seguintes categorias:

- a) Vivos sem câncer.
- b) Óbito pelo câncer ou por complicações do tratamento, incluindo óbito pós-operatório (até 30 dias após a cirurgia).
- c) Óbito por outras causas.
- d) Perdidos no seguimento.

4.2.8 Análise estatística

Para arquivo e registro das informações coletadas foi criado um banco de dados específico utilizando-se o programa Excel 7.0, cujas principais variáveis estão demonstradas no anexo 2. Posteriormente as informações foram exportadas para o programa SPSS for windows, versão 8.0, onde foi realizado todo o estudo estatístico.

A mensuração das variáveis quantitativas foi expressa pelas médias e desvios padrões. A associação entre as variáveis qualitativas foi avaliada através do teste do Chi-quadrado em tabelas de contingência de dupla entrada. Sempre que necessário, devido às frequências menores do que 5 ou ao pequeno tamanho da amostra analisada, utilizou-se o teste exato de Fisher. Para análise das diferenças entre médias utilizou-se o teste t de Student. Foi aceito um $p < 0,05$ (95%) como critério para rejeição da hipótese de nulidade.

Para estudar o efeito isolado das variáveis sobre o prognóstico, os dados foram medidos em termos de sobrevida específica por doença, caracterizada pelo tempo em dias decorrido entre a cirurgia do tumor primário e o óbito pelo câncer ou última data de seguimento. O cálculo dos estimadores de sobrevida foi feito pela técnica de KAPLAN E MEIER (1958). Comparações entre distribuições de sobrevida para categorias de uma mesma variável foram feitas pelo teste de Log-Rank.

Para análise multivariada utilizou-se o modelo de riscos proporcionais de Cox (COX 1972), avaliando-se os riscos relativos de óbito em relação à presença do DNA do HPV e aos fatores anatomopatológicos do tumor primário estudados.

RESULTADOS

5 Resultados

5.1 Aspectos clínicos

A idade dos 82 pacientes variou de 27 a 77 anos (média 51,9; dp12,7). Treze (15,9%) apresentavam idade inferior a 40 anos, enquanto 69 (84,1%) tinham mais de 40 anos; sessenta (73,2%) eram brancos e 22 (26,8%) não brancos.

Considerando 56 pacientes em que havia informação sobre o estado civil, 45 (80,4%) eram casados e 11 (19,6%) não casados (solteiros, separados, viúvos). História prévia de doenças venéreas foi referida por 22 (26,8%) pacientes; treze (15,9%) negavam doenças venéreas e não havia essa informação em 47 (57,3%) casos.

Setenta (85,4%) pacientes não tinham passado cirúrgico de postectomia. Em 10 (12,2%) casos a postectomia tinha sido realizada já em decorrência do tumor do pênis e em 2 casos (2,4%) havia história de realização desse procedimento não relacionado à neoplasia. Sessenta e sete (81,7%) pacientes apresentaram-se à primeira consulta com o tumor do pênis intacto, enquanto 15 (18,3%) já tinham sido biopsiados previamente.

A principal queixa referida pelos pacientes foi a presença de ferida no pênis. Noventa e um (98,7%) pacientes relataram esse sintoma associado com dor, inflamação local, disúria e prurido; em 35 (42,7 %) casos o ferimento peniano foi a única queixa. O tempo de evolução da doença variou de 1 a 240 meses (média 14,7; dp 30,1).

De acordo com o estadiamento cTNM (1978), 19 (23,2%) pacientes apresentaram T2, 54 (65,9%) T3, 6 (7,3%) T4 e 1(1,2%) Tx. A classificação N0, N1, N2 e N3 foi atribuída a 32 (39,0%), 10 (12,2%), 27 (32,9%) e 11 (13,4%) pacientes, respectivamente. Em 2 (2,4%) casos não havia informação sobre o estadiamento.

A frequência de todas as variáveis clínicas e anatomopatológicas estudadas é demonstrada nas tabelas 2 e 3. A tabela 4 apresenta a distribuição dos pacientes conforme o estadiamento clínico do tumor primário e dos linfonodos regionais.

Tabela 2. Frequência das variáveis clínicas em 82 pacientes

Variável	Número de pacientes	%
Idade		
Até 40	13	15,9
> 40	69	84,1
Estado civil		
Casados	45	54,9
Não casados	11	13,4
Sem informação	26	31,7
Raça		
Branca	60	73,2
Não branca	22	26,8
Tempo de evolução da doença		
Até 6 meses	40	48,8
> 6 meses	42	51,2
Antecedentes venéreos		
Não	13	15,9
Sim	22	26,8
Sem informação	47	57,3
Estadiamento cT		
T1	0	0,0
T2	19	23,2
T3	54	65,9
T4	6	7,3
Tx	1	1,2
Sem informação	2	2,4
Estadiamento cN		
N0	32	39,0
N1	10	12,2
N2	27	32,9
N3	11	13,4
Sem informação	2	2,4
Cirurgia do tumor primário		
Ressecção local	1	1,2
Amputação parcial	24	29,3
Amputação total	57	69,5

Tabela 3. Frequência das variáveis anatomopatológicas do tumor primário nos 82 pacientes

Variável	Nº de pacientes	%
Grau de diferenciação		
I	60	73,2
II	21	25,6
III	1	1,2
Espessura do tumor		
1 a 5mm	20	24,4
>5mm	60	73,2
indeterminada	2	2,4
Permeação linfática		
Ausente	28	34,1
Presente	49	59,8
Indeterminada	5	6,1
Embolização venosa		
Ausente	59	72,0
Presente	17	20,7
Indeterminada	6	7,3
Infiltração de corpos cavernosos		
Ausente	39	47,6
Presente	28	34,1
Indeterminada	15	18,3
Infiltração de uretra		
Ausente	30	36,6
Presente	24	29,3
Indeterminada	28	34,1
Infiltrado mononuclear		
Não	3	3,6
Leve	29	35,4
Moderada	29	35,4
Acentuada	20	24,4
Indeterminada	1	1,2
Infiltrado eosinofílico		
Não	38	46,3
Leve	25	30,5
Moderada	10	12,2
Acentuada	8	9,8
Indeterminada	1	1,2
Coilocitose		
Presente	41	50,0
Ausente	40	48,8
Indeterminada	1	1,2

Tabela 4. Número e porcentagem de pacientes segundo estadiamento clínico T e N.

Estádio clínico T	Estádio clínico N					Total n°(%)
	N0 n°(%)	N1 n°(%)	N2 n°(%)	N3 n°(%)	Sem informação	
T1	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	-	0 (100)
T2	14 (17,0)	2 (2,4)	3 (3,6)	0 (0,0)	-	19 (100)
T3	17 (20,7)	7 (8,5)	20 (24,3)	10 (12,1)	-	54 (100)
T4	1 (1,2)	1 (1,2)	3 (3,6)	1 (1,2)	-	6 (100)
Tx	-	-	1 (1,2)	-	-	1 (100)
Sem informação	-	-	-	-	2 (2,4)	2 (100)
Total	32 (39,0)	10 (12,2)	27 (32,9)	11 (13,4)	2 (2,4)	82 (100)

5.2 Aspectos cirúrgicos

Vinte e quatro (29,3%) pacientes submeteram-se à amputação parcial e 57 (69,5%) à amputação total do pênis. Excisão ampla do tumor foi realizada em 1 (1,2%) paciente. Os esvaziamentos inguinal e ilioinguinal bilateral foram realizados em 26 (31,7%) e 56 (68,3%) pacientes, respectivamente. Foram dissecados um total de 2418 linfonodos (média 29,5; dp13,5), variando de 4 a 85 por paciente. Quarenta e dois (51,2%) pacientes apresentavam metástases linfonodais enquanto os restantes 40 (48,8%) tinham linfonodos livres de neoplasia. Houve um total de 124 linfonodos metastáticos (média 2,95; dp 1,95), com variação de 1 a 9 por paciente. A frequência de pacientes de acordo com o número de linfonodos metastáticos é demonstrada na tabela 5.

Tabela 5. Número e porcentagem de pacientes segundo número de linfonodos metastáticos

Nº de pacientes (%)	Nº de linfonodos Metastáticos
11 (26,2)	1
9 (21,4)	2
9 (21,4)	3
6 (14,3)	4
4 (9,5)	5
2 (4,8)	9
1 (2,4)	6

O número e porcentagem dos linfonodos dissecados e metastáticos, de acordo com o tipo de esvaziamento, é demonstrado na tabela 6.

Tabela 6. Número e porcentagem de linfonodos, segundo tipo de esvaziamento linfonodal

Tipo de esvaziamento	Linfonodos dissecados		Linfonodos metastáticos	
	nº	(%)	nº	(%)
Inguinal	516	(21,3)	16	(13,0)
Ilioinguinal	1902	(78,7)	108	(87,0)
Total	2418	(100)	124	(100)

Considerando 35 pacientes nos quais havia informação sobre a lateralidade dos linfonodos metastáticos, observou-se que 14 (40%) pacientes apresentavam metástases unilaterais e 21(60%) bilaterais.

Um total de 20 pacientes apresentavam informação sobre o nível dos linfonodos metastáticos. O comprometimento inguinal, inguinal associado com ilíaco e ilíaco isoladamente foi de 80%, 15% e 5%, respectivamente (tabela 7).

Tabela 7. Número e porcentagem de pacientes segundo o nível dos linfonodos metastáticos

Níveis	Nº de pacientes (%)
Inguinal	16 (80)
Ílioinguinal	3 (15)
Ilíaco	1 (5)
Total	20 (100)

Complicações pós-operatórias relacionadas às amputações ocorreram em 25 (30,5%) pacientes, sendo a estenose uretral a mais frequente (19 casos, 23,2%). Em relação às linfadenectomias, houve complicações pós-operatórias em 74 (90,2%) casos, sendo as mais frequentes a associação de infecção, necrose e deiscência dos retalhos dermogordurosos, presentes em 39 (47,5%) pacientes. Houve 6 (7,3%) casos de ruptura de vasos femurais e 28 (34,1%) pacientes evoluíram com linfedema de membros inferiores, geralmente associados à infecção e deiscência dos retalhos de pele. As tabelas 8 e 9 mostram o número e percentual de pacientes que apresentaram complicações pós-operatórias.

Tabela 8. Número e porcentagem de pacientes segundo complicações pós-operatórias relacionadas às amputações do pênis.

Complicações	Pacientes n°(%)
Sem complicações	57 (69,5)
Estenose de uretra	19 (23,2)
Deiscência	2 (2,4)
Infecção	1 (1,2)
Hemorragia	1 (1,2)
Infecção e deiscência	1 (1,2)
Infecção, deiscência e estenose	1 (1,2)
Total	82 (100)

Tabela 9. Número e porcentagem de pacientes segundo complicações pós-operatórias relacionadas às linfadenectomias.

Complicações	Pacientes n° (%)
Infecção, necrose e deiscência	39 (47,5)
Linfedema associado à infecção e necrose de pele	23 (28,0)
Ruptura de vasos (associado à infecção e necrose de pele)	6 (7,3)
Linfedema (isolado)	5 (6,1)
Infecção (isolada)	1 (1,2)
Sem complicações	8 (9,8)
Total	82 (100)

5.3 Aspectos anatomopatológicos e presença do DNA do HPV no tumor primário

Foi detectada a presença do DNA do HPV no tumor do pênis em 25 (30,5%) pacientes. Nos restantes 57 (69,5%) pacientes essa análise foi negativa. A frequência dos tipos de HPV detectados é demonstrada na tabela 10.

Tabela 10. Frequência dos tipos de HPV em 25 pacientes

Tipo de HPV	nº de casos	%
16	13	52
18	4	16
31/33/35 ^a	3	12
6/11 ^a	2	8
16/18 ^b	1	4
45	1	4
51/52 ^a	1	4
Total	25	100

a. Sondas testadas conjuntamente; b. Amostras contendo os dois tipos de HPV

As médias de idade do grupo de pacientes HPV negativo (52,7; dp 11,9) e HPV positivo (50,3; dp14,6) foram semelhantes ($p=0,440$). O presença do HPV, por outro lado, foi significativamente associado com faixa etária e estado civil. Nos pacientes abaixo de 40 anos ($p=0,046$) e casados ($p=0,025$) houve maior detecção do DNA viral (tabela 11). Houve também significância estatística entre a presença do DNA do HPV e a ausência de permeação linfática ($p=0,007$) (tabela 12). Na análise multivariada, após ajuste por idade, apenas a associação entre a presença do HPV e a permeação linfática permaneceu significativa (OR 0,27; IC [0,10; 0,75]), mostrando uma menor frequência de permeação linfática nos pacientes portadores do vírus.

Tabela 11. Associação entre a presença do DNA do HPV no tumor primário com variáveis clínicas.

Variável	Categoria	DNA do HPV		p(X ²)
		Ausente (%)	Presente (%)	
Idade	Até 40	6 (46,2)	7 (53,8)	0,046
	> 40	51 (73,9)	18 (26,1)	
Estado civil ^a	Casado	30 (66,7)	15 (33,3)	0,025
	Outros	11 (100)	0 (0,0)	
Raça	Branca	42 (70,0)	18 (30,0)	0,874
	Não branca	15 (68,2)	7 (31,8)	
Tempo de evolução	Até 6 meses	27 (67,5)	13 (32,5)	0,699
	> 6 meses	30 (71,4)	12 (28,6)	
Antecedentes venéreos ^a	Não	9 (69,2)	4 (30,8)	0,948
	Sim	15 (68,2)	7 (31,8)	
Estadiamento cT ^a	T2	14 (73,7)	5 (26,3)	0,758
	T3 + T4	42 (70,0)	18 (30,0)	
Estadiamento cN ^a	N0	20 (62,5)	12 (37,5)	0,353
	N1	8 (80,0)	2 (20,0)	
	N2	22 (81,5)	5 (18,5)	
	N3	7 (63,6)	4 (36,4)	
Cirurgia do tumor ^b	Amputação parcial	13 (54,2)	11 (45,8)	0,058
	Amputação total	43 (75,4)	14 (24,6)	

a.Foram excluídos os casos sem informação b.Foi excluído 1 caso de excisão ampla do tumor

Tabela 12. Associação entre a presença do DNA do HPV no tumor primário com variáveis anatomopatológicas.

Variável	Categoria	DNA do HPV		p(X ²)
		Ausente (%)	Presente (%)	
Grau de diferenciação ^a	Grau I	38 (63,3)	22 (36,7)	0,056
	Grau II	18 (85,7)	3 (14,3)	
Espessura do tumor ^b	Entre 1 e 5mm	11 (55,0)	9 (45,0)	0,126
	> 5 mm	44 (73,3)	16 (26,7)	
Permeação linfática ^b	Ausente	14 (50,0)	14 (50,0)	0,007
	Presente	39 (79,6)	10 (20,4)	
Embolização venosa ^b	Ausente	40 (67,8)	19 (32,2)	0,827
	Presente	12 (70,6)	5 (29,4)	
Infiltração de corpos cavernosos ^b	Ausente	24 (61,5)	15 (38,5)	0,247
	Presente	21 (75,0)	7 (25,0)	
Infiltração de uretra ^b	Ausente	21 (70,0)	9 (30,0)	0,684
	Presente	18 (75,0)	6 (25,0)	
Infiltrado mononuclear ^b	Ausente	2 (66,7)	1 (33,3)	0,781
	Leve	21 (72,4)	8 (27,6)	
	Moderado	21 (72,4)	8 (27,6)	
	Acentuado	12 (60,0)	8 (40,0)	
Infiltrado eosinofílico ^b	Ausente	28 (73,7)	10 (26,3)	0,687
	Leve	15 (60,0)	10 (40,0)	
	Moderado	7 (70,0)	3 (30,0)	
	Acentuado	6 (75,0)	2 (25,0)	
Coilócitos ^b	Ausente	29 (72,5)	11 (27,5)	0,678
	Presente	28 (68,3)	13 (31,7)	

a. Foi excluído 1 caso de grau III; b. Foram excluídos todos os casos em que a variável estudada foi definida como "indeterminada" .

A relação entre a presença de coilocitose no tumor primário e a detecção do DNA do HPV é demonstrada na tabela 13.

Tabela 13. Relação entre a presença de coilocitose e detecção do DNA do HPV

Coilocitose	DNA do HPV		Total
	Presente n° de pacientes (%)	Ausente n° de pacientes (%)	
Presente	13 (31,7)	28 (68,3)	41 (100)
Ausente	11 (27,5)	29 (72,5)	40 (100)
Indeterminada ^a	1 (100)	0 (0,0)	1 (100)
Total	25 (30,5)	57 (69,5)	82 (100)

a. O paciente com coilocitose não determinada foi excluído da análise estatística

Sensibilidade= 54,2% ; Especificidade= 50,8%

Valor preditivo positivo= 31,7%; Valor preditivo negativo= 72,5%

Considerando-se os casos HPV positivos, houve 18 pacientes que apresentaram os tipos 16 e/ou 18. Houve associação entre a presença dos HPV 16 e/ou 18 com estado civil ($p=0,036$), tipo de cirurgia do tumor primário ($p=0,031$) e permeação linfática ($p=0,002$). Na análise multivariada, após ajuste por idade, apenas a associação com permeação linfática permaneceu significativa (OR 0,19; IC [0,06-0,60]). A relação desses tipos de HPV com variáveis clínicas e anatomopatológicas está demonstrada nas tabelas 14 e 15, tendo sido excluídos os casos positivos para HPV 6/11,45,31/33/35 e 51/52.

Tabela 14. Associação entre a presença do DNA dos HPVs 16 e/ou 18 no tumor primário com variáveis clínicas

Variável	Categoria	DNA do HPV16,18		p(X ²)
		Ausente (%)	Presente(%)	
Idade	Até 40	6 (60,0)	4 (40,0)	0,203
	> 40	51 (77,3)	14 (21,5)	
Estado civil ^a	Casado	30 (68,2)	13 (30,2)	0,036
	Outros	11 (100,0)	0 (0)	
Raça ^a	Branca	42 (77,8)	12 (22,2)	0,563
	Não branca	15 (71,4)	6 (28,6)	
Tempo de evolução	Até 6 meses	27 (75,0)	9 (25,0)	0,846
	> 6 meses	30 (76,9)	9 (23,1)	
Antecedentes venéreos ^a	Não	9 (75,0)	3 (25,0)	1,000
	Sim	15 (75,0)	5 (25,0)	
Estadiamento cT ^a	T2	14 (77,8)	4 (22,2)	0,902
	T3 +T4	42 (76,4)	13 (23,6)	
Estadiamento cN ^a	N0	20 (64,5)	11 (35,5)	0,173
	N1	8 (80,0)	2 (20,0)	
	N2	22 (88,0)	3 (12,0)	
	N3	7 (87,5)	1 (12,5)	
Cirurgia do tumor ^b	Amputação parcial	13 (59,1)	9 (40,9)	0,031
	Primário Amputação total	43 (82,7)	9 (17,3)	

a.Foram excluídos os casos sem informação; b.Foi excluído 1 caso de excisão ampla do tumor

Tabela 15. Associação entre a presença do DNA do HPV 16 e/ou 18 e variáveis anatomopatológicas do tumor primário

Variável	Categoria	DNA do HPV 16 e18		p(X ²)
		Ausente (%)	Presente(%)	
Grau de diferenciação ^a	Grau I	38 (70,4)	16 (29,6)	0,080
	Grau II	18 (90,0)	2 (10,0)	
Espessura do tumor ^b	Entre 1 e 5mm	11 (61,1)	7 (38,9)	0,107
	> 5 mm	44 (80,0)	11 (20,0)	
Permeação linfática ^b	Ausente	14 (53,8)	12 (46,2)	0,002
	Presente	39 (86,7)	6 (13,3)	
Embolização venosa ^b	Ausente	40 (72,7)	14 (25,9)	0,941
	Presente	12 (75,0)	4 (25,0)	
Infiltração de corpos cavernosos ^b	Ausente	24 (68,6)	11 (31,4)	0,284
	Presente	21 (80,8)	5 (19,2)	
Infiltração de uretra ^b	Ausente	21 (75,0)	7 (25,0)	0,785
	Presente	18 (78,3)	5 (21,7)	
Infiltrado mononuclear ^b	Ausente	2 (100)	0 (0,0)	0,162
	Leve	21 (87,5)	3 (12,5)	
	Moderado	21 (75,0)	7 (25,0)	
	Acentuado	12 (60,0)	8 (40,0)	
Infiltrado eosinofílico ^b	Ausente	28 (80,0)	7 (20,0)	0,789
	Leve	15 (68,2)	7 (31,8)	
	Moderado	7 (77,8)	2 (22,2)	
	Acentuado	6 (75,0)	2 (25,0)	
Coilócitos ^b	Ausente	29 (76,3)	8 (21,6)	0,634
	Presente	28 (73,7)	10 (26,3)	

a. Foi excluído 1 caso de grau III; b. Foram excluídos todos os casos em que a variável estudada foi definida como " indeterminada" ;

A associação de variáveis clínicas, anatomopatológicas e presença do HPV com metástases para linfonodos regionais está expressa nas tabelas 16 e 17. O estadiamento clínico N ($p=0,045$), permeação linfática ($p<0,001$) e embolização venosa ($p=0,040$) associaram-se com maior incidência de metástases linfonodais. Através de análise multivariada, a permeação linfática (OR=10,82; IC [2,68-43,59]), o estadiamento clínico N1 (OR=11,47; IC [1,50-87,64] e N3 (OR=7,23; IC [1,10-47,26]) foram fatores independentes de risco para o comprometimento metastático dos linfonodos (tabela 18). Não houve associação da presença do HPV com metástases linfonodais ($p=0,386$).

Tabela 16. Associação entre variáveis clínicas e metástases linfonodais

Variável	Categoria	Metástases linfonodais		p(X^2)
		Ausente (%)	Presente (%)	
Idade	Até 40	6 (46,2)	7 (53,8)	0,836
	> 40	34 (49,3)	35 (50,7)	
Estado civil ^a	Casado	23 (51,1)	22 (48,9)	0,380
	Outros	4 (36,4)	7 (63,6)	
Raça	Branca	27 (45,0)	33 (55,0)	0,258
	Não branca	13 (59,1)	9 (40,9)	
Tempo de evolução	Até 6 meses	18 (45,0)	22 (55,0)	0,504
	> 6 meses	22 (52,4)	20 (47,6)	
Antecedentes venéreos ^a	Não	5 (38,5)	8 (61,5)	0,686
	Sim	10 (45,5)	12 (54,5)	
Estadiamento cT ^a	T2	10 (52,6)	9 (47,4)	0,744
	T3 + T4	29 (48,3)	31 (51,7)	
Estadiamento cN ^a	N0	20 (62,5)	12 (37,5)	0,045
	N1	3 (30,0)	7 (70,0)	
	N2	14 (51,9)	13 (48,1)	
	N3	2 (18,2)	9 (81,8)	
Cirurgia do tumor ^b	Amputação parcial	10 (41,7)	14 (58,3)	0,449
	Amputação total	29 (50,9)	28 (49,1)	

a. Foram excluídos os casos sem informação b. Foi excluído 1 caso de excisão ampla do tumor

Tabela 17. Associação entre variáveis anatomopatológicas do tumor primário e presença do DNA do HPV com metástases linfonodais

Variável	Categoria	Metástases linfonodais		p(X ²)
		Ausente (%)	Presente (%)	
Grau de diferenciação ^a	Grau I	32 (53,3)	28 (46,7)	0,229
	Grau II	8 (38,1)	13 (61,9)	
Espessura do tumor ^b	Entre 1 e 5mm	13 (65,0)	7 (35,0)	0,121
	> 5 mm	27 (45,0)	33 (55,0)	
Permeação linfática ^b	Ausente	22 (78,6)	6 (21,4)	<0,001
	Presente	17 (34,7)	32 (65,3)	
Embolização venosa ^b	Ausente	34 (57,6)	25 (42,4)	0,040
	Presente	5 (29,4)	12 (70,6)	
Infiltração de corpos ^b cavernosos	Ausente	21 (53,8)	18 (46,2)	0,239
	Presente	11 (39,3)	17 (60,7)	
Infiltração de uretra ^b	Ausente	15 (50,0)	15 (50,0)	0,542
	Presente	14 (58,3)	10 (41,7)	
Infiltrado mononuclear ^b	Ausente	2 (66,7)	1 (33,3)	0,471
	Leve	11 (37,9)	18 (62,1)	
	Moderado	16 (55,2)	13 (44,8)	
	Acentuado	11 (55,0)	9 (45,0)	
Infiltrado eosinofílico ^b	Ausente	17 (44,7)	21 (55,3)	0,613
	Leve	15 (60,0)	10 (40,0)	
	Moderado	4 (40,0)	6 (60,0)	
	Acentuado	4 (50,0)	4 (50,0)	
Coilócitos ^b	Ausente	17 (41,5)	24 (58,5)	0,223
	Presente	22 (55,0)	18 (45,0)	
DNA do HPV	Ausente	26 (45,6)	31 (54,4)	0,386
	Presente	14 (56,0)	11 (44,0)	
DNA do HPV 16, 18	Ausente	26 (45,7)	31 (54,3)	0,252
	Presente	11 (61,1)	7 (38,9)	

a. Foi excluído 1 caso de grau III ; b. Foram excluídos todos os casos em que a variável estudada foi definida como " indeterminada" .

Tabela 18. Fatores de risco na incidência de metástases linfonodais

Variável	Categoria	OR aj ^a	IC _{95%} (OR aj)	P
Permeação linfática	Não	1	-	
	Sim	10,82	2,68 - 43,59	<0,001
Estadiamento cN	NO	1	-	0,047
	N1	11,47	1,50 - 87,64	0,019
	N2	2,22	0,62 - 8,04	0,222
	N3	7,23	1,10 - 47,26	0,039

a. "Odds ratio" ajustada por idade.

5.4. Análise de sobrevida

O período de seguimento variou de 0,1 a 453 meses (média 88,7; dp 102,21); ao final, 16 (19,5%) pacientes estavam vivos sem doença, 24 (29,2%) morreram em decorrência da neoplasia ou de complicações do tratamento, 32 (39%) morreram de outras causas e 10 (12,2%) foram perdidos de vista.

A equivalência entre os grupos de pacientes perdidos no seguimento e aqueles com seguimento adequado é demonstrada nas tabelas 19 e 20. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias de idade, tempo de evolução da doença, total de linfonodos dissecados e total de linfonodos metastáticos nos dois grupos (tabela 19). Os dois grupos também são semelhantes no que se refere ao estadiamento T, tipo de cirurgia do tumor primário, além de presença de permeação linfática, embolização venosa e comprometimento metastático dos linfonodos (tabela 20).

Tabela 19. Análise das diferenças de médias entre os pacientes perdidos de vista e não perdidos de vista

Variável	Perdidos de vista	Não perdidos de vista	p ^a
	Média (dp)	Média (dp)	
Idade	51,4 (14,8)	52 (12,6)	0,883
Evolução	22,2 (35,2)	13,7 (29,5)	0,409
Total de linfonodos examinados	29,3 (13,3)	29,5 (13,7)	0,963
Total de linfonodos metastáticos	1,5 (1,8)	1,5 (2,7)	0,984

a. Teste t de Student.

Tabela 20. Análise de algumas variáveis qualitativas entre os pacientes perdidos de vista e não perdidos de vista

Variável	Categoria	Perdidos de vista		Não perdidos de vista		p(X ²)
		n	%	n°	%	
Estadiamento cT	2	-	-	19	27,0	0,235
	3	7	88	47	66,0	
	4	1	12	5	7,0	
Cirurgia do tumor primário	Amp. parcial	3	30	20	29,6	0,978
	Amp. total	7	70	50	70,4	
Permeação linfática	Ausente	4	40	24	35,8	0,798
	Presente	6	60	43	64,2	
Embolização Venosa	Ausente	7	70	52	78,8	0,534
	Presente	3	30	14	21,2	
Linfonodos metastáticos	Ausente	5	50	35	48,6	0,935
	Presente	5	50	37	51,4	

Considerando os 82 pacientes, as taxas de sobrevida global aos 5 e 10 anos foram de 50,7% e 43,2%, respectivamente (figura 14), enquanto que as taxas de sobrevida específica por doença aos 5 e 10 anos foram ambas de 68,7% (figura 15).

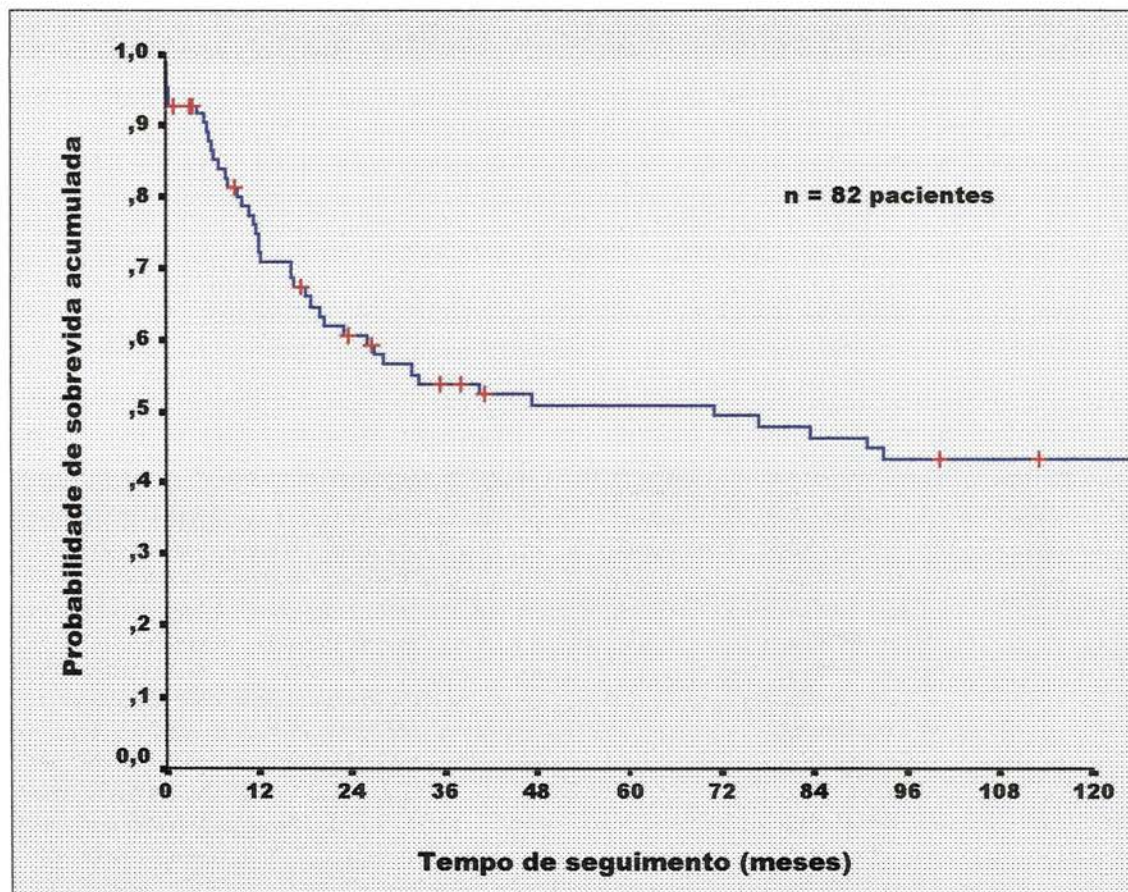


Figura 14. Curva atuarial de sobrevida global até 10 anos dos 82 pacientes portadores de carcinoma de pênis, não estratificada por nenhuma das variáveis estudadas.

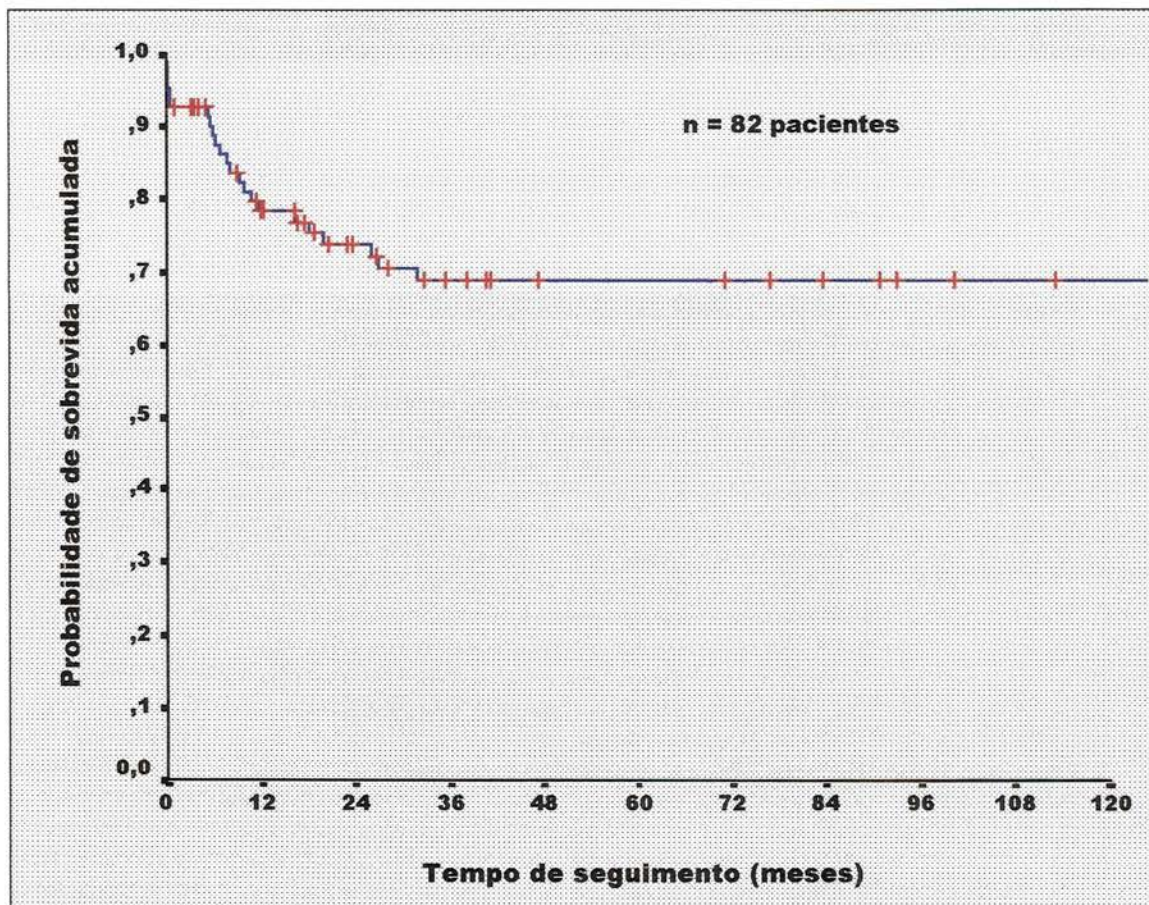


Figura 15. Curva atuarial de sobrevida específica por doença até 10 anos dos 82 pacientes portadores de carcinoma de pênis, não estratificada por nenhuma das variáveis estudadas

As taxas de probabilidade de sobrevida acumulada específica por doença até 5 e 10 anos foram ambas de 68,4% para os pacientes HPV negativos e de 69,1% para os pacientes HPV positivos ($p=0,830$), como demonstrado na figura 16. Considerando apenas a presença dos HPV 16 e/ou 18, essas taxas foram de 68,5% nos casos negativos e de 69,4% nos casos positivos ($p=0,689$) (figura 17)

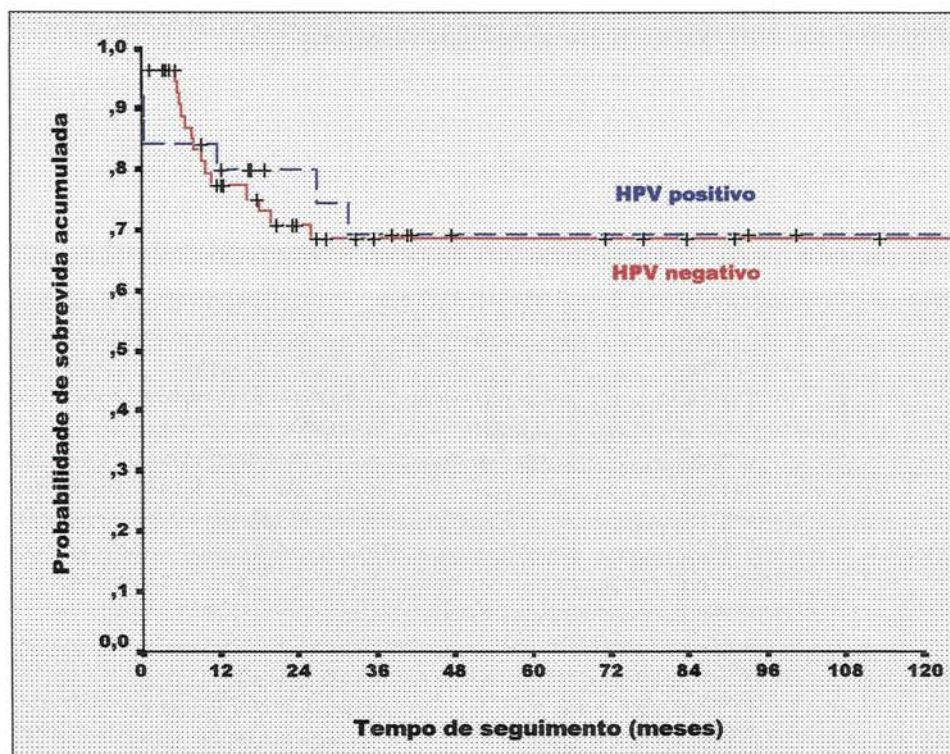


Figura 16. Curva atuarial de sobrevida específica por doença aos 5 e 10 anos dos 82 pacientes portadores de carcinoma do pênis , de acordo com a presença do HPV no tumor primário

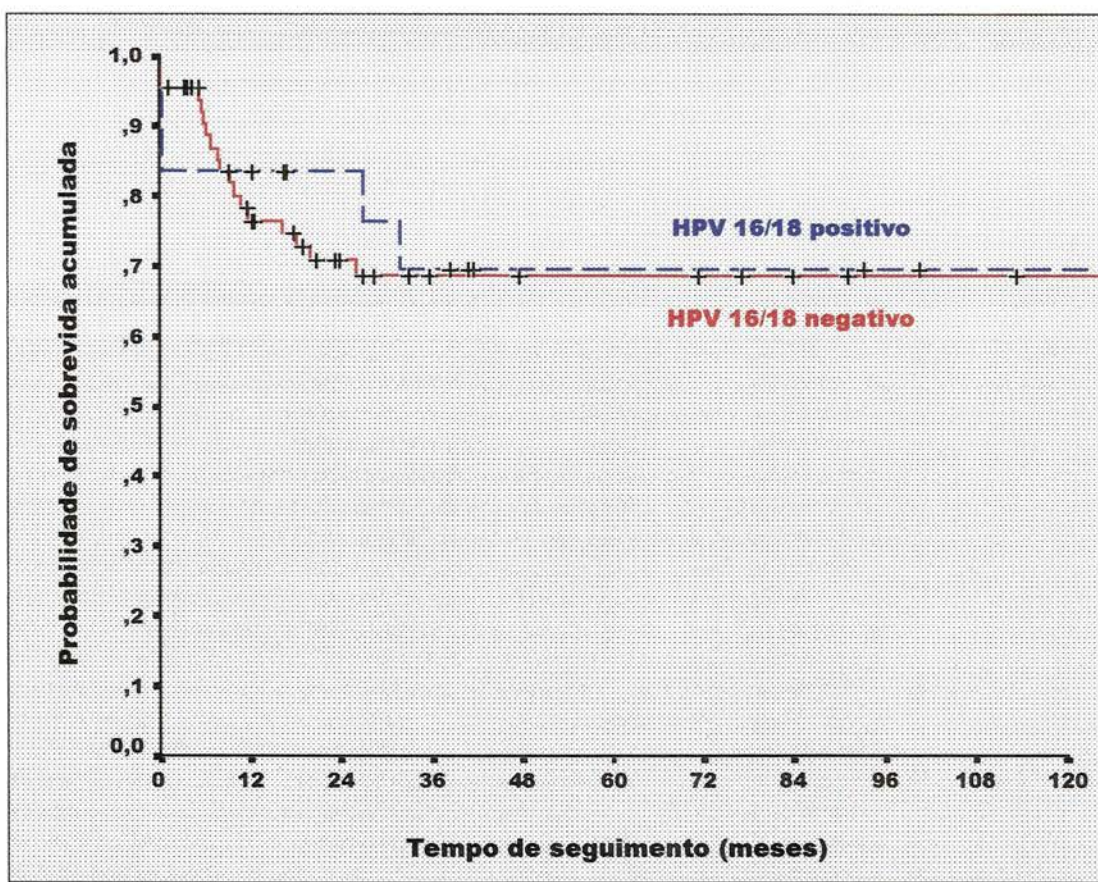


Figura 17. Curva atuarial de sobrevida específica por doença aos 5 e 10 anos dos 82 pacientes portadores de carcinoma do pênis, de acordo com a presença dos HPV 16 e/ou 18 no tumor primário

As sobrevidas específicas por doença aos 5 e 10 anos de acordo com as demais variáveis clínicas e anatomopatológicas estudadas estão demonstradas nas tabelas 21 e 22. O estadiamento cN ($p=0,032$), permeação linfática por células neoplásicas ($p=0,004$) e presença de linfonodos metastáticos ($p=0,0001$) foram os fatores que influenciaram a sobrevida através de análise univariada.

Tabela 21. Probabilidade acumulada de sobrevida específica por doença de acordo com variáveis clínicas.

Variável	Categoria	Nº pacientes %	Sobrevida específica por doença		p (log rank)
			5 anos	10 anos	
Idade	Até 40	13 (15,9)	88,8	88,8	0,071
	> 40	69 (84,1)	65,1	65,1	
Estado civil ^a	Casado	45 (80,4)	68,3	68,3	0,692
	Outros	11 (19,6)	58,3	58,3	
Raça	Branca	60 (73,2)	67,4	67,4	0,634
	Não branca	22 (26,8)	72,1	72,1	
Tempo de evolução	Até 6 meses	40 (48,8)	67,8	67,8	0,775
	> 6 meses	42 (51,2)	70,1	70,1	
Antecedentes venéreos ^a	Não	13 (37,1)	78,5	78,5	0,583
	Sim	22 (62,9)	75,3	75,3	
Estadiamento cT ^a	T2	19 (26,0)	69,9	69,9	0,682
	T3 +T4	60 (74,0)	66,5	66,5	
Estadiamento cN ^a	N0	32 (40,0)	70,2	70,2	0,032
	N1	10 (12,5)	71,1	71,1	
	N2	27 (33,8)	78,8	78,8	
	N3	11 (13,7)	34,0	34,0	
Cirurgia do tumor Primário ^b	Amputação parcial	24 (29,6)	74,3	74,3	0,486
	Amputação total	57 (70,4)	65,6	65,6	

a. Excluídos os casos sem informação

b. Excluído 1 caso de ressecção ampla

Tabela 22. Probabilidade acumulada de sobrevida específica por doença de acordo com variáveis anatomopatológicas.

Variável	Categoria	Nº pacientes %	Sobrevida específica por doença		p(log rank)
			5 anos	10 anos	
Grau de diferenciação ^a	Grau I	60 (74,0)	71,7	71,7	0,548
	Grau II	21 (26,0)	64,1	64,1	
Espessura do tumor ^b	Entre 1 e 5mm	20 (25,0)	78,0	78,0	0,181
	> 5 mm	60 (75,0)	64,3	64,3	
Permeação linfática ^b	Ausente	28 (36,3)	88,6	88,6	0,004
	Presente	49 (63,7)	55,0	55,0	
Embolização venosa ^b	Ausente	59 (77,6)	73,7	73,7	0,134
	Presente	17 (22,4)	52,0	52,0	
Infiltração de corpos cavernosos ^b	Ausente	39 (58,2)	80,2	80,2	0,092
	Presente	28 (41,8)	61,9	61,9	
Infiltração de uretra ^b	Ausente	30 (55,5)	80,9	80,9	0,257
	Presente	24 (44,4)	63,9	63,9	
Infiltrado mononuclear ^b	Ausente	3 (3,7)	66,6	66,6	0,930
	Leve	29 (35,8)	70,5	70,5	
	Moderado	29 (35,8)	70,3	70,3	
	Acentuado	20 (24,6)	63,3	63,3	
Infiltrado eosinofílico ^b	Ausente	38 (46,9)	68,8	68,8	0,129
	Leve	25 (30,8)	73,5	73,5	
	Moderado	10 (12,3)	38,5	38,5	
	Acentuado	8 (9,8)	85,7	85,7	
Coilócitos ^b	Ausente	40 (49,3)	68,0	68,0	0,568
	Presente	41 (50,6)	69,0	69,0	
Metástases linfonodais	Ausente	40 (48,8)	89,5	89,5	0,0001
	Presente	42 (51,2)	44,9	44,9	
Nº de linfonodos metastáticos	1	11 (26,2)	63,6	63,6	0,708
	2 ou 3	18 (42,8)	33,6	33,6	
	>3	13 (30,9)	47,0	47,0	
Lateralidade dos linfonodos	Unilateral	14 (40)	71,4	71,4	0,235
	Bilateral	21 (60)	31,6	31,6	
Nível dos linfonodos metastáticos ^c	Inguinal	16 (84,2)	51,9	51,9	0,492
	Ílioinguinal	3 (15,8)	33,3	33,3	

a.Excluído 1 caso de grau III; b. Excluídos os casos nos quais a variável foi definida como “indeterminada”. c. Excluído 1 caso de metástases apenas na região ilíaca.

Após análise multivariada, apenas o comprometimento metastático dos linfonodos esteve associado significativamente com menor sobrevida (HR=8,25; IC [2,74 - 24,85]). A presença do HPV não representou um risco significativo para o óbito (HR =1,85; IC [0,77 - 4,45]) (tabela 23). As taxas de probabilidade de sobrevida acumulada específica por doença de acordo com a presença de linfonodos metastáticos são ilustradas na figura 18.

Tabela 23. Fatores prognósticos para óbito através de análise multivariada

Variável	Categoria	HR ajustada	IC	P
Linfonodos metastáticos	Não	1	-	
	Sim	8,25	2,74 - 24,85	0,0002
HPV	Ausente	1	-	-
	Presente	1,85	0,77- 4,45	0.164

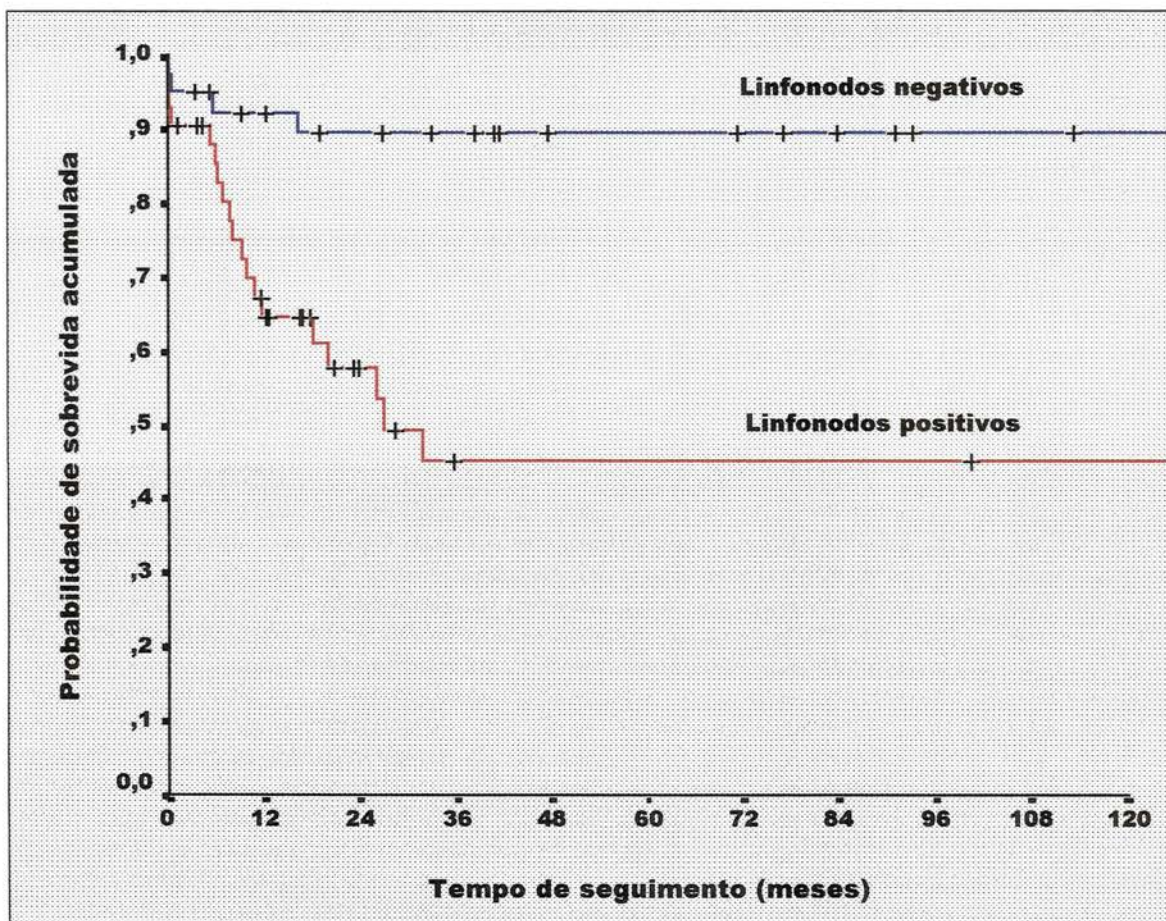


Figura 18. Curva atuarial de sobrevida específica por doença até 10 anos dos 82 pacientes portadores de carcinoma de pênis, de acordo com a presença de metástases linfonodais.

5.5 Recidivas

Treze (15,9%) pacientes apresentaram recidiva da neoplasia, sendo distribuídas da seguinte maneira: 9 (69,2%) regionais, 2 (15,4%) regionais + coto, 1 (7,7%) coto e 1 (7,7%) regional + metástases à distância (fígado). A tabela 24 mostra a associação entre presença do DNA do HPV e recidiva tumoral.

Tabela 24. Associação entre HPV e recidiva tumoral

Recidiva	HPV	
	Ausente N° (%)	Presente N° (%)
Não	49 (71,0)	20 (29,0)
Sim	8 (61,5)	5 (38,5)
Total	57 (69,5)	25 (30,5)

p= 0,496

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

6.1 Aspectos gerais

O câncer de pênis normalmente incide entre a 4ª e 7ª décadas de vida. A média de idade dos pacientes da presente série foi de $52,0 \pm 12,7$ anos, sendo menor do que a relatada por vários autores (VILLA e LOPES 1986, WIENER et al. 1992, PERSKY e DEKERNION 1986). Nos estudos de NARAYAMA et al. (1982), HORENBLAS e VAN TINTEREN (1994) e FICARRA et al. (1999), por exemplo, os pacientes tinham uma idade média de 68, 65 e 63 anos, respectivamente. Apenas 29% dos pacientes analisados por HORENBLAS e VAN TINTEREN (1994) tinham menos de 60 anos de idade, enquanto esse percentual foi de 71% (58/82) no presente estudo. Diferenças geográficas, permitindo uma maior participação de fatores externos no desenvolvimento da neoplasia, como infecções virais e carcinógenos químicos, além do baixo nível sócio-econômico dos pacientes analisados na presente série, com conseqüente higiene precária e assistência médica deficiente, poderiam justificar o aparecimento do carcinoma de pênis em indivíduos mais jovens no Brasil.

O aparecimento de ferida no pênis foi a queixa principal, referida por praticamente todos os pacientes do presente estudo, similar a outras investigações (ORNELLAS et al. 1994, ADEYOJU et al. 1997). Embora existam opiniões divergentes (FLEISS 1996), parece haver uma clara associação do carcinoma do pênis com a ausência de circuncisão (CUPP et al. 1995, BURGERS 1992, MADEN et al. 1993). Na presente série, apenas 2 pacientes (2,4%) tinham se submetido a circuncisão anteriormente ao desenvolvimento da neoplasia.

Encontra-se bem estabelecido na literatura que o tratamento preconizado para o carcinoma infiltrativo do pênis com metástases linfonodais é a amputação (parcial ou total) e linfadenectomia bilateral (CATALONA 1980 e 1988, MOHS et al. 1985, HORENBLAS

et al. 1991, LOPES et al. 1996b). Ressecções locais ampliadas e laserterapia, embora possam ser utilizadas para lesões pré-neoplásicas ou superficialmente infiltrativas, necessitam estrito controle das margens cirúrgicas na tentativa de diminuir os índices de recidiva local (MOHS et al. 1985, SHIRAYAMA et al. 1998, TIETJEN e MALEK 1998). FICARRA et al. (1999), por exemplo, analisando pacientes com tumores que infiltravam apenas o tecido subepitelial e tratados conservadoramente, relatam taxas de recorrência local de 43% (3/7). Não houve nenhuma recorrência em 13 pacientes com o mesmo estadiamento que foram submetidos a amputações do pênis. Considerando os 82 pacientes da presente série, 81 (98,7%) submeteram-se à amputação parcial ou total do pênis, e em apenas 1 (1,3%) caso foi realizada uma ressecção local do tumor. A taxa de recorrência local foi de 3,6% (3 / 82).

A frequente indicação das amputações penianas é devido ao fato que os pacientes apresentam-se com tumores localmente destrutivos. A maioria das séries relata pacientes em estádios avançados (tabela 25), semelhante ao que está sendo apresentado nesta investigação, onde todos os pacientes apresentavam lesões cT2 (23,1%), cT3 (65,8%) ou cT4 (7,3%). Apenas no estudo de ADEYOJU et al. (1997), realizado na Irlanda, houve uma maior frequência de estádios clínicos iniciais (57%). Considerando o conjunto dessas séries exemplificadas, 72% (609/848) dos pacientes apresentaram-se com estadiamentos avançados.

Tabela 25. Estadiamento do carcinoma do pênis em diversas séries da literatura

Autor (ano)	Total de pacientes	Nº (%) de ECII,III e IV
DeKernion et al. (1973)	48	34 (71) ^a
PowSang et al. (1990)	29	23 (79) ^b
Kamat et al. (1993)	150	116 (77) ^b
Ornellas et al. (1994)	414	310 (75) ^b
Horenblas e Van		
Tinteren (1994)	118	79 (67) ^b
Adeyoju et al. (1997)	42	18 (43) ^b
Ficarra et al (1999)	47	29 (68) ^c
Total	848	609 (72)

a. Classificação de Jackson (1966); b. TNM (1978); c. TNM (1992).

Uma dificuldade adicional no tratamento do carcinoma do pênis é a avaliação clínica dos linfonodos regionais, exame com baixa sensibilidade e especificidade (BEGGS e SPRATT 1964, CATALONA 1980, HORENBLAS et al. 1991), resultando em um grande número de linfadenectomias provavelmente desnecessárias. Além disso, este procedimento tem altas taxas de morbidade (CATALONA 1980, HORENBLAS et al. 1991). Setenta e quatro pacientes (90,2%) do presente estudo apresentaram complicações pós-operatórias relacionadas às linfadenectomias, principalmente infecção, necrose e deiscência dos retalhos dermogordurosos (47,5%) (tabela 8). Os índices de complicações precoces (principalmente deiscência e infecção) relatados por SKINNER et al. (1972), HORENBLAS et al. (1993) e

KAMAT et al. (1993) foram de 86,6% (130/150), 53% (17/32), e 50 % (5/10), respectivamente. A presente investigação é uma série histórica e a maioria dos pacientes foi submetida a linfadenectomias concomitante às amputações, o que provavelmente propiciou a um aumento na incidência de complicações. A realização da linfadenectomia 4 a 6 semanas após a cirurgia para o tumor primário, com antibioticoterapia profilática, além da utilização de incisões paralelas ao ligamento inguinal são procedimentos que estão sendo atualmente utilizados no Departamento de Cirurgia Pélvica do Hospital A.C. Camargo na tentativa de diminuir essas altas taxas de morbidade.

Uma alternativa para selecionar pacientes nos quais seria justificável tratamentos mais agressivos, mesmo considerando a morbidade, é a identificação de fatores prognósticos da neoplasia. Embora parâmetros clínicos (idade, tempo de evolução da doença, tamanho do tumor) e anatomopatológicos (grau de diferenciação tumoral, infiltração de corpos cavernosos, espessura e tipo de crescimento da neoplasia, presença de permeação linfática e venosa por células neoplásicas) tenham sido citados como de valor prognóstico no carcinoma do pênis, quase sempre com controvérsias entre os diversos autores (STAUBITZ et al. 1955, EKSTROM e EDSMYR 1958, DEKERNION et al. 1973, CUBILLA et al. 1993, FRALEY et al. 1985, KAMAT et al. 1993, HORENBLAS e VANTINTEREN 1994, THEODORESCU et al. 1996, LOPES et al. 1996b), é a presença de metástases nos linfonodos regionais o fator que mais interfere na evolução e sobrevida desses pacientes (WAJSMAN et al. 1977, NARAYAMA et al. 1982, YOUNG et al. 1991, KAMAT et al. 1993, HORENBLAS et al. 1993 e 1994, ORNELLAS et al. 1994, LOPES et al. 1996b). Mais adiante, na discussão sobre a sobrevida dos pacientes da presente série, a metastatização linfonodal será abordada com mais detalhes.

A clara associação do HPV com carcinoma do colo do útero e as evidências epidemiológicas do caráter de transmissão sexual do vírus, com aumento da frequência de lesões penianas sugestivas de infecção por HPV em parceiros de mulheres portadoras de condilomas e neoplasias cervicais (LEVINE et al. 1984, BARRASSO et al. 1987), levaram a um interesse crescente pela associação do HPV com o câncer de pênis. A detecção do DNA viral nas lesões pré-invasivas e invasivas, como demonstrado por HIGGINS et al. (1992) e CUPP et al. (1995), sugere que o vírus pode ter uma participação importante na formação e desenvolvimento dessa neoplasia; por outro lado, um percentual importante dos carcinomas penianos não parece estar relacionado à infecção viral.

O valor prognóstico da presença do DNA viral nas neoplasias genitais vem sendo estudado, mas sempre com resultados conflitantes (HUSSEINZADEH et al. 1991, NAKAGAWA et al. 1996, GARZETTI et al. 1998, PINTO et al. 1999a). Provavelmente em decorrência da raridade do câncer de pênis em países desenvolvidos, pouco se tem escrito sobre o assunto nessa neoplasia. A detecção do DNA do HPV em uma população de pacientes provenientes de uma única instituição, com metodologia adequada, e submetidos a tratamento uniforme tanto do tumor primário como dos linfonodos regionais, foi a base para a realização da presente investigação.

6.2 Detecção do DNA do HPV e aspectos metodológicos

Foi detectada a presença do DNA do HPV em 25/82 pacientes (30,5%) na presente série. Na literatura, as taxas de detecção do DNA viral no carcinoma do pênis variam entre 20 a 82% . Um estudo isolado, no entanto, relata uma taxa de 100% de positividade

(TORNESELLO et al. 1992). A tabela 26 mostra a frequência de detecção do HPV no carcinoma de pênis em diversas séries publicadas

Tabela 26. Frequência de detecção do DNA do HPV no carcinoma de pênis em diversas séries da literatura

Autor	Ano	Total de pacientes	Tipo de tecido analisado	Positividade para HPV n (%)	Metodologia empregada
Villa e Lopes	1986	18	Fresco	7 (39)	Southern blot
McCance et al.	1986	53	Fresco	31 (58)	Southern blot
Varma et al.	1990	23	Fixado	20 (87)	PCR e hibridização <i>in situ</i>
Wiener et al.	1992	29	Fixado	9 (31)	PCR e hibridização
Higgins et al.	1992	31	Fixado	9 (29)	Hibridização <i>in situ</i>
Tornesello et al.	1992	13	Fresco	13(100)	PCR e hibridização
Sarkar et al.	1992	11	Fixado	9 (82)	PCR e hibridização
Iwasawa et al.	1993	111	Fixado	70 (63)	PCR e hibridização <i>in situ</i>
Gregoire et al.	1995	117	Fixado	26 (22)	PCR e hibridização
Cupp et al.	1995	42	Fixado	23 (55)	PCR e southern blot
Levi et al.	1998	50	Fresco	28 (56)	PCR e hibridização

Não acreditamos que a baixa detecção do DNA viral no presente estudo seja decorrente de baixa sensibilidade da metodologia utilizada pois a PCR, entre as diferentes técnicas utilizadas em biologia molecular, é muito mais sensível e específica do que, por exemplo, as hibridizações em filtro (Southern e Northern blots) e hibridizações *in situ* (STOLER et al. 1992, VILLA e MEDEIROS 1995). A alta sensibilidade da PCR, por outro lado, tem como desvantagem a possibilidade de contaminação do material biológico; para detectar e evitar essa contaminação utilizamos controles positivos e negativos na reação, além de estritos cuidados com a manipulação das amostras, troca de luvas constante e utilização de ambientes físicos diferentes para o isolamento do DNA e realização da PCR, o que nos faz ter segurança da validade dos resultados.

Ainda em relação à metodologia, utilizamos a hibridização com um número de sondas que identificam a grande maioria dos tipos de HPV conhecidos, semelhante ao que é utilizado nos grandes centros de pesquisa internacional. Por outro lado, na análise dos resultados das diferentes séries torna-se fundamental o conhecimento da metodologia utilizada, pois técnicas de sensibilidade reduzida, por exemplo, podem levar facilmente a resultados falso-negativos. Desde que novos tipos virais continuam a serem descobertos e sequenciados, é provável que a incidência do HPV no carcinoma do pênis possa ser maior do que o que é referido nos dias atuais.

As variações na taxas de detecção do HPV no carcinoma de pênis podem decorrer também do número de casos avaliados em cada série e da população analisada. No estudo de TORNESELLO et al. (1992), por exemplo, a taxa de 100% de detecção viral refere-se apenas a 13 pacientes, todos oriundos de Uganda, África, região com uma alta incidência de câncer genital (PARKIN 1997), enquanto que WIENER et al. (1992), analisando 29 pacientes nos EUA, relatam uma taxa de detecção do DNA viral de 31%. É provável que as

taxas de detecção viral sejam mais fidedignas nos estudos em que foram avaliados um maior número de pacientes.

LEVI et al. (1998), no nosso meio, utilizando PCR e hibridização relatam taxas de detecção do DNA viral de 26% em tecido parafinado e de 56% em tecido fresco de carcinoma do pênis mostrando que, além da metodologia empregada, o tipo de espécime tumoral analisado também influi nos resultados. A extração de DNA em tecido parafinado é sempre mais difícil e laboriosa em virtude de que esse DNA frequentemente encontra-se fragmentado. Para poder tornar possível a análise de fragmentos menores de DNA, foram utilizadas sondas GP5 e GP6 na presente investigação. Esses iniciadores amplificam um fragmento de 140 pares de bases do gene L1 do HPV, diferentemente dos *primers* genéricos MY09 / MY11, que amplificam um fragmento de 450 pares de bases.

Embora não seja objetivo deste estudo discutir a etiologia do carcinoma do pênis, a baixa prevalência do HPV no tumor primário sugere que o DNA viral participa na oncogênese de apenas uma parcela dos tumores. A discrepância nas incidências do carcinoma do colo do útero, onde o HPV é detectado em cerca de 90% dos casos (BOSCH et al. 1995), e do carcinoma do pênis, correlato no homem ao câncer cervical, é outro aspecto que sugere uma patogênese distinta no carcinoma peniano, fato ainda não bem estudado na literatura. Por outro lado, a detecção do HPV tanto no tumor primário como em linfonodos metastáticos (WIENER et al. 1992), além da demonstração da integração do DNA viral na célula tumoral (MCCANCE et al. 1986), sugerem fortemente o papel etiológico do vírus em parte dos carcinomas de pênis.

Os tipos de HPV mais frequentemente encontrados na presente investigação foram o HPV 16 (52%), HPV 18 (16%) e HPV 31,33,35 (12%). Em 1 paciente (4%) houve positividade para HPV 16 e 18. Essas frequências são concordantes com a maioria das

séries, tanto às referentes ao carcinoma de pênis (MCCANCE et al. 1986), como naquelas que analisaram tumores malignos do colo do útero, vulva e ânus (BECKMAN et al. 1989, HIGGINS et al. 1991, PINTO et al. 1999a). Alguns estudos sobre carcinoma do colo do útero mostram uma associação do tipo de HPV com tipo histológico e comportamento mais agressivo da neoplasia; o HPV 16 estaria mais associado com o carcinoma espinocelular, enquanto o HPV 18 seria mais frequente no adenocarcinoma e teria um comportamento mais agressivo, com maior índice de metástases linfonodais (KURMAN et al. 1988, HIGGINS et al. 1991, NAKAGAWA et al. 1996). Não existe uma explicação clara, no entanto, para essa aparente variação do tipo viral com o tipo histológico da neoplasia. Na presente investigação todos os tumores eram carcinomas espinocelulares invasivos, impossibilitando tal análise.

Antes do advento e desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, o diagnóstico da infecção por HPV era realizado unicamente, e de maneira indireta, através de alterações morfológicas celulares causadas pelo vírus (KOSS e DUNFEE 1957, SCHNEIDER 1989, MEISEL e FORTIN 1976). A sensibilidade e especificidade do método morfológico vem sendo questionada por vários autores (TRONCONE et al. 1992, MORSE et al. 1988, SCHNEIDER 1989, LOWHAGEN et al. 1993). MORSE et al. (1988), analisando 164 esfregaços vaginais, relatam que 19 (12%) apresentavam aspectos citológicos sugestivos de HPV sem comprovação da presença do DNA viral por hibridização, enquanto que 16 (10%) dos espécimes continham DNA do HPV mas não apresentavam alterações citológicas. No estudo de STRAND et al. (1996), onde foram analisados 92 pacientes portadores de condiloma acuminatum e lesões maculares e/ou papulares do pênis, a colicitose e outros sinais atribuídos à infecção por HPV (hiperplasia, paraqueratose e hiperqueratose) foram encontrados tanto nas lesões HPV- positivo como naquelas HPV- negativo.

Na presente investigação a sensibilidade e especificidade da coilocitose no sentido de definir a presença do DNA do HPV no tumor foi de 54,2% e 50,8%, respectivamente, com taxas de resultados falso-positivos de 68,3% e de falso-negativos de 27,5%. Esses resultados sugerem que a coilocitose não deve ser utilizada como método diagnóstico da presença de infecção por HPV no carcinoma invasivo do pênis.

6.3 Associação do HPV com variáveis clínicas e anatomopatológicas

Quando considerados os casos positivos para qualquer tipo de HPV, os resultados deste estudo mostram uma maior detecção do DNA viral nos pacientes abaixo de 40 anos quando comparada aqueles acima dessa idade, com resultados marginalmente significantes ($p=0,046$). No entanto, quando considerados apenas os HPV 16 e 18, não houve nenhuma diferença na incidência segundo a faixa etária ($p=0,203$). Optamos em fazer análises separadas agrupando os HPV 16 e 18 porque são os tipos que apresentam maior oncogenicidade e estão mais frequentemente associados com as neoplasias malignas.

A média de idade dos pacientes HPV positivos ($50,3\pm 14,6$) foi ligeiramente menor do que a dos pacientes HPV negativos ($52,7\pm 11,9$), mas com resultados também não significantes ($p=0,444$). No estudo de HIGGINS et al. (1992) os pacientes HPV positivos (idade média: $63,2\pm 10,4$) eram mais jovens do que os HPV negativos (idade média: $66,7\pm 16,8$), resultados também sem significância estatística ($p=0,57$). Conclusões semelhantes são relatadas por CUPP et al. (1995) e LEVI et al. (1998). A detecção do HPV em pacientes mais jovens decorre provavelmente do fato de se tratar de uma doença sexualmente transmitida, embora alguns autores não mostrem associação entre a presença do HPV e idade (VILLA e LOPES 1986, WIENER et al. 1992, GREGOIRE et al. 1995).



O carcinoma do pênis não parece estar associado com diferenças raciais, como relata RIVEROS e LEBRON (1963). Apesar de ter havido uma maior detecção de HPV em pacientes não brancos no estudo de WIENER et al. (1992), a diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,660$). Considerando a variável raça, as taxas de positividade do DNA do HPV foram bastante similares na presente investigação, com 30% de detecção nos pacientes brancos e 31,8% naqueles não brancos. A miscigenação das raças no Brasil é outro fator que dificulta quaisquer análises desse parâmetro em investigações científicas.

No presente estudo houve associação estatisticamente significativa entre a presença do HPV e o estado civil dos pacientes. O DNA do HPV não foi detectado em nenhum tumor dos 11 pacientes solteiros ou separados. Essa informação, no entanto, merece ser analisada com cuidado pois, em se tratando de um estudo retrospectivo que abrange um longo período, a informação prestada pelos pacientes pode não necessariamente refletir a realidade. Como citado anteriormente, a infecção por HPV é uma doença transmitida sexualmente estando geralmente associada com indivíduos que tenham um maior número de parceiros sexuais o que, teoricamente, estaria mais presente no grupo de solteiros ou separados.

Não houve associação estatisticamente significativa entre a positividade do HPV e o tempo de evolução da doença e/ou a presença de doenças venéreas nos pacientes analisados na presente série. Mais uma vez, temos que considerar que as informações fornecidas em relação a essas variáveis podem não expressar a realidade por dependerem de conhecimentos que algumas vezes os pacientes não possuem.

A presença do HPV não foi significativamente associada com o estadiamento da neoplasia nos pacientes da presente investigação, mesmo quando analisados apenas os HPV's 16 e 18. Embora o estadiamento utilizado (HARMER 1978) seja baseado no exame clínico,

resultados similares foram observados quando analisamos parâmetros histológicos de agressividade tumoral, como embolização venosa por células neoplásicas ($p=0,827$), infiltração de corpos cavernosos ($p=0,247$), infiltração da uretra ($p=0,684$) e espessura do tumor ($p=0,126$). GREGOIRE et al. (1985) relatam que o DNA do HPV foi detectado mais frequentemente em tumores com crescimento vertical do que naqueles casos de crescimento superficial ($p=0,038$). Nos pacientes da presente análise todos os tumores apresentavam crescimento vertical e a comparação foi feita de acordo com o maior ou menor grau de infiltração (limite de 5mm).

O achado mais significante, em relação às variáveis anatomopatológicas, foi a associação entre a presença do HPV e a permeação linfática por células neoplásicas. A ausência de DNA viral esteve associada com maior permeação linfática, mesmo na análise multivariada (OR:0,269; IC:0,965-0,753). Teoriamente, este fato estaria associado com uma maior incidência de metástases linfonodais e pior prognóstico, como será discutido adiante, o que não foi observado. Não encontramos na literatura estudos que correlacionem a presença do HPV com permeação linfática no tumor em câncer de pênis, embora KENTER et al. (1993) relatem que não houve interferência da permeação vascular por células neoplásicas com o prognóstico de 70 pacientes portadores de carcinoma do colo do útero.

A associação da ausência do HPV com pior prognóstico em certas neoplasias é citada em alguns estudos como o de HIGGINS et al. (1991), onde pacientes com carcinomas do colo do útero HPV negativos apresentavam estadiamentos mais avançados e pior prognóstico. No estudo de RIOU et al. (1990), apesar de ter sido relatado um pior prognóstico para as pacientes com carcinoma cervical HPV negativo, não houve nenhuma diferença entre os grupos HPV positivo e negativo quando considerados parâmetros de agressividade local da neoplasia, como tamanho do tumor e estadiamento.

Um outro fator que sugere a associação de maior agressividade tumoral nos pacientes HPV negativos no presente estudo, pelo menos na análise inicial, foi a realização de um maior número de amputações penianas totais nesse grupo. Esse resultado foi ainda mais significativo quando considerada apenas a detecção dos HPV 16 e 18 ($p=0,031$). Na análise multivariada, no entanto, esta variável deixou de ser significativa.

Os tumores malignos do pênis têm uma tendência a serem bem diferenciados (SOLSONA et al. 1992, HORENBLAS et al. 1993, ORNELLAS et al. 1994), fato também demonstrado na presente investigação, onde apenas 1 neoplasia (1,2%) foi caracterizada como mal diferenciada (grau III). Não houve associação da presença do HPV com o grau de diferenciação tumoral, semelhante ao estudo de WIENER et al. (1992). Ao contrário, GREGOIRE et al. (1995) relatam que o DNA do HPV foi detectado mais frequentemente em tumores mal diferenciados ($p=0,027$). Acreditamos que as diferenças nesses resultados possam ser decorrentes do número de casos grau III analisados, que correspondeu a 46% (53/115) no estudo de GREGOIRE et al. (1995), enquanto essas taxas foram de 19% (4/21) e 1,2% (1/82) no estudo de WIENER et al. (1992) e na presente série, respectivamente.

Como já comentado anteriormente, existe praticamente uma unanimidade na literatura de que a presença de metástases linfonodais é a variável prognóstica mais importante no carcinoma do pênis (WAJSMAN et al. 1977, NARAYAMA et al. 1982, YOUNG et al. 1991, KAMAT et al. 1993, HORENBLAS et al. 1993 e 1994, ORNELLAS et al. 1994, LOPES et al. 1996b). A provável interferência da presença do HPV no tumor primário com a incidência de metástases linfonodais, por outro lado, é um assunto controverso nesta e em outras neoplasias, como nos tumores malignos do colo do útero, vulva, ânus e vias aerodigestivas superiores (KING et al. 1989, WIENER et al. 1992, GREGOIRE et al. 1995, GIRARDI et al. 1992, FRISCH et al. 1997, PINTO et al. 1999a,

PILLAI et al. 1999). Na presente investigação, apesar de haver um percentual maior de metástases linfonodais no grupo de pacientes nos quais não foi detectado DNA do HPV, os valores não foram significativos tanto quando considerados todos os tipos de HPV ($p=0,386$), como quando considerados apenas os HPV 16 e 18 ($p=0,252$). GREGOIRE et al. (1995) demonstram resultados opostos pois os percentuais de metastatização foram de 30% e 19% para o grupo de pacientes HPV positivo e negativo, respectivamente. Mais uma vez, no entanto, esses valores não foram estatisticamente significantes ($p=0,411$). No estudo de WIENER et al. (1992) a presença do HPV não interferiu na incidência de metástases linfonodais no carcinoma de pênis. A associação do DNA do HPV com maior incidência de metástases linfonodais no carcinoma do colo do útero é relatada por alguns estudos (GIRARDI et al. 1992, CHEN et al. 1994, GARZETTI et al. 1998) e negada por outros (KING et al. 1989, KENTER et al. 1993).

Considerando 13 pacientes nos quais foi possível avaliação detalhada das recidivas tumorais na presente investigação, não houve associação dessa variável com a presença do HPV ($p=0,496$). Resultado semelhante é relatado por WIENER et al. (1992).

Apesar da relação significativa entre o estadiamento clínico N ($p=0,045$), permeação linfática ($p<0,001$) e embolização venosa ($p=0,040$) com maior incidência de metástases linfonodais na análise univariada da presente série, apenas a presença de permeação linfática por células neoplásicas (OR:10,82; IC:2,68-43,59) e os estadiamentos clínicos N1 (OR:11,47; IC:1,50-87,64) e N3 (OR:7,23; IC:1,10-47,26) permaneceram válidos após análise multivariada. Parece claro que o encontro de êmbolos tumorais no interior de linfáticos do tumor primário propicie a uma maior incidência de metástases linfonodais, tendo sido inclusive proposto que essa variável faça parte do estadiamento patológico do carcinoma de pênis (LOPES et al. 1996b). Por outro lado, apesar de ser óbvia a associação

de um exame clínico anormal dos linfonodos inguinais com a presença de metástases nesses mesmos linfonodos, os resultados da presente investigação enfatizam a importância da realização de um detalhado exame clínico da região inguinal, mesmo considerando as altas taxas de resultados falso-negativos e falso-positivos desses exames (CABANAS 1977, CATALONA 1987, BEZERRA et al. 1999). Houve um maior risco de metástases linfonodais em tumores classificados como cN1 comparado a cN2 e cN3; essa aparente contradição pode ser decorrente, como discutido por LOPES (1995), de que a caracterização desses linfonodos como N2 e N3 deriva principalmente de uma maior reação inflamatória local.

6.4 Análise de sobrevida

Na presente investigação foi possível ter um seguimento adequado na grande maioria dos casos. A taxa de 12,2% de pacientes perdidos de vista é plenamente aceitável na literatura especializada, além do que não houve diferença estatisticamente significativa entre as características clínicas e anatomopatológicas considerando o grupo dos pacientes perdidos de vista (10 casos) e aqueles com seguimento adequado (72 casos) (tabelas 19 e 20), validando os resultados da análise de sobrevida.

A presença do HPV não interferiu nas taxas de sobrevida específica por doença aos 5 e 10 anos, havendo quase que uma sobreposição de resultados, como demonstrado na figura 17. A análise multivariada comprova que o HPV não representou fator de risco para óbito dos pacientes na presente análise (tabela 23). O único estudo no qual houve análise de sobrevida em câncer de pênis de acordo com a presença do HPV foi o de WIENER et al. (1992), também não demonstrando diferença significativa nos grupos HPV positivo e

negativo. Esses autores, apesar de utilizarem metodologia semelhante a presente investigação, utilizaram sondas unicamente para o HPV 16 e 18; além disso, foram estudados apenas 29 pacientes.

Os pacientes da presente investigação apresentaram uma sobrevida específica por doença aos 5 e 10 anos de 68,7%. Considerando o estadiamento avançado e a presença de metástases linfonodais em 51% dos casos, a taxa de sobrevida reforça a idéia de que o carcinoma de pênis é uma doença curável, mesmo na vigência de disseminação metastática em linfonodos. Apenas 1 paciente (1,2%) na presente casuística evoluiu com metástases à distância, caracterizando a neoplasia como essencialmente loco-regional. JOHNSON et al. (1984) e HORENBLAS et al. (1994) relatam sobrevidas específicas por doença a cinco anos de 57% e 72%, respectivamente. FICARRA et al. (1999), analisando 47 pacientes, relatam uma sobrevida global de 34%. Nesta última série os próprios autores comentam que a baixa taxa de sobrevida pode ter sido decorrente da não realização sistemática de linfadenectomias e da conduta cirúrgica conservadora em alguns tumores T1. A comparação das taxas de sobrevida entre as diversas séries nem sempre é simples, devido a diferenças no tipo de estadiamento (clínico ou patológico) e terapêutica utilizados.

A presente investigação mostra que a sobrevida dos pacientes foi influenciada pelo estadiamento clínico N ($p=0,032$), permeação linfática por células neoplásicas ($p=0,004$) e presença de linfonodos metastáticos ($p=0,0001$) através de análise univariada. Apenas a metastatização linfonodal, no entanto, permaneceu com significância estatística após análise multivariada; a sobrevida específica por doença aos 5 e 10 anos foi de 89,5% para os pacientes sem metástases linfonodais, enquanto essa taxa foi de 44,9% naqueles com linfonodos positivos ($p=0,0001$). Os pacientes com metástases em linfonodos tiveram um risco para óbito mais de 8 vezes maior do que aqueles com linfonodos negativos.

Embora haja uma clara associação de menor sobrevida com metastatização linfonodal (WAJSMAN et al. 1977, NARAYAMA et al. 1982, SUFRIN e HUBEN 1987, SRINIVAS 1987, YOUNG et al. 1991, KAMAT et al. 1993, HORENBLAS e VAN TINTEREN 1994, LOPES et al. 1996b), os resultados da presente série não mostram diferença significativa dessa variável quando considerados a lateralidade, nível (inguinal ou ilioinguinal) ou número dos linfonodos metastáticos. É importante salientar que a presença de linfonodos metastáticos bilateralmente foi observada em 60% dos casos no presente estudo, o que indica a realização de linfadenectomias também bilaterais. Em relação ao número de linfonodos metastáticos, os resultados da presente série são distintos daqueles apresentados por alguns autores que relatam associação de pior sobrevida com um maior número de linfonodos metastáticos (BAKER et al. 1976, JOHNSON e LO 1984, SRINIVAS et al. 1987, FRALEY et al. 1989, HORENBLAS et al. 1993).

É interessante notar que a permeação linfática por células neoplásicas esteve associada com metástases em linfonodos, inclusive através de análise multivariada, mas não interferiu na maior ou menor sobrevida dos pacientes da presente investigação. Acreditamos que isso ocorra pela interferência do tratamento (especificamente a cirurgia) na evolução da doença, pois pacientes com linfonodos metastáticos não tratados geralmente morrem nos dois primeiros anos após o diagnóstico (DERRICK et al. 1973, POMPEU 1993). Mesmo na vigência de metástases em linfonodos pélvicos, sinônimo de incurabilidade por alguns autores (RAVI 1993, SRINIVAS et al. 1987), o esvaziamento ilioinguinal pode melhorar a sobrevida (LOPES et al. 2000)

6.5 Perspectivas futuras

Embora a presente investigação tenha utilizado tecnologia atual para detecção do DNA do HPV, o contínuo desenvolvimento e aperfeiçoamento das técnicas de biologia molecular pode levar a descoberta de novos tipos virais, e conseqüente novos métodos e sondas para detectá-los, o que exige uma permanente reavaliação dos resultados obtidos neste e em vários estudos semelhantes.

Mutações nos genes de supressão tumoral p53 e pRb tem sido relatadas em várias neoplasias (KLEIHUES et al. 1997) e alguns estudos analisaram a associação desses genes com o carcinoma do pênis (LAM et al. 1995, PINTO et al. 1999b). CROOK et al. (1991), estudando linhagens celulares de carcinoma do colo do útero HPV negativas e positivas, observaram mutações de p53 apenas nas linhagens HPV negativas. Por outro lado, é bem conhecida a participação dos genes E6 e E7 dos HPVs 16 e 18 na inativação de p53 e pRb e conseqüente descontrole dos mecanismos de regulação do ciclo celular (DECAPRIO et al. 1989, WERNESS et al. 1990, SCHEFFNER et al. 1990, GOLDWIN et al. 1997). Parece ser válida a especulação de que nos tumores HPV negativos os genes p53 e pRb poderiam estar mutados, enquanto que naqueles tumores HPV positivos a inativação desses genes realizaria-se através de interações com as oncoproteínas virais. A identificação de alterações genéticas no grupo de pacientes analisados no presente estudo, principalmente nos genes p53 e pRb, pode ser uma boa alternativa para continuidade desta investigação. Marcadores de proliferação celular como o antígeno Ki67 e PCNA vem sendo associados com o prognóstico em algumas neoplasias, como mama, cólon e próstata (FORONES et al. 1999,

AGUS et al. 1999, JEZIORSKI et al. 2000), e constituiriam outra linha de estudo para o carcinoma de pênis.

Uma variável prognóstica que vem sendo muito estudada nos últimos anos é a presença do chamado "linfonodo sentinela", definido como o primeiro a ser comprometido por células neoplásicas a partir do tumor primário. Quando este linfonodo pode ser claramente identificado e o seu exame cuidadoso não revelar comprometimento por células neoplásicas, os outros linfonodos da cadeia ganglionar correspondente provavelmente também estarão livres de neoplasia (GLASS et al. 1995). Estudos sobre o linfonodo sentinela, utilizando linfocintilografia e rádio-traçador, vem sendo realizados principalmente em melanomas (GLASS et al. 1995, GODELLAS et al. 1995) e neoplasias da mama (O'HEA et al. 1998). Recentemente, análise semelhante foi proposta para o carcinoma do pênis (HORENBLAS et al. 2000). Uma das dificuldades para a realização destes estudos, invariavelmente prospectivos, é a necessidade de um número suficiente de pacientes. Em certa regiões do Brasil, principalmente no norte e nordeste onde a neoplasia é mais incidente, poderia ser viável a realização de estudos com o linfonodo sentinela em câncer de pênis.

Por fim, é importante ressaltar que variantes histológicas do carcinoma espinocelular, principalmente em alguns tumores genitais, tem sido associadas com a presença do HPV e com características clínicas do tumor (CUBILLA et al. 1998). A variante verrucosa ou basalóide do CEC de vulva, por exemplo, encontra-se mais associada com o DNA viral e ocorre geralmente em mulheres mais jovens (BLOSS et al. 1991, HORDING et al. 1994, PINTO et al. 1999a). Análises semelhantes foram realizadas em câncer do ânus (FRISCH et al. 1999). Recente estudo tenta caracterizar morfológicamente a variante verrucosa do CEC de pênis, separando-a de outras formas morfológicas como o carcinoma

verrucoso e o condiloma gigante (CUBILLAS et al. 2000). A identificação de subtipos histológicos no câncer de pênis e sua associação com o HPV, evolução clínica e prognóstico também pode ser importante na pesquisa clínica dessa neoplasia.

CONCLUSÕES

DNA ms.f

7 Conclusões

Os resultados obtidos nas condições do presente estudo permitem concluir que:

- 1- A presença ou ausência do DNA do HPV no tumor primário não interfere com a incidência de metástases linfonodais nem com a sobrevida de pacientes portadores de carcinoma invasivo do pênis.
- 2- Das variáveis clínicas e anatomopatológicas estudadas, e após análise multivariada, a presença do DNA do HPV foi associada significativamente apenas com a ausência de permeação linfática ($p=0,007$).
- 3- A presença de coilocitose é um achado morfológico com baixa sensibilidade e especificidade, não devendo ser utilizado para o diagnóstico de infecção por HPV no carcinoma invasivo de pênis.
- 4- A presença de metástases em linfonodos foi a única variável anatomopatológica associada com menor sobrevida após análise multivariada.
- 5- A permeação linfática, além do estadiamento clínico N1 e N3, foram os fatores que influenciaram a presença de metástases linfonodais após análise multivariada

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 Referências bibliográficas

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

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

Agus DB, Cordon-Cardo C, Fox W, Drobnyak M, Koff A, Golde DW, Scher HI. Prostate cancer cell cycle regulators: response to androgen withdrawal and development of androgen independence. **J Natl Cancer Inst** 1999; 91:1869-76.

Aynaud O, Ionesco M, Barraso R. Penile intraepithelial neoplasia. **Cancer** 1994; 74:1762-7.

Alves VAF, Yamamoto LSU, Pereira EAG, Souen JS. Condilomas do colo uterino- correlação de dados colposcópicos, histológicos e imuno-histoquímicos. **J Bras Ginecol** 1988; 98:257-61.

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

Baker BH, Spratt Jr LS, Perez-Mesa C, Watson FR, Leduc RJ. Carcinoma of the penis. **J Urol** 1976; 116:458-61.

Baker CC, Phelps WC, Lindgren V, Braun MJ, Gonda MA, Howley PM. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. **J Virol** 1987; 61:962-71.

Bandara LR, Adamczewski JP, Hunt T, La Thangue NB. Cyclin A and the retinoblastoma gene product complex with a common transcription factor. **Nature** 1991; 352:249-51.

Barbosa MS, Vass WC, Lowy DR, Schiller JT. In vitro biological activities of the E6 and E7 genes vary among human papillomavirus of different oncogenic potential. **J Virol** 1991; 65:292-8.

Barnes W, Delgado G, Kurman RJ, Petrilli ES, Smith DA, Ahmed S, Lorincz AT, Temple GF, Jenson AB, Lancaster WD. Possible prognostic significance of human papillomavirus type in cervical Cancer. **Gynecol Oncol** 1988; 29:267-73.

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

Bauer HM, Ting Y, Greer CE. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. **JAMA** 1991; 265:472-7.

Beckmann AM, Daling JR, Sherman KJ, Maden C, Miller BA, Coates RJ, Kiviat NB, Myerson D, Weiss NS, Hislop G, Beagrie M, McDougall JK. Human papillomavirus infection and anal cancer. **Int J Cancer** 1989; 43:1042-9.

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

Bezerra ALR, Lopes A, Nishimoto IN. Acurácia do exame clínico dos linfonodos inguinais no câncer de pênis: análise de 134 linfadenectomias. **An Fac Med Univ Fed Pernambuco** 1999; 44:49-52.

Bloss JD, Liao SY, Wilczynski SP, Macri C, Walker J, Peake M, Berman ML. Clinical and histologic features of vulvar carcinoma analyzed for human papillomavirus status: evidence that squamous cell carcinoma of the vulva has more than one etiology. **Hum Pathol** 1991; 22: 711-8.

Boon ME, Susanti I, Tasche MJA, K LP. Human papillomavirus (HPV)-associated male and female genital carcinomas in a hindu population. **Cancer** 1989; 64:559-65.

Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. **J Natl Cancer Inst** 1995; 87:796-802.

Brinton LA, Juan-Yao L, Shou-De R, Huang S, Sheng SB, Bai-Gão S, Zhe-Jun Z, Schiffman MH, Dawsey S. Risk factors for penile cancer: results from a case-control study in China. **Int J Cancer** 1991; 47:504-9.

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

Brumini R. **Câncer no Brasil: dados histopatológicos**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, Campanha Nacional de Combate ao Câncer; 1982. p.1-105: Resultados.

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

Burger RA, Monk BJ, Kurosaki T, Anton-Culver H, Vasilkev SA, Berman ML, Wilczynski SP. Human papillomavirus type 18: association with poor prognosis in early stage cervical cancer. **J Natl Cancer Inst** 1996; 88: 1361-8.

Burgers JK, Badalament RA, Drago JR. Penile cancer. Clinical presentation, diagnosis, and staging. **Urol Clin North Am** 1992; 19:247-50.

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

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

Catalona WJ. Surgical staging of genitourinary tumors. **Cancer** 1987; 60:459-63.

Catalona WJ. Modified inguinal lymphadenectomy for carcinoma of the penis with preservation of saphenous veins: technique and preliminary results. **J Urol** 1988; 140:306-10.

Chen TM, Chen CA, Wu CC, Huang SC, Chang CF, Hsieh CY. The genotypes and prognostic significance of human papillomaviruses in cervical cancer. **Int J Cancer** 1994; 57:181-184.

Chiang CM, Ustav M, Stenlund A, Ho TF, Brer TR, Chow LT. Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins. **Proc Natl Acad Sci USA** 1992; 89:5799-803.

Cox DR. Regression models on life tables. **J R Stat Soc Br** 1972; 34:187-220.

Crook T, Wrede D, Vousden KH. p53 point mutation in HPV negative human cervical carcinoma cell lines. **Oncogene** 1991; 6:873-5.

Crum CP. Carcinoma of the vulva: epidemiology and pathogenesis. **Obstet Gynecol** 1992; 79:448-54.

Cubilla AL, Barreto J, Caballero C, Ayala G, Riveros M. Pathologic features of epidermoid carcinoma of the penis: a prospective study of 66 cases. **Am J Surg Pathol** 1993; 17:753-63.

Cubilla AL, Reuter VE, Gregoire L, Ayala G, Ocampos S, Lancaster WD, Fair W. Basaloid squamous cell carcinoma: a distinctive human papilloma virus-related penile neoplasm: a report of 20 cases. **Am J Surg Pathol** 1998; 22:755-61.

Cubilla AL, Velazques EF, Reuter VE, Oliva E, Mihm Jr MC, Young RH. Warty (condylomatous) squamous cell carcinoma of the penis: a report of 11 cases and proposed classification of "verruciform" penile tumors. **Am J Surg Pathol** 2000; 24:505-12.

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

DeCaprio JA, Ludlow JW, Figge J, Shew JY, Huang WH, Lee WH, Marsilio E, Paucha E, Livingston DM. SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. **Cell** 1988; 54:275-83.

DeCaprio JA, Ludlow JW, Lynch D, Furukawa Y, Griffin J, Piwnica-Worms H, Huang CM, Livingston DM. The product of the retinoblastoma susceptibility gene has properties of a cell cycle regulatory element. **Cell** 1989; 58:1085-95.

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

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

Demeter LM, Stoler MH, Bonnez W, Corey L, Pappas P, Strussenberg J, Reichman RC. Penile intraepithelial neoplasia: clinical presentation and an analysis of the physical state of human papillomavirus DNA. **J Infect Dis** 1993;168:38-46.

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

Dianzani C, Bucci M, Pierangeli A, Calvieri S, Degener AM. Association of human papillomavirus type 11 with carcinoma of the penis. **Urology** 1998; 51:1046-8.

DiMaio D, Guralski D, Schiller JT. Translation of open reading frame E5 of bovine papillomavirus is required for its transforming activity. **Proc Natl Acad Sci USA** 1986; 83:1797-801.

Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. **Science** 1989; 243:934-6.

Doorbar J, Campbell D, Grand RJA, Gallimore PH. Identification of the human papilloma virus-1a.E4 gene products. **EMBO J** 1986; 5:355-62.

Downey GP, Waddell TK, Fukushima T, Sue-A-Quan A. Current techniques in cell and molecular biology. **J Crit Care** 1995; 10:136-49.

Durst M, Gissman L, Ikenberg H, Zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. **Proc Natl Acad Sci USA** 1983; 80:3812-5.

Durst M, Kleinheinz A, Hotz M, Gissman L. The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours. **J Gen Virol** 1985; 66: 1515-22.

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

Engel LW, Heilman CA, Howley PM. Transcriptional organization of bovine papillomavirus type 1. **J Urol** 1983; 47:516-28.

Erlich HA, Gelfand D, Sninsky JJ. Recent advances in the polymerase chain reaction. **Science** 1991; 252:1643-51.

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

Ficarra V, D'amico A, Cavalleri S, Zanon G, Moferdin A, Dionisio S, Malossini G, Mobilio G. Surgical treatment of penile carcinoma: our experience from 1976 to 1997. **Urol Int** 1999; 62:234-7.

Fleiss PM. The detection of human papillomavirus deoxyribonucleic acid in intraepithelial, in situ, verrucous and invasive carcinoma of the penis [letter, comment]. **J Urol** 1996; 155:2034. [comment on: **J Urol** 1995;154:1024-29].

Forones NM, Oshima C, Nanogaki S, Tanaka M, Barbosa V. Determination of proliferative activity using Ki67 and expression of p53 in colorectal cancer. **Arq Gastroenterol** 1999; 36:122-6.

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

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

Franco, E.L. Cancer causes revisited: human papillomavirus and cervical neoplasia. **J Natl Cancer Inst** 1995; 87:779-80.

Franco EL, Villa L, Rohan T, Ferenczy A, Petzl-Erler M, Matlashewski G. Design and methods of the Ludwig-McGill longitudinal study of the natural history of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Brazil. Ludwig-McGill study group. **Rev Panam Salud Publica** 1999; 6:223-33.

Franco EL. Epidemiologia das verrugas genitais e do câncer. In: Lorincz AT, Reid R, editors. **HPV**. Rio de Janeiro: Interlivros; 1997. p19-44.

Frisch M, Van Den Brule AJC, Jiwa NM, Meijuer CJLM, Melbye M. HPV-16-positive anal and penile carcinomas in a young man- anogenital "field effect" in the immunosuppressed male? **Scand J Infect Dis** 1996; 28:629-32.

Frisch M, Glimelius B, Van Den Brule AJC, Wohlfahrt J, Meijer CJLM, Walboomers JMM, Goldman S, Svensson C, Adami HO, Melbye M. Sexually transmitted infection as a cause of anal cancer. **N Engl J Med** 1997; 337:1350-8.

Frisch M, Fenger C, Van Der Brule AJC, Sorensen P, Meijer CJLM, Walboomers JMM, Adami HO, Melbye M, Glimelius B. Variants of squamous cell carcinoma of the anal canal and perianal skin and their relation to human papillomavirus. **Cancer Res** 1999; 59:753-7.

Garzetti GG, Ciavanetti A, Lucarini G, Goteri G, Menso S, Nistolis M, Romanini C, Biagini G. The role of human papillomavirus DNAs in cervical carcinoma and risk of lymph node metastasis. **Cancer** 1998; 82:887-92.

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

Girardi F, Fuchs P, Haas J. Prognostic importance of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancer. **Cancer** 1992; 69:2502-4.

Gissman L, Pfister H, ZurHausen H. Human papillomavirus DNA: physical mapping and genetic heterogeneity. **Proc Natl Acad Sci USA**. 1976; 73:1310-3.

Gissman L, Zur Hausen H. Partial characterization of viral DNA from human genital warts (condyloma acuminata). **Int J Cancer** 1980; 25:605-9.

Glass LF, Fenske NA, Messina JL, Cruse CW, Rapaport DP, Berman C, Puleo CA, Heller R, Miliotes G, Albertini J, Reintgen DS. The role of selective lymphadenectomy in the management of patients with malignant melanoma. **Dermatol Surg** 1995; 21:979-83.

Godellas CV, Berman CG, Lyman G, Cruse CW, Rapaport D, Heller R, Wang X, Glass F, Fenske N, Messina J. The identification and mapping of melanoma regional nodal metastases: minimally invasive surgery for the diagnosis of nodal metastases. **Am Surg** 1995; 61:97-101.

Goldminz D, Scott G, Klaus S. Penile basal cell carcinoma: report of a case and review of the literature. **J Am Acad Dermatol** 1989; 20:1094-7.

Goldwin AK, Schultz DC, Hamilton TC, Knudson Jr AG. Oncogenes and tumor-suppressor genes. In: Hoskins WJ, Perez CA, Young RC, editors. **Principles and practice of gynecologic oncology**. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p.107-48.

Graham S, Shotz W. Epidemiology of cancer of the cervix in Buffalo, New York. **J Natl Cancer Inst** 1979; 63:23-7.

Gregoire L, Cubilla AL, Reuter VE, Haas PG, Lancaster WD. Preferential association of human papillomavirus with high-grade histologic variants of penile-invasive squamous cell carcinoma. **J Natl Cancer Inst** 1995; 87:1705-9.

Hall MC, Sanders JS, Vuitch F, Ramirez E, Pettaway CA. Deoxyribonucleic acid flow cytometry and traditional pathologic variables in invasive penile carcinoma: assessment of prognostic significance. **Urology** 1998; 52:111-16.

Hardner GJ, Bhanalaph T, Murphy GP, Albert DJ, Moore RH. Carcinoma of the penis: analysis of therapy in 100 consecutive cases. **J Urol** 1972; 108:428-30.

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

Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. **EMBO J** 1989; 8:3905-10.

Helin K, Harlow E. The retinoblastoma protein as a transcriptional repressor. **Trends Cell Biol** 1993; 3:43-6.

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

Higgins GD, Davy M, Roder D, Uzelin DM, Philips GE, Burrell CJ. Increased age and mortality associated with cervical carcinomas negative for human papillomavirus RNA. **Lancet** 1991; 338:910-3.

Higgins GD, Uzelin DM, Philips EG, Villa LL, Burrell CJ. Differing prevalence of human papillomavirus RNA in penile dysplasias and carcinoma may reflect differing etiologies. **Am J Clin Pathol** 1992; 97:272-8.

Hills E, Lavery CR. Electron microscopic detection of papilloma virus particles in selected koilocytotic cells in a routine cervical smear. **Acta Cytol** 1978; 23:53-6.

Hinds P, Finlay C, Levine AJ. Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation. **J Virol** 1989; 63:739-46.

Hines JF, Ghim SJ, Schlegel R, Jensen AB. Prospects for vaccine against human papillomavirus. **Obstet Gynecol** 1995; 86:860-66.

Hording U, Junge J, Daugaard S, Lundvall F, Poulsen H, Bock JE. Vulvar squamous cell carcinoma and papillomaviruses: indications for two different etiologies. **Gynecol Oncol** 1994; 52:241-6.

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

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

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

Horenblas S, Jansen L, Meinhardt W, Hoefnagel CA, Jong D, Nieweg OE. Detection of occult metastasis in squamous cell carcinoma of the penis using a dynamic sentinel node procedure. **J Urol** 2000; 163:100-4.

Howley PM. Viral carcinogenesis. In: Mendelson J, Howley PM, Israel MA, Liotta LA, editors. **The molecular basis of cancer**. Philadelphia: W.B. Saunders; 1995. p.38-58.

Huben RB. Biology of penile cancer. In: Raghavan D, Scher HI, Leibel SA, Lange PH, editors. **Principles and practice of genitourinary oncology**. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997a. p:921-5.

Huben RB. Clinical presentation and staging of penile cancer. In: Raghavan D, Scher HI, Leibel SA, Lange PH, editors. **Principles and practice of genitourinary oncology**. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997b. p:937-42.

Husseinzadeh N, DeEulis T, Newman N, Wessler T. HPV changes and their significance in patients with invasive squamous cell carcinoma of the vulva: a clinicopathologic study. **Gynecol Oncol** 1991; 43:237-41.

Husman AMR, Walboomers JMM, Van der Brule AJC. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. **J Gen Virol** 1995; 76:1057-62.

Hwang ES, Nottoli T, Dimaio D. The HPV 16 E5 protein: expression, detection, and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells. **Virology** 1995; 211:227-33.

- Iwasawa A, Kumamoto Y, Fujinaga K. Detection of human papillomavirus deoxyribonucleic acid in penile carcinoma by polymerase chain reaction and in situ hybridization. **J Urol** 1993; 149:59-63.
- Jablonska S, Dabrowski J, Jakubowicz K. Epidermodysplasia verruciformis as a model in studies on the role of papovaviruses in oncogenesis. **Cancer Res** 1972; 32:583-9.
- Jackson SM. The treatment of carcinoma of the penis. **Br J Surg** 1966; 53:33-5.
- Jeziorski A, Blonski JZ, Niewiadomska H. The expression of products of oncogenes c-erb B2 and EGFR and proliferating antigens Ki67 and PCNA in primary invasive ductal cancer of female breast. **J Exp Clin Cancer Res** 2000; 19:61-7.
- Johnson DE, Lo RK. Management of regional lymph nodes in penile carcinoma: five years results following therapeutic groin dissections. **Urology** 1984; 24:308-11.
- Johnson DE, Lo RK, Srigley J, Ayala AG. Verrucous carcinoma of the penis. **J Urol** 1985; 133:216-8.
- Johnson DE, Ayala AG. Primary melanoma of the penis. **Urology** 1973; 2:174-6.
- Kamat MR, Kulkarni JN, Tongaonkar HB. Carcinoma of the penis: the Indian experience. **J Surg Oncol** 1993; 52:50-5.

Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. **J Am Stat Assoc** 1958; 53:4457-81.

Kenter GG, Cornelisse CJ, Jiwa NM, Aartsen EJ, Hermans J, Mooi W, Heintz APM, Fleuren GJ. Human papillomavirus type 16 in tumor tissue of low-stage squamous carcinoma of the uterine cervix in relation to ploidy grade and prognosis. **Cancer** 1993; 71:397-401.

King LA, Tase T, Twiggs LB, agaki T, Savage JE, Adcock LL, Prem KA, Carson LF. Prognostic significance of the presence of human papillomavirus DNA in patients with invasive carcinoma of the cervix. **Cancer** 1989; 63:897-900.

Kleihues P, Schauble B, Zur Hausen A, Esteve J, Ohgaki H. Tumors associated with p53 germline mutations. a synopsis of 91 families. **Am J Pathol** 1997; 150:1-13.

Koss LG, Dunfee GR. Usual patterns of squamous epithelium of the uterine cervix. cytology and pathology study of koilocytotic atypia. **Ann N Y Acad Sci** 1957; 63:1245-61.

Kotoulas IG, Cardamakis E, Relakis K, Diamantis A, Papathanasiou Z, Korantzis A, Mantouvalos C. Peoscopic diagnosis of flat condyloma and penile intraepithelial neoplasia. **Gynecol Obstet Invest** 1996; 41:55-60.

Krebs HB, Schneider V. Human papillomavirus-associated lesions of the penis: colposcopy, cytology and histology. **Obstet Gynecol** 1987; 70:299-304.

Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, Kastan MB. Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. **Proc Natl Acad Sci USA** 1992; 89: 7491-5.

Kurman RJ, Schiffman MH, Lancaster WD, Reid R, Jenson AB, Temple GF, Lorincz AT. Analysis of individual human papillomavirus types in cervical neoplasia: a possible role for type 18 in rapid progression. **Am J Obstet Gynecol** 1988; 159: 293-6.

Kuruvilla JH, Garlick RH, Mammen KE. Results of surgical treatment of carcinoma of the penis. **Aust N Z J** 1971; 41:157-9.

Lam KY, Cham ACL, Cham KW, Leung ML, Srivastava G. Expression of p53 and its relationship with human papillomavirus in penile carcinoma. **Eur J Surg Oncol** 1995; 21:613-6.

Leis PF, Stevens KR, Baer SC, Kadmon D, Goldberg LH, Wang XJ. A c-ras mutation in the metastasis of a human papillomavirus (HPV)-18 positive penile squamous cell carcinoma suggests a cooperative effect between HPV-18 and c-ras activation in malignant progression. **Cancer** 1998; 83:122-9.

Levi JE, Rahal P, Sarkis AS, Villa LL. Human papillomavirus DNA and p53 status in penile carcinomas. **Int J Cancer** 1998; 76:779-83.

Levine RU, Crum CP, Herman E, Silvers D, Ferenczy A, Richart RM. Cervical papillomavirus infection and intraepithelial neoplasia: a study of male sexual partners. **Obstet Gynecol** 1984; 64:16-20.

Linzer DIH, Levine AJ. Characterization of a 54 K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. **Cell** 1979; 17:43-52.

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

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

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

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** 1996b; 156:1637-42.

Lopes A, Bezerra ALR, Serrano SV, Hidalgo GS. Iliac nodal metastases from carcinoma of penis treated surgically: analysis of 13 cases. **Br J Urol** 2000; 86:690-3. d

Lorincz AT, Temple GF, Kurman RJ, Jenson AB, Lancaster WD. Oncogenic association of specific human papillomavirus types with cervical neoplasia. **J Natl Cancer Inst** 1987; 79:671-7.

Lowhagen GB, Bolmsted A, Voog E. The prevalence of "high risk"HPV types in penile condyloma-like lesions: correlation between HPV type and morfology. **Genitourin Med** 1993; 69:87-90.

Lowe D, McKee PH. Verrucous carcinoma of the penis (Bushke-Lowestein tumor): a clinicopathological study. **Br J Urol** 1983; 55:427-9.

Lowy DR, Dvoretzky I, Shober R, Law MF, Engel L, Howley PM. In vitro tumorigenic transformation by a defined sub-genomic fragment of bovine papilloma virus DNA.

Nature 1980; 287:72-4.

Lynch Jr DF, Schellhammer PF. Tumors of the penis. In: Walsh PC, Retik AB, Vangham Jr ED, Wein AJ, editors. **Campbell's urology**. 7th ed. Philadelphia: W B Saunders; 1997. p.2453-85.

Maden C, Sherman KJ, Beckman AM, Hislop TG, Teh CZ, Ashley RL, Daling JR. History of circumcision, medical conditions, and sexual activity and risk of penile cancer. **J Natl Cancer Inst** 1993; 85:19-24.

Matsukura T, Kanda T, Furuno A, Yoshikawa H, Tawana T, Yoshike, K. Cloning of monomeric human papillomavirus type 16 DNA integrated within cell DNA from a cervical carcinoma. **J Virol** 1986; 58:979-82.

Mccance DJ, Kalache A, Ashdown K, Andrade L, Menezes F, Smith P, Doll R. Human papillomavirus types 16 and 18 in carcinomas of the penis from Brazil. **Int J Cancer** 1986; 37:55-9.

McCance DJ, Kopan R, Fuchs E, Laimins LA. Human papillomavirus type 16 alters human epithelial cell differentiation in vitro. **Proc Natl Acad Sci USA** 1988; 85:7169-73.

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

Meisels A, Fortim R. Condylomatous lesion of the cervix and vagina: cytologic patterns. **Acta Cytol** 1976; 20:505-9.

Mohs FE, Snow SN, Messing EM, Kuglitsch ME. Microscopically controlled surgery in the treatment of carcinoma of the penis. **J Urol** 1985; 133:961-6.

Morse AR, Wickenden C, Byrne M, Robinson DT, Smith J, Anderson MC, Smith C, Malcolm ADB, Coleman DV. DNA hybridization of cervical scrapes: comparison with cytological findings in Papanicolau smears. **J Clin Pathol** 1988; 41:296-9.

Munger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. **EMBO J** 1989; 8:4099-105.

Munoz N, Bosch FX, Sanjose S, Tafur L, Izarzugaza I, Gili M, Viladiu P, Navarro C, Martos C, Ascunce N, Gonzalez LC, Kaldor JM, Guerrero E, Lorincz A, Santamaria M, Alonso de Ruiz P, Aristizabal N, Shah K. The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a population-based case-control study in Colombia and Spain. **Int J Cancer** 1992; 52:743-9.

Nakagawa S, Yoshikawa H, Onda T, Kawana T, Iwamoto A, Taketani Y. Type of human papillomavirus is related to clinical features of cervical carcinoma. **Cancer** 1996; 78:1935-41.

Narayama AS, Olney LE, Loening AS, Weimar GW, Culp DA. Carcinoma of the penis: analysis of 219 cases. **Cancer** 1982; 49:2185-91.

Ngai SK. The etiological and pathological aspects of squamous-cell carcinoma of the penis among the chinese. **Am J Cancer** 1933; 19:259-84.

Nicolau SM, Martins NV, Ferraz PE, Stavale JN, Gonçalves WJ, Baracat EC, Lima GR. Importance of peniscopy, oncologic cytology and hystopathology in the diagnosis of penile infection by human papillomavirus. **São Paulo Med J** 1997; 115: 1330-5.

O'Brien WM, Jensen AB, Lancaster WD, Maxted WC. Human papillomavirus typing of penile condyloma. **J Urol** 1989; 141:863-5.

O'Connor M, Apt D, Bernard HU. DNA tumor viruses: papilloma. In: Bertino JR, editor. **Encyclopedia of cancer**. San Diego: Academic Press; 1997. p.520-31.

Odland PB. Organ-sparing dermatologic surgical approaches to cancer of the penis. In: Raghavan D, Scher HI, Leibel AS, Lange PH, editors. **Principles and practice of genitourinary oncology**. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p943-8.

O'Hea BJ, Hill ADK, El-Shirbiny AM, Yeh SDJ, Rosen PP, Coit DG, Borgen PI, Cody III HS. Sentinel lymph node biopsy in breast cancer: initial experience at Memorial Sloan-Kettering Cancer Center. **J Am Coll Surg** 1998; 186:423-7.

Olson C, Pamukcu AM, Brobst DF, Kowalczyk T, Satter EJ, Price JM. A urinary bladder tumor induced by a bovine cutaneous papilloma agent. **Cancer Res** 1959; 19:779-82.

Ornellas AU, Seixas ALC, De Moraes JR. Analysis of 200 lymphadenectomies in patients with penile carcinomas. **J Urol** 1991; 146:330-2.

Ornellas AU, Seixas ALC, Marota A, Wisnesky 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.

Orth G, Favre M, Croissant O. Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts. **J Virol** 1977; 24:108-20.

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

Parkin DM, Whelam SL, Ferlay J, Raymond L, Young J, editors. **Cancer incidence in five continents**. Lyon: IARC; 1997. (IARC Scientific Publications, vol. VII, n°143)

Paz IB, Co N, Odom-Maryon T, Xie Y, Wilczynski SP. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer: an association of HPV 16 with squamous cell carcinoma of Waldeyer's tonsillar ring. **Cancer** 1997; 79:595-604.

Perinetti E, Crane DB, Catalona WJ. Unreability of sentinel lymph node biopsy for staging of penile carcinoma. **J Urol** 1980; 124:734-735.

Persky L. Epidemiology of cancer of the penis. **Recent Results Cancer Res** 1977; 60:97-109.

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

Pillai MR, Phanidhara A, Kesari AL, Nair P, Nair MK. Cellular manifestations of human papillomavirus infection in the oral mucosa. **J Surg Oncol** 1999; 71:10-5.

Pim D, Collins M, Banks L. Human papillomavirus type 16 E5 gene stimulates the transforming activity of the epidermal growth factor receptor. **Oncogene** 1992; 7:27-32.

Pinto AP, Signorello LB, Crum CP, Harlow BL, Abrão F, Villa LL. Squamous cell carcinoma of the vulva in Brazil: prognostic importance of host and viral variables.

Gynecol Oncol 1999a; 74:61-7.

Pinto AP, Lin MC, Mutter GL, Sun D, Villa LL, Crum CP. Allelic loss in human papillomavirus-positive and negative vulvar squamous cell carcinomas. **Am J Pathol**

1999b; 154:1009-15.

Pintos J, Franco EL, Black MJ, Bergeron J, Arella M. Human papillomavirus and prognoses of patients with cancers of the upper aerodigestive tract. **Cancer** 1999;

85:1903-9.

Poblet E, Alfaro L, Fernander-Segoviano P, Jimenez-Reyes J, Salido EC. Human papillomavirus-associated penile squamous cell carcinoma in HIV-positive patients. **Am**

J Surg Pathol 1999; 23:1119-23.

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

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

Pretlow TP, Keith EF, Cryar K, Bartolucci AA, Pitts AM, Pretlow II TG, Kimball PM, Boohaker EA. Eosinophil infiltration of human colonic carcinomas as a prognostic indicator. **Cancer Res** 1983; 43:2997-3000

Puras A, Gonzalez-Flores B, Rodriguez R. Treatment of carcinoma of the penis. **Proc Kimbrough Urol Semin** 1978; 12:143-52.

Raghavaiah NV. Corpus cavernosogram in the evaluation of carcinoma of the penis. **J Urol** 1978; 120:423-4.

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.

Riou G, Favre M, Jeannel D, Bourhis J, Doussal VL, Orth G. Association between poor prognosis in early-stage invasive cervical carcinoma and non-detection of HPV DNA. **Lancet** 1990; 335:1171-4.

Riou G, Lê MG, Favre M, Jeannel D, Bourhis J, Orth G. Human papillomavirus-negative status and c-myc gene overexpression: independent prognostic indicators of distant metastasis for early-stage invasive cervical cancers. **J Natl Cancer Inst** 1992; 84:1525-6.

Riveros M, Lebrón RF. Geographical pathology of cancer of the penis. **Cancer** 1963; 16:798-811.

Rose BR, Thompson CH, Cossart YE, Elliot PE, Tattersall MHN. Papillomavirus DNA and prognosis in cervical cancer [letter]. **Lancet** 1991; 337:489.

Rous P. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. **J Exp Med** 1911; 13:397.

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

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

Sanguinetti CJ, Dias NE, Simpson AJG. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques** 1994; 17:3-6.

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

Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley P. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53.

Cell 1990; 63:1129-36.

Scheffner M, Munger K, Byrne JC, Howley PM. The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. **Proc Natl Acad Sci USA** 1991; 88:5523-

7.

Schellhammer PF, Jordan GH, Schlossberg SM. Tumors of the penis. In: Walsh PC, Retik AB, Stamey TA, Vaughan Jr ED, editors. **Campbell's urology**. 6th ed.

Philadelphia: W.B. Saunders; 1992. p.1264-98.

Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush BB, Scott DR, Sherman ME, Kurman RJ, Wacholder S, Stanton CK, Manos MM. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. **J Natl Cancer Inst** 1993; 85:958-64.

Schneider V. Microscopic diagnosis of HPV infection. **Clin Obstet Gynecol** 1989; 32:148-56.

Schneider A, Meinhardt G, De Villiers EM, Gissman L. Sensitivity of the citologic diagnosis of cervical condyloma in comparison with HPV-DNA hybridization studies.

Diag Cytophatol 1987; 3:250-4.

Schwarz E, Freese UK, Gissman L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, Zur Hausen H. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. **Nature** 1985; 314:111-4.

Shirayama T, Takemoto M, Nishiyama K, Nobori T, Kawaara M, Ohyama M, Ohi Y. A new treatment for penile conservation in penile carcinoma: a preliminary study of combined laser hyperthermia, radiation and chemotherapy. **Br J Urol** 1998; 82:687-93.

Shope RE. A filtrable virus causing a tumor-like condition in rabbits and its relationship to virus myxomatosum. **J Exp Med** 1932; 56:803.

Skinner DG, Leadbetter WF, Kelley SB. The surgical management of squamous cell carcinoma of the penis. **J Urol** 1972; 107:273-8.

Smith KT, Campo MS. Papillomavirus and their involvement in oncogenesis. **Biomed Pharmacother** 1985; 39:405-14.

Solsona E, Iborra I, Ricos JV, Monros JL, Dumont R, Casanova J, Calabuig C. Corpus cavernosum invasion and tumor grade in the prediction of lymph node condition in penile carcinoma. **Eur Urol** 1992; 22:115-8.

Sonnex C, Scholefield JH, Kocjan G, Kelly G, Whatrup C, Mindel A, Northover JMA. Anal human papillomavirus infection: a comparative study of cytology, colposcopy and DNA hybridisation as methods of detection. **Genitourin Med** 1991; 67:21-5.

Southern E. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. **J Mol Biol** 1975; 98:503-7.

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

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

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

Stoler MH, Rhodes CR, Whitbeck A, Wolinsky SM, Chow LT, Brer TR. Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. **Hum Pathol** 1992; 23:117-28.

Strand A, Rylander E, Wilander E, Zehbe I, Kraaz W. Histopathologic examination of penile epithelial lesions is of limited diagnostic value in human papillomavirus infection. **Sex Trans Dis** 1996; 23:293-8.

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

Theodorescu D, Russo P, Zhang ZF, Morash C, Fair WR. Outcomes of initial surveillance of invasive squamous cell carcinoma of the penis and negative nodes. **J Urol** 1996; 155:1626-31.

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

Tornesello ML, Buonaguro FM, Beth-Giraldo E, Kyalwazi SK, Giraldo G. Human papillomavirus (HPV) DNA in penile carcinoma and in two cell lines from high-incidence areas for genital cancers in Africa. **Int J Cancer** 1992; 1:587-92.

Tornesello ML, Buonaguro FM, Meglio A, Buonaguro L, Beth-Giraldo E, Giraldo G. Sequence variations and viral genomic state of human papillomavirus type 16 in penile carcinomas from Ugandan patients. **J Gen Virol** 1997; 78:2199-208.

Troncone G, Anderson SM, Herrington CS, De Angelis ML, Noeli H, Chimera JA, McGee JOD. Comparative analysis of human papillomavirus detection by dot blot hybridisation and non-isotopic in situ hybridization. **J Clin Pathol** 1992; 45:866-70.



Ustav M, Stenlund A. Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. **EMBO J** 1991; 10:449-57.

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

Varma VA, Sanchez-Lanier M, Unger ER, Clark C, Tickman R, Hewan-Lowe K, Chenggis ML, Swan DC. Association of human papillomavirus with penile carcinoma: a study using polymerase chain reaction and in situ hybridization. **Hum Pathol** 1990; 22:908-13.

Villa LL. Vírus e câncer. In: Brentani MM, Coelho FRG, Iyeyasu H, Kowalski LP, editors. **Bases da oncologia**. São Paulo: Lemar; 1998. p.71-80.

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

Villa LL, Medeiros AC. Métodos de análise de DNA e RNA. **Rev Soc Cardiol Estado São Paulo** 1995; 3:349-55.

Zur Hausen, H. Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1996; 1288: 55-78.

Zur Hausen H, Meinhof W, Scheiber W, Bornkam GW. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. **Int J Cancer** 1974; 13:650-6.

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

Walker J, Bloss JD, Liao SY, Berman M, Bergen S, Wilczynski SP. Human papillomavirus genotype as a prognostic indicator in carcinoma of uterine cervix. **Obstet Gynecol** 1989; 74:781-5.

Waterhouse J, Muir C, Correa P, editors. **Cancer incidence in five continents**. Lyon: IARC; 1982. p.750-1. (IARC Scientific Publications, v. 4)

Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. **Science** 1990; 248:76-9.

Wespes E, Simon J, Schulmann CC. Cabana's approach: is sentinel node biopsy reliable for staging penile carcinoma? **Urology** 1986; 28:278-9.

Wiener JS, Effert PJ, Humphrey PA, Yu L, Liu ET, Walther PJ. Prevalence of human papillomavirus types 16 and 18 in squamous-cell carcinoma of the penis: a retrospective

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

Wiener JS, Walther PJ. The association of oncogenic human papillomavirus with urologic malignancy. **Surg Oncol Clin North Am** 1995; 4:257-76.

Williams GR, Lu QL, Love SB, Talbot IC, Northover JMA. Properties of HPV-positive and HPV-negative anal carcinomas. **J Pathol** 1996; 180:378-82.

Woolrich J. Cancer del pene en Mexico. **Rev Inst Nac Cancerol** 1964; 15:293-304.

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

ANEXOS

Anexo I Formulário utilizado para obtenção dos dados relativos aos 82 pacientes

01. No.do estudo[][][]
02. RG[][][]
03. Data de admissão..... [][][]
04. Idade à admissão..... [][][]
05. Estado civil: (1)solteiro (2)casado (3)Separado (4) outro (9)Ign.....[][][]
06. Raça: (1)Branca (2)Amarela (3) Não branca (9)Ign..... [][][]
07. Tipo de sintomas/sinais: (1)Ferida (2)Dor (3)Inflamação
(4)Disúria (5)Prurido (6)Outros (9)Ign[][][]
08. Tempo de evolução da doença (meses).....[][][]
09. Antecedentes venéreos (0) Não (1) Sim..... []
10. Postectomia (0) Não (1)Não relacionada (2) Relacionada (9)Ign.....[]
11. Situação à primeira consulta (1)Biopsiado (2)Amputado (3)Esvaziado
(4)Intacto (9)Ign..... []
12. Estadiamento cT (1)T1 (2)T2 (3)T3 (4)T4 (9)TX..... []
12. Estadiamento cN (0)N0 (1)N1 (2)N2 (3)N3 (4)N4 (9) NX.....[]
13. Estadiamento cM (0)M0 1(M1) 9(MX)..... []
14. Data da amputação/ressecção.....[][][]
15. Cirurgia (0)Não (1) Amp. parcial (2) Amp. Total (3)Ressecção (4)Ign.....[]
16. Intenção do esvaziamento (1)Princípio (2) Necessidade (3)Ign.....[]
17. Data do esvaziamento.....[][][]

18. Complicações relacionadas à amputação (0)Não (1)Infecção (2)Deiscência
 (3)Estenose (4)Hemorragia (9) Ign.....[]
19. Complicações relacionadas aos esvaziamentos (0)Não (1)Infecção
 (2)Deiscência (3)Hematoma (4)Necrose (5)Linfedema (6) Rup.vasos[]
20. Número do exame anatomopatológico..... [] [] []
21. Grau de diferenciação (1)Bem diferenciado (2)Moderadamente
 (3)Pouco diferenciado (4)Não classificado (5)Ign.....[]
22. Espessura do tumor (1)Até 1mm (2)1-5mm (3)>5mm (9) Ign.....[]
23. Permeação linfática (0)Não (1)Presente (9)Ign.....[]
24. Embolização venosa (0)Não (1)Presente (9)Ign.....[]
25. Infiltração de corpos cavernosos (0)Não (1)Presente (9)Ign.....[]
26. Infiltração de uretra (0)Não (1)Presente (9)Ign.....[]
27. Infiltrado mononuclear (0)Não (1)Leve (2)Mod (3)Acentuado (4)Ign.....[]
28. Infiltrado eosinofílico (0)Não (1)leve (2)Mod (3)Acentuado (4)Ign..... []
29. Coilocitose (1)Ausente (2)Presente []
30. HPV (1)Ausente (2)Presente..... []
31. Tipo de HPV [] []
32. Total de linfonodos examinados.....[] []
33. Total de linfonodos positivos.....[] []
34. Lateralidade dos linfonodos positivos (1)Unilateral (2)Bilateral (9)Ign.....[] []
35. Nível dos linfonodos positivos (1)Inguinal (2)Ing. +iliaco (3)ilíaco (9)Ign..... [] []
36. Data da recidiva[] [] []
37. Local da recidiva (0)Não (1)coto (2)Regional (3)Pulmões
 (4) Ossos (5)Fígado (6)Distância –outros (9)Ign..... []

38. Tratamento da recorrência (0)Não (1)RHD (2)Local (3)Regional (4)RXT
(5)Qt (6)Outro (9)Ign []
39. Data da última informação objetiva..... [][][]
40. Situação do seguimento (1)Vivo sem doença (2)Vivo com doença
(3)Óbito por câncer (4)Óbito por outras causas (5)Perdido[]

ANEXO 2 Banco de dados relacionando as principais variáveis dos 82 pacientes portadores de carcinoma infiltrativo do pênis.

As abreviaturas utilizadas nas colunas correspondem a:

ID.	Número de identificação de cada caso
RG.	Registro geral do paciente no Hospital A.C.Camargo
Est.T	Estadiamento clínico T (TNM)
Est. N	Estadiamento clínico N (TNM)
Est. M	Estadiamento clínico M (TNM)
Linfad.	Tipo de linfadenectomia realizada (inguinal ou ilioinguinal)
G.hist.	Grau de diferenciação histológica
Espes.tu	Espessura de infiltração do tumor
Emb. linf	Embolização linfática por células neoplásicas
Emb. ven	Embolização venosa por células neoplásicas
Inf. Corpo	Infiltração de corpo cavernoso
Inf. Uretra	Infiltração da uretra
Coiloc.	Coilocitos
Tot. linf	Total de linfonodos dissecados
Linf.+	Número de linfonodos metastáticos

ID	RG	Idade	Raça	Est.T	Est.N	Est.M	Cirurgia	Linfad.	G. hist.	Espes.tu	Perm.linf	Emb.ven
1	530001	49	branca	3	0	0	amp total	Ing.	I	>5mm	presente	ausente
2	530181	62	ñ blanc	3	2	0	amp total	Ing.	I	>5mm	ausente	ausente
3	530330	50	ñ blanc	3	0	0	amp total	Ing.	I	>5mm	ausente	ausente
4	540149	68	branca	2	0	0	amp total	Ing.	I	1 - 5mm	ausente	ausente
5	540569	57	branca	3	0	0	amp total	Ing.	I	1 - 5mm	ausente	ausente
6	540660	42	branca	2	0	0	amp total	Ing.	I	>5mm	presente	presente
7	540978	47	branca	3	2	0	amp total	Ing.	II	>5mm	presente	presente
8	542112	36	branca	2	0	0	amp total	Ing.	I	1 - 5mm	ausente	ausente
9	550670	52	branca	3	2	0	amp total	iliolng.	I	>5mm	ausente	ausente
10	550879	43	branca	3	3	0	amp total	Ing.	I	>5mm	presente	ausente
11	551090	53	branca	3	2	0	amp total	Ing.	I	>5mm	presente	presente
12	552633	44	ñ blanc	2	0	0	amp total	iliolng.	I	>5mm	ausente	ausente
13	560146	71	branca	2	2	0	amp total	iliolng.	I	>5mm	presente	presente
14	561242	41	ñ blanc	3	2	0	amp total	iliolng.	I	>5mm	presente	ausente
15	561408	72	branca	3	2	0	amp total	iliolng.	I	>5mm	ausente	ausente
16	572464	64	branca	2	2	0	amp total	iliolng.	II	1 - 5mm	presente	ausente
17	572484	41	ñ blanc	3	0	0	amp total	iliolng.	III	>5mm	presente	ausente
18	572871	67	branca	3	2	0	amp total	iliolng.	I	>5mm	presente	presente
19	580456	28	branca	3	0	0	amp total	iliolng.	II	>5mm	presente	ausente
20	592229	55	branca	3	3	0	amp total	iliolng.	I	1 - 5mm	presente	ausente
21	593233	56	branca	3	0	0	amp total	iliolng.	II	>5mm	presente	ausente
22	600323	52	branca	3	3	0	amp total	iliolng.	II	>5mm	presente	ausente
23	600644	33	branca	9	2	0	amp total	iliolng.	II	1 - 5mm	presente	ausente
24	601052	49	ñ blanc	3	2	0	amp total	iliolng.	II	>5mm	presente	ausente
25	601085	46	branca	2	1	0	amp parcial	iliolng.	II	1 - 5mm	presente	ignorado
26	602623	45	branca	4	2	0	amp total	Ing.	I	1 - 5mm	ausente	ausente
27	610113	28	ñ blanc	2	0	0	amp total	Ing.	I	>5mm	presente	ausente
28	610174	48	branca	4	2	0	amp total	iliolng.	I	>5mm	presente	ausente
29	611070	77	branca	3	2	0	amp total	Ing.	I	>5mm	presente	presente
30	613443	46	ñ blanc	4	0	0	amp total	iliolng.	I	>5mm	presente	ausente
31	620509	53	branca	3	2	0	amp total	iliolng.	II	>5mm	presente	ausente
32	620699	41	branca	2	0	0	resssecção	iliolng.	I	>5mm	ausente	ausente
33	621623	76	branca	3	1	0	amp total	Ing.	I	1 - 5mm	ausente	ausente
34	621920	42	ñ blanc	3	2	0	amp parcial	Ing.	II	>5mm	presente	ausente
35	622329	32	branca	3	2	0	amp parcial	Ing.	I	1 - 5mm	ausente	ausente
36	622996	27	ñ blanc	2	0	0	amp parcial	iliolng.	I	>5mm	presente	presente
37	623164	53	branca	3	1	0	amp total	Ing.	II	>5mm	presente	ausente
38	631120	60	branca	3	1	0	amp total	iliolng.	II	>5mm	presente	ausente
39	632710	60	ñ blanc	3	3	0	amp total	iliolng.	II	>5mm	presente	ausente
40	640208	33	branca	3	2	0	amp total	iliolng.	I	>5mm	presente	ausente
41	641029	29	branca	3	2	0	amp total	iliolng.	I	1 - 5mm	ausente	ausente
42	641135	51	ñ blanc	3	3	0	amp total	iliolng.	I	>5mm	presente	ausente
43	642016	55	branca	3	2	0	amp total	iliolng.	I	>5mm	presente	ausente
44	651705	77	branca	3	0	0	amp parcial	Ing.	I	>5mm	presente	ausente
45	660069	37	branca	3	3	0	amp total	iliolng.	I	>5mm	ignorado	ignorado
46	660464	28	ñ blanc	2	0	0	amp parcial	Ing.	I	>5mm	presente	ausente
47	660957	61	ñ blanc	2	0	0	amp total	iliolng.	I	>5mm	presente	presente
48	661121	52	branca	2	0	0	amp parcial	iliolng.	I	>5mm	presente	presente
49	661515	62	branca	3	0	0	amp parcial	iliolng.	I	>5mm	ausente	presente
50	671596	55	branca	3	0	0	amp parcial	iliolng.	I	1 - 5mm	ausente	ausente
51	671632	51	branca	3	0	0	amp parcial	Ing.	II	>5mm	ausente	presente
52	673035	63	branca	3	0	0	amp parcial	iliolng.	I	>5mm	presente	ausente
53	680042	57	branca	3	1	0	amp total	iliolng.	I	>5mm	presente	ausente
54	683374	75	branca	3	0	0	amp total	Ing.	II	>5mm	presente	ausente
55	691188	56	branca	2	0	0	amp total	iliolng.	I	>5mm	ausente	ausente
56	691192	46	branca	3	2	0	amp total	iliolng.	II	>5mm	ignorado	ignorado
57	692500	55	ñ blanc	3	1	0	amp total	iliolng.	I	>5mm	ausente	ausente
58	702055	35	branca	2	2	0	amp total	iliolng.	II	1 - 5mm	ausente	ausente
59	702114	41	branca	9	9	0	amp parcial	Ing.	I	>5mm	presente	ausente
60	710376	46	branca	3	3	0	amp total	iliolng.	II	>5mm	presente	ignorado
61	710538	70	branca	2	0	0	amp parcial	iliolng.	I	1 - 5mm	presente	ausente
62	710752	44	branca	3	2	0	amp total	iliolng.	I	>5mm	presente	ausente
63	731581	35	branca	3	2	0	amp parcial	iliolng.	I	>5mm	ausente	ausente
64	733471	67	ñ blanc	4	1	0	amp total	Ing.	I	1 - 5mm	ignorado	ignorado
65	740163	54	ñ blanc	3	3	0	amp total	Ing.	I	>5mm	ausente	ausente

ID	Inf.corpo	Inf.uretra	Coiloc.	DNA do HPV	Tipo HPV	Tot.linf	Linf.+	Seguimento
1	ignorado	presente	ausente	ausente	ausente	21	0	morte por câncer
2	ausente	ausente	ausente	presente	16	39	0	morte por outras causas
3	presente	presente	ausente	presente	16	11	0	morte por outras causas
4	ausente	ausente	ausente	presente	16/18	15	0	morte por outras causas
5	ausente	ausente	ausente	presente	16	10	0	morte por outras causas
6	presente	ignorada	ausente	ausente	ausente	29	0	vivo sem doença
7	presente	presente	ausente	ausente	ausente	10	1	morte por câncer
8	ausente	ignorada	presente	ausente	ausente	13	0	vivo sem doença
9	ausente	presente	ausente	ausente	ausente	40	0	morte por outras causas
10	ausente	presente	presente	ausente	ausente	17	3	morte por câncer
11	presente	ausente	ausente	ausente	ausente	34	0	morte por outras causas
12	ausente	presente	ausente	ausente	ausente	42	0	vivo sem doença
13	ausente	presente	presente	ausente	ausente	48	4	morte por outras causas
14	ausente	presente	presente	ausente	ausente	38	0	vivo sem doença
15	ausente	ausente	presente	ausente	ausente	40	0	morte por outras causas
16	ignorado	ignorada	ausente	ausente	ausente	16	0	morte por câncer
17	presente	ignorada	ausente	ausente	ausente	36	3	morte por câncer
18	presente	presente	ausente	ausente	ausente	29	3	morte por câncer
19	presente	presente	presente	presente	18	37	9	morte por outras causas
20	ignorado	ausente	presente	ausente	ausente	41	3	morte por câncer
21	presente	ausente	ausente	ausente	ausente	56	0	morte por outras causas
22	presente	presente	ausente	ausente	ausente	16	0	morte por outras causas
23	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	33	2	perdido de vista
24	presente	ausente	ausente	ausente	ausente	18	0	perdido de vista
25	ignorado	ignorada	ausente	ausente	ausente	24	2	morte por outras causas
26	ignorado	ausente	ausente	ausente	ausente	23	0	vivo sem doença
27	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	15	0	vivo sem doença
28	presente	ausente	presente	ausente	ausente	32	0	vivo sem doença
29	presente	ausente	ausente	ausente	ausente	10	1	morte por outras causas
30	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	32	0	morte por outras causas
31	presente	presente	ausente	ausente	ausente	21	0	morte por outras causas
32	ausente	presente	presente	ausente	ausente	43	0	vivo sem doença
33	ignorado	ignorada	ausente	presente	16	14	0	morte por outras causas
34	ignorado	ignorada	ausente	ausente	ausente	16	0	morte por outras causas
35	ignorado	ignorada	presente	presente	16	18	0	morte por outras causas
36	presente	ignorada	presente	presente	16	21	3	morte por câncer
37	presente	ignorada	ausente	ausente	ausente	8	1	morte por câncer
38	presente	ignorada	ausente	ausente	ausente	39	2	vivo sem doença
39	ignorado	ausente	ausente	ausente	ausente	35	5	morte por câncer
40	ausente	ignorada	presente	ausente	ausente	44	2	perdido de vista
41	ausente	ignorada	ignorado	presente	6//11	17	0	perdido de vista
42	ausente	ignorada	ausente	presente	16	26	5	morte por câncer
43	ausente	ignorada	ausente	presente	45	22	5	morte por câncer
44	ausente	ignorada	ausente	ausente	ausente	10	2	morte por câncer
45	ignorado	ignorada	presente	presente	31/33/35	20	1	morte por outras causas
46	ausente	ignorada	ausente	presente	51/52	42	0	morte por outras causas
47	presente	ausente	presente	presente	18	29	0	morte por câncer
48	presente	presente	presente	ausente	ausente	54	1	morte por outras causas
49	presente	ignorada	presente	presente	18	33	0	perdido de vista
50	ausente	ignorada	presente	presente	18	38	1	morte por câncer
51	ausente	presente	ausente	presente	16	35	0	vivo sem doença
52	ausente	presente	presente	ausente	ausente	21	0	morte por outras causas
53	ausente	ausente	ausente	presente	16	40	1	morte por outras causas
54	presente	presente	presente	ausente	ausente	28	0	morte por outras causas
55	ausente	presente	presente	ausente	ausente	31	0	morte por câncer
56	ignorado	ignorada	ausente	ausente	ausente	30	3	morte por câncer
57	ausente	ausente	presente	ausente	ausente	45	0	perdido de vista
58	ausente	ausente	presente	ausente	ausente	33	4	vivo sem doença
59	presente	ausente	ausente	presente	31/33/35	18	1	morte por câncer
60	ignorado	ignorada	presente	ausente	ausente	4	4	morte por câncer
61	ausente	presente	presente	presente	16	26	3	morte por câncer
62	ausente	ignorada	presente	ausente	ausente	44	2	vivo sem doença
63	ausente	ausente	presente	presente	16	42	1	vivo sem doença
64	ignorado	ignorada	presente	ausente	ausente	16	0	morte por outras causas
65	ausente	ausente	presente	ausente	ausente	28	3	morte por outras causas

ID	RG	Idade	Raça	Est.T	Est.N	Est.M	Cirurgia	Linfad.	G. hist.	Espes.tu	Perm.linf	Emb.ven
66	741599	36	branca	3	2	0	amp parcial	iliolng.	I	1 - 5mm	ausente	ausente
67	741750	57	branca	3	0	0	amp parcial	iliolng.	I	>5mm	ausente	ausente
68	742221	48	n blanc	2	0	0	amp parcial	iliolng.	I	ignorado	ignorado	ausente
69	742865	54	n blanc	3	2	0	amp parcial	iliolng.	I	>5mm	presente	ausente
70	743150	53	branca	3	0	0	amp parcial	iliolng.	I	1 - 5mm	ausente	ausente
71	763518	65	n blanc	9	9	9	amp parcial	Ing.	I	1 - 5mm	ausente	ausente
72	764245	49	branca	2	0	0	amp parcial	iliolng.	II	>5mm	presente	ausente
73	770373	56	branca	3	0	0	amp parcial	iliolng.	I	>5mm	presente	presente
74	781272	66	branca	4	2	0	amp total	iliolng.	I	>5mm	presente	presente
75	782905	60	branca	3	3	0	amp total	iliolng.	II	>5mm	presente	presente
76	783520	66	n blanc	2	1	0	amp parcial	iliolng.	I	>5mm	presente	presente
77	783925	75	branca	3	0	0	amp total	iliolng.	II	ignorado	ignorado	ignorado
78	784366	45	branca	3	3	0	amp total	Ing.	I	>5mm	presente	presente
79	801157	66	branca	3	0	0	amp parcial	iliolng.	I	1 - 5mm	ausente	ausente
80	812897	52	branca	3	1	0	amp total	iliolng.	I	>5mm	ausente	ausente
81	823097	68	n blanc	3	1	0	amp total	iliolng.	I	>5mm	presente	presente
82	850701	44	branca	4	3	0	amp total	iliolng.	I	1 - 5mm	ausente	ausente

ID	Inf.corpo	Inf.uretra	Coiloc.	DNA do HPV	Tipo HPV	Tot.linf	Linf.+	Seguimento
66	ausente	presente	presente	ausente	ausente	42	0	vivo sem doença
67	ausente	presente	presente	presente	16	21	0	morte por outras causas
68	ausente	ignorada	presente	ausente	ausente	24	6	morte por outras causas
69	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	20	4	perdido de vista
70	ignorado	ignorada	ausente	ausente	ausente	42	0	vivo sem doença
71	ausente	ausente	presente	presente	16	6	0	perdido de vista
72	ausente	ausente	presente	ausente	ausente	29	1	vivo sem doença
73	presente	presente	presente	ausente	ausente	38	1	morte por câncer
74	presente	ignorada	ausente	ausente	ausente	35	2	perdido de vista
75	presente	presente	presente	presente	31/33/35	41	9	morte por câncer
76	presente	ausente	presente	ausente	ausente	85	4	morte por outras causas
77	ignorado	ignorada	presente	ausente	ausente	48	2	morte por outras causas
78	presente	ausente	ausente	ausente	ausente	30	4	morte por câncer
79	ausente	ausente	presente	ausente	ausente	42	3	morte por outras causas
80	presente	ausente	presente	ausente	ausente	27	2	morte por câncer
81	presente	presente	presente	ausente	ausente	42	5	perdido de vista
82	ausente	ausente	presente	presente	06//11	30	0	morte por outras causas