

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DO VÍRUS PAPILOMA HUMANO
E DO ACÚMULO NUCLEAR DA PROTEÍNA P53 COM O
ACOMETIMENTO METASTÁTICO DOS LINFONODOS
REGIONAIS NO CÂNCER DE PÊNIS**

WILSON BACHEGA JÚNIOR

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio Prudente
para a obtenção do título de Mestre em Ciências.**

Área de concentração: Oncologia

**ORIENTADOR:
Dr. Ademar Lopes**

**São Paulo
2000**



FICHA CATALOGRÁFICA

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

Bachega Júnior, Wilson

Estudo da associação do vírus papiloma humano e do acúmulo nuclear da proteína p53 com o acometimento metastático dos linfonodos regionais no câncer de pênis. / Wilson Bachega Júnior – São Paulo, 2000.

76 p

Dissertação(mestrado)–Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Ademar Lopes

Descritores: 1.NEOPLASIAS PENIANAS/metástases. 2.PROTEINA P 53/fator prognóstico. 3.PAPILOMAVIRUS HUMANO/fator prognóstico.

Dedico este trabalho

À Tânia, minha esposa, que com seu carinho me ensinou o verdadeiro significado da palavra amor, que se completou com a Fernanda, nossa filha.

Aos meus pais Wilson e Maria Elisa, porto seguro das tempestades que por volta atravessamos em nossas vidas e fonte de energia para sempre ir em frente.

Aos meus irmãos, William, Marco Aurélio e Karla que sempre estiveram ao meu lado compartilhando cada momento de minha vida.

À minha sogra Antonieta e meus cunhados Renato e Alfredo, pelo apoio e carinho em nossa convivência.

**EXEMPLAR
ESPECIAL**

FUNDAÇÃO ANTONIO
PRUDENTE
BIBLIOTECA

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Ademar Lopes, para mim um exemplo de determinação, disciplina e integridade, tanto profissional quanto pessoal. Representa o ideal do médico formado pelo Hospital do Câncer. Agradeço por ter me dado a oportunidade de realizar este estudo e pela sua orientação.

Ao Prof. Dr. Ricardo Renzo Brentani, por ter implantado a pós-graduação na Fundação Antonio Prudente e pelo constante estímulo à pesquisa entre os médicos do corpo clínico do Hospital do Câncer.

Ao Dr. Humberto Torloni, pelo incentivo, principalmente nas fases iniciais deste trabalho.

À Profa. Dra. Berenice B. Mendonça, pela receptividade com qual me acolheu, onde seu estímulo e orientação foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Ao Dr. Luiz Fernando Lima Reis, pela dedicação na coordenação da pós-graduação.

À Dra. Luisa L. Villa, pelo fornecimento dos dados da pesquisa em laboratório e orientação.

Ao Prof. Dr. Luis Paulo Kowalski, pela orientação da análise das informações.

Ao Dr. Clóvis Antonio Lopes Pinto, pela avaliação das lâminas de anatomia patológica.

Ao Dr. Benedito Mauro Rossi, a tradução do que é ser amigo, com simplicidade e humildade transmite a todos a integridade de seu caráter e qualidade profissional.

Ao Dr. Álvaro Sadek Sarkis o meu muito obrigado pelo estímulo, orientação e revisão na realização deste trabalho, sem a sua ajuda o caminho até o final desta tese teria sido muito mais difícil.

Ao Dr. Gustavo Cardoso Guimarães, pelo apoio diário e toda ajuda, sacrificando por muitas vezes o seu tempo, durante o período de realização deste trabalho.

Aos Drs. Stênio de Cássio Zequi, Francisco Paulo da Flonseca, Wilson T. Nakagawa, Dr. Fábio de Oliveira Ferreira, Valter Penna, Marcos H. Tanaka, Lucíola Assunção, Wu Tu Chung, Arthur Oscar de Souza e Sá e Salim Zequi Garcia, pela amizade e coleguismo em todo este tempo juntos no Departamento de Cirurgia Pélvica.

Às secretárias da pós-graduação Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari e Márcia Miwahiretani por toda ajuda durante o período da realização deste trabalho.

À Inês Nishimoto pelas análises estatísticas.

À Srta. Suely Francisco pela correção das referências bibliográficas e Sra. Rosineia Aguiar Carneiro pela ajuda na pesquisa bibliográfica.

À Srta. Valéria Lombardi, pela ajuda na pesquisa bibliográfica.

À Sra. Hirde Cortesini, pelo auxílio junto aos prontuários do hospital.

Às Secretárias do Departamento de Cirurgia Pélvica, Denise, Ana Gomes, Paula, Patrícia, Cássia, Glauce e o Gustavo, por toda ajuda e na organização de minha agenda durante o período de realização deste trabalho.

Ao Centro de Tratamento e Pesquisa - Hospital do Câncer A C. Camargo, da Fundação Antonio Prudente de São Paulo, local onde possibilitou a minha formação oncológica e que estimula a busca de soluções para o melhor conhecimento e cura do câncer.

SUMÁRIO

1- Introdução	01
2- Objetivos	19
3- Casuística e Métodos	21
3.1- Dados demográficos	22
3.2- Dados Clínicos	22
3.3- Abordagem terapêutica	25
3.4- Exame anatomopatológico	26
3.5- Evolução clínica	27
3.6- Reação de polimerização em cadeia para detecção do HPV	
Tipagem por hibridização com sondas específicas	28
3.7- p53: Anticorpos monoclonais e imunohistoquímica	31
3.8- Análise estatística	33
4- Resultados	
4.1- Análise das variáveis	34
4.2- Presença do papiloma vírus humano	37
4.3- Expressão nuclear da proteína p53	38
4.4- Análise do risco relativo	39
4.5- Tabelas	41
5- Discussão	47
6- Conclusões	58
7- Referências bibliográficas	59

RESUMO



Bachega Jr, W. **Estudo da associação do vírus papiloma humano e do acúmulo nuclear da proteína p53 com o acometimento metastático dos linfonodos regionais no câncer de pênis.** São Paulo; 2000. [Tese de Mestrado - Fundação Antonio Prudente].

O câncer de pênis, embora raro em países desenvolvidos, apresenta uma incidência significativa em regiões de baixas condições sócio-econômicas. O carcinoma espinocelular corresponde ao tipo histológico mais freqüente, presente em mais de 95% das neoplasias primárias deste órgão. Múltiplos fatores como a fimose, a má higiene e a presença do vírus papiloma humano (HPV) podem fazer parte do mecanismo de carcinogênese destes tumores. Pela interação do HPV com a proteína p53, e pela importância deste na gênese e prognóstico de vários tumores, analisamos estes dois fatores quanto a possibilidade de prognosticar o comprometimento neoplásico dos linfonodos regionais nos pacientes portadores de carcinoma primário invasivo do pênis. O comprometimento de linfonodos por doença metastática é o fator prognóstico mais importante desta neoplasia. Foram estudados retrospectivamente 48 casos de carcinoma espinocelular de pênis. A idade variou de 31 a 88 anos, com média de 61 anos. Foram analisadas as possibilidades de associação tanto do acúmulo nuclear anormal da proteína p53 quanto da presença do HPV com o comprometimento metastático dos linfonodos regionais. A proteína p53 foi avaliada por imunohistoquímica, utilizando-se o anticorpo monoclonal Pab1801. A presença do HPV e sua tipagem foram analisadas por PCR e hibridização com sondas específicas, respectivamente. Foram correlacionados com o comprometimento linfonodal as variáveis: presença de HPV, acúmulo da proteína p53, grau de diferenciação celular e óbito pela doença, através do teste Exato de Fisher e o modelo de regressão logística com análises univariadas e multivariadas, para obtenção da estimativa do risco relativo para ocorrência de linfonodos comprometidos. Todos os pacientes que morreram pela doença (15 casos) apresentavam linfonodos comprometidos. Em 10 casos a imunohistoquímica foi positiva para p53 e não encontramos correlação com o comprometimento dos linfonodos regionais ($p = 1$). Encontramos uma correlação marginal com a presença de HPV e uma menor incidência de comprometimento de linfonodo regional, juntamente com os tumores bem diferenciados, tanto na análise univariada quanto na análise multivariada. Aplicando o modelo de regressão logística multivariado, observamos que tumores HPV positivos apresentaram um risco relativo de 0,25 para a presença de linfonodos comprometidos (intervalo de confiança de 0,59 a 1,05 e $p = 0,058$) e que tumores moderadamente diferenciados tiveram um risco relativo de 4,01 para apresentarem linfonodos comprometidos (intervalo de confiança de 0,89 a 18,07 e $p = 0,071$). Portanto, este estudo sugere que pacientes portadores de carcinoma espinocelular de pênis invasivo associado com HPV e/ou tumores bem diferenciados, apresentam uma menor possibilidade de comprometimento metastático dos linfonodos regionais.

SUMMARY

Bachega Jr W. **Analysis of the association of the human papilloma virus and the nuclear accumulation of the p53 protein with metastatic involvement of the regional lymph nodes in the cancer of the penis.** São Paulo; 2000. [Tese de Mestrado - Fundação Antonio Prudente].

Although rare in developed countries, carcinoma of the penis presents a significant incidence in regions of low socioeconomic conditions. Approximately 95% of penile carcinomas are of squamous cell origin. Several factors such as uncircumcised men, poor hygiene and the presence of the human papillomavirus (HPV) may contribute to the carcinogenesis of these tumors. Conflicting data on penile cancer concerning interaction of the HPV with the product of the p53 gene along with the compelling evidences of the importance of the latter in carcinogenesis and prognosis of several cancers, lead us to investigate both factors in a series of penile cancer patients surgically treated at the Hospital do Câncer, São Paulo. Our goal was to determine the value of both molecular analyses, as well as histopathological variables, as predictors of lymph node involvement in patients with primary invasive penile carcinoma treated by penectomy. Lymph node involvement is the most important penile's cancer prognostic variable for disease progression and disease-specific survival. We retrospectively studied 48 patients with of squamous cell carcinoma of the penis. Mean age was 61 years (ranging 31 to 88 years). We studied the association between the abnormal nuclear accumulation of the p53 protein, as well as the presence of the HPV with the presence of lymph node involvement, in penile cancer patients treated by penectomy and subsequent inguinal lymph node dissection. P53 nuclear accumulation was detected by immunohistochemistry using the monoclonal antibody PAb1801. The presence of HPV was detected and characterized by polymerase chain reaction (PCR) followed by hybridization with specific probes. We carried out an analysis of the association between and each of the following variables: p53 nuclear accumulation, presence of HPV, nuclear grade, tumor stage and disease specific mortality. For these analyses, we performed Fisher exact test and univariate and multivariate analysis to obtain relative risk estimates of lymph nodes involvement. All 15 patients that died in the follow-up period had lymph node metastasis. Abnormal accumulation of the p53 were found in 10 cases and no association with lymph node metastasis were found ($p=1.0$). The presence of HPV or low grade tumors approached statistical significance as protective variables to lymphatic metastasis, both in univariate and multivariate analyses. The relative risk to node metastasis for patients with HPV positive tumors was 0.25 (95% confidence interval 0,59 - 1,05; $p = 0,058$) and for intermediate grade tumors was 4,01 (95% confidence interval 0,89 - 18,07; $p = 0,071$). In conclusion, this study suggest p53 nuclear accumulation has no prognostic value. In contrary, patients with penile cancer with HPV infection or of low grade histology harbor lower risk of lymph node metastasis.

INTRODUÇÃO

O câncer de pênis representa cerca de 0,4 a 0,6% dos cânceres que afetam o homem, incide mais freqüentemente em homens com idade entre 50 a 70 anos, sendo que a média de idade ao diagnóstico é de 58 anos. Menos freqüente, mas não desprezível, é a incidência desta doença em indivíduos antes dos 40 anos de idade (22%). Raramente ocorre em crianças (LOPES et al. 1994, RUSSO e GENEGA 2000).

O carcinoma espinocelular é o tipo histológico mais freqüente, correspondendo a mais de 95% dos tumores penianos (BURGERS et al. 1992). O restante é representado por sarcoma, melanoma, carcinoma basocelular e lesão metastática (GENTIL et al. 1965).

Sua ocorrência é rara nos países desenvolvidos, e mais comum nos em desenvolvimento. Nos Estados Unidos ocorre em 0,2 casos para 100.000 habitantes (WATERHOUSE et al. 1982). Nos países da Ásia, África e América do Sul, corresponde a mais de 20% de todas neoplasias malignas do homem e até 45% dos tumores malignos genitourinários (RUSSO e GENEGA 2000). No Brasil a incidência relativa de câncer de pênis é de 2,1% entre todas as neoplasias malignas no sexo masculino, sendo que a distribuição para as regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul corresponde a 5,3%, 5,7%, 3,8%, 1,4% e 1,2%, respectivamente (BRUMINI 1982).

Um fator demográfico interessante relacionado ao câncer de pênis baseia-se na sua maior incidência nas regiões com menor desenvolvimento sócio-cultural. Observa-se uma associação desta neoplasia com a presença de fimose não tratada na infância e más condições de higiene. Em estudo

realizado no Hospital A. C. Camargo em 97,3% dos 648 pacientes com carcinoma de pênis analisados não eram postectomizados, sendo que os pacientes remanescentes o foram somente na vida adulta (LOPES et al. 1993). Na população judaica, onde a circuncisão é realizada ao nascer, o carcinoma de pênis raramente ocorre. Contrariamente, populações nas quais a postectomia é realizada na puberdade, como os muçulmanos, a incidência é maior, comparável com a dos não postectomizados e de bons hábitos de higiene (LICKLIDER 1961, FREW 1967).

A ação do esmegma acumulado por um longo período produz uma ação inflamatória crônica, criando um meio ideal para o crescimento de bactérias como *Mycobacterium smegmatis* e do vírus HPV, possíveis envolvidos na gênese dessa neoplasia. A maioria dos pacientes (69%) com carcinoma peniano possui história pregressa de balanite crônica (BISSADA et al. 1986, BURGERS et al. 1992). A *Mycobacterium smegmatis* converte o esterol do esmegma, sendo a sua atividade carcinogênica evidenciada em animais de laboratório (PRATT-THOMAS et al. 1956). A aplicação de esmegma no colo do útero de camundongo favorece a formação de carcinoma espinocelular (HEINS et al. 1956). A substância carcinogênica do esmegma ainda é desconhecida.

Dados epidemiológicos sugerem a existência de algum fator predisponente ao carcinoma de pênis transmitido por via sexual, à semelhança do que ocorre com o carcinoma do colo uterino. Mulheres de pacientes portadores de carcinoma de pênis possuem um risco relativo 2,8 a 3,2 vezes maior do que a população geral de desenvolver carcinoma do colo

do útero. O inverso também é verdadeiro, isto é, cônjuges de mulheres portadoras de carcinoma do colo do útero possuem uma incidência maior de câncer de pênis e de condilomas que ocorrem no pênis ou na uretra distal (GRAHAM et al. 1979, SMITH et al. 1980, CASTELLSAGUE et al. 1997).

Há vários anos, estudos epidemiológicos tem correlacionado a atividade sexual como um fator de risco para a ocorrência do carcinoma cervical uterino. Tentando-se associar estes dois eventos, no final dos anos 60, o vírus Herpes Simplex tipo 2, através de estudos soroepidemiológicos, foi indicado como o causador do carcinoma cervical uterino (RAWLS et al. 1968, NAHAMIAS et al. 1970). Após 10 anos, com a evolução da identificação viral, o HPV foi reconhecido como agente etiológico desta neoplasia (BOSHART et al. 1984, ZUR HAUSEN 1977, 1986, 1989) . Uma grande variedade de manifestações clínicas da infecção por HPV pode ser identificada, desde lesões subclínicas, verrucosidades, displasias de graus variados e carcinomas.

Atualmente mais de 70 tipos de HPV são descritos (De VILLIERS et al. 1994), sendo os tipos 16 e 18 correlacionados com neoplasias em maior freqüência (SCHWARZ et al. 1985, BEAUDENON et al. 1987). A presença do HPV em carcinoma do colo do útero ocorre em 85 a 90% dos casos. McCANCE et al. (1986) demonstraram a presença do HPV em 27 de 53 (51%) casos de câncer de pênis, VILLA e LOPES (1986) demonstraram em 8 de 18 (44%) casos. Os tipos predominantes foram o 16 e o 18.

O papel de agentes infecciosos, incluindo viroses, no desenvolvimento de tumores epiteliais foi inicialmente postulado por

BORREL (1903). ROUS em 1911 (citado por GRIFFITHS e MELLON 1999, p.579) demonstrou que sarcoma de galinha podia ser experimentalmente transmitido, o que lhe conferiu o prêmio Nobel em 1966. O primeiro vírus correlacionado com tumores em humanos foi o Epstein-Barr, descoberto em 1964 nas células do linfoma de Burkitt, por Epstein. Posteriormente, ANCHONG e BARR (citado por GRIFFITHS e MELLON 1999, p.579) correlacionaram-no o com carcinoma indiferenciado de nasofaringe. Em 1940 suspeitava-se que a hepatite B estaria correlacionada com o hepatocarcinoma e em 1979 foi detectado que o vírus da hepatite B estava integrado com o DNA do hepatocarcinoma (BRECHOT et al. 1980). Estima-se que 15% dos cânceres em humanos estão correlacionados com infecção viral (ZUR HAUSEN 1986). Apesar da associação viral na gênese dessas neoplasias, elas não são consideradas contagiosas, tendo em vista o tempo extremamente longo entre a infecção e o desenvolvimento da neoplasia, e que a infecção viral por si só não é suficiente na gênese do câncer.

O HPV é predominantemente epiteliotrópico, atinge a pele e freqüentemente é encontrado na mucosa do trato anogenital, como vagina e colo do útero. O mecanismo exato dessa seletividade pelo epitélio ainda não está bem esclarecido. O HPV pertence a um subgrupo da família *Papovaviridae*. Pode ser encontrado infectando uma ampla variedade de espécies animais, causando proliferações epiteliais benignas, e está correlacionado com vários tipos de cânceres. Apresenta-se em forma de partículas não envelopadas icosaédricas que contém um genoma de dupla

fita circular, com 7500 a 8000 pares de bases (BAKER et al. 1991, ZUR HAUSEN 1991) (Figura 1).

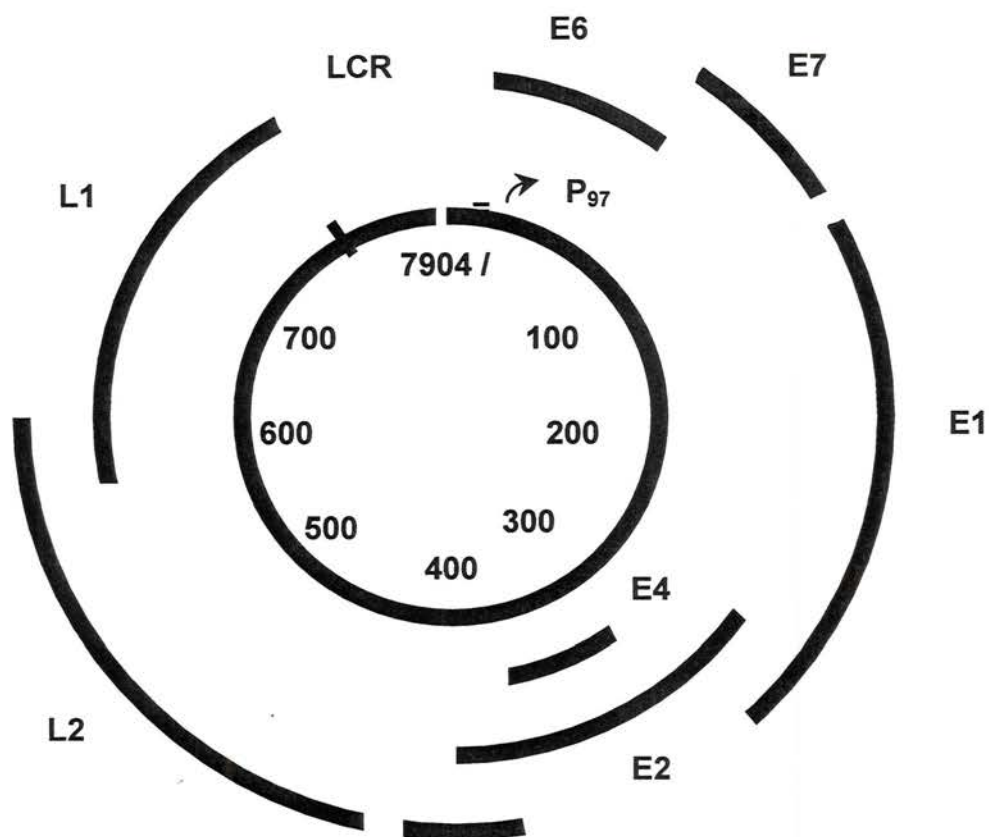


Figura 1 : Genoma do HPV 16

A infecção do HPV ocorre por contato do vírus com áreas onde há perda da integridade da superfície do epitélio, estabelecendo-se na camada basal (STOLER e BROKER 1986). Com o processo de diferenciação e maturação celular da pele ou mucosa, o vírus atinge camadas mais diferenciadas, que finalmente farão o empacotamento do

DNA viral gerando partículas virais. Estes vírus promovem um estímulo à proliferação das células epiteliais, levando a formação de tumorações e verrucosidades. Nos processos benignos este estímulo de hiperproliferação é limitado e regride espontaneamente (PFISTER e FUCHS 1987, ZUR HAUSEN 1988).

A organização molecular do genoma do HPV pode ser dividida em regiões com estruturas gênicas semelhantes, chamadas de precoces e tardias. Em geral, nove a dez genes são encontrados por genoma, sendo 7 ou 8 na região precoce ("Early" - E) e dois na tardia ("Late" - L). As porções do genoma viral com capacidade de codificar proteínas, são denominadas de seqüências de leitura aberta ou "open reading frames" (ORF) (SMOTKIN 1989). Os genes precoces estão envolvidos na replicação do DNA viral (E1 e E8), no controle da transcrição (E2 e E8) e na transformação celular (E5, E6 e E7). A região dos genes tardios (L1 e L2) codificam as proteínas do capsídeo, L1 é a principal proteína de capsídeo, com peso molecular entre 53 a 59 kDa e L2 com aproximadamente 70 kd. Entre L1 e E6 está uma região de 500 a 1000 pares de bases, que representa 10% do genoma viral, responsável pelos elementos reguladores de transcrição e replicação virais, a "Long Control Region" (LCR), também conhecida como "Upstream Regulatory Region" (URR) ou "Non-Coding Region" (NCR) (HOWLEY et al. 1993) (Figura 1). O gene E1 inicia a replicação do genoma viral, e codifica dois polipeptídeos de 68 e 27 kd. A proteína de 68 kd liga-se a uma seqüência específica dentro da origem de replicação e é fundamental para que esta ocorra (SPALHOLZ et al. 1993). O gene E2 regula a transcrição e

replicação dos genomas do HPV e promove, na LCR, uma repressão do promotor (P97 no HPV-16) dos genes E6 e E7 (ROMANCZUK et al. 1992). Estas proteínas, E6 e E7, dos HPVs de alto risco, são as principais responsáveis pelas funções imortalizantes desses vírus (BAKER et al. 1987). O gene E4 está envolvido na maturação e liberação das partículas do HPV.

A diferença básica dentre os mais de 70 tipos distintos de HPV, encontra-se nas regiões E6/E7 e L1, podendo ser classificados em tipos, subtipos e variantes, quanto a homologia do seu genoma nas regiões E6/E7 e L1. Os tipos são classificados quando a homologia é menor que 90%, um subtipo quando a homologia está entre 90% a 98%, já uma variante quando a homologia é maior que 98% (GRIFFITHS e MELLON 1999).

Cerca de 30 tipos diferentes de HPV são encontrados em lesões genitais e com alta associação a lesões malignas. O tipo mais freqüentemente associado à lesões malignas é o HPV 16 em 40% a 60% dos casos, seguido pelo HPV 18 em 10 a 20% dos casos (ZUR HAUSEN 1994). Os considerados de baixo risco estão associados predominantemente com lesões benignas. Desta forma, o HPV também pode ser dividido em três grupos de acordo com a associação a lesões malignas em: baixo risco, os HPV 6 e 11; risco intermediário, HPV tipo 33, 35, 51 e 52; e os de alto risco, tipos 16, 18, 45 e 56 (LORINCZ et al. 1992).

Os HPV 16, 18 e 31 são tipos freqüentemente associados a lesões no trato anogenital com potencial para progressão maligna, podem imortalizar culturas primárias de queratinócitos normais, enquanto que os

tipos 6 e 11 não. No processo de immortalização de queratinócitos humanos normais, foi demonstrado que os HPV 16 e 18 promovem desenvolvimento alterado de diferenciação, gerando células altamente proliferantes que continuam a se dividir indefinidamente sem se diferenciarem (SCHLEGEL et al. 1988). No entanto não são consideradas transformadas (com fenótipo de neoplasia maligna), pois não conseguem gerar a formação de tumor em animais atímicos. Torna-se evidente que são necessárias etapas adicionais para a transformação dessas células em malignas, como por exemplo a ativação de oncogenes ou inibição de genes supressores (STOREY et al. 1988). Vários estudos evidenciam uma ativação pelas proteínas E6/E7, nos tipos 16 e 18, do oncogene *ras*, induzindo a transformação maligna de células em culturas primárias. Células immortalizadas por HPV 16 ou 18 após a introdução do oncogene *Ha-ras* ativado, formam carcinoma espinocelular quando injetadas em camundongos atímicos (DiPAOLO et al. 1989). A proteína E6 de HPV de alto risco tem sido correlacionada na ativação da telomerase, um mecanismo potencial para immortalização HPV induzida (KLINGELHUTZ et al. 1996).

A proteína E7 é uma fosfoproteína nuclear, de 98 aminoácidos. Possui grande afinidade com a proteína produzida pelo gene supressor de tumor retinoblastoma (pRb). A pRb tem como função principal bloquear a progressão do ciclo celular em G1/S. O estado de fosforilação de pRb varia durante o ciclo. Em seu estado ativado, a pRb é hipofosforilada e se liga a vários fatores de transcrição, principalmente os da família E2F. A proteína E7 liga-se à forma hipofosforilada de pRb, revertendo sua função

supressora, liberando E2F do complexo para que possa ativar a transcrição de diferentes genes. Portanto o ciclo celular progride, mantendo a célula hospedeira em constante estado replicativo e favorecendo a replicação do DNA viral (DYSON et al. 1989, TOMMASINO et al. 1993, BOYER et al. 1996).

A proteína E6 é formada por 151 aminoácidos e pode se associar a proteína supressora de tumor p53, promovendo bloqueio de sua função e degradação da mesma. A interação de E6 com p53 requer um fator celular adicional, a proteína E6-AP ("E6-associated protein") (HUIBREGTSE et al. 1993). Essa proteína se liga ao p53 selvagem, promovendo a interação com E6 e induzindo a degradação da proteína p53. Este fato explica baixos níveis de proteína p53 em linhagens derivadas de carcinoma cervical e linhagens de queratinócitos humanos imortalizados pelo HPV (SCHEFFNER et al. 1991).

Durante a infecção viral, o DNA do HPV de alto risco pode integrar-se com o DNA da célula do hospedeiro (YEE et al. 1985, DURST et al. 1987). Esta integração ocorre ao acaso no DNA deste hospedeiro, sem um local específico (YEE et al. 1985). Neste processo, ocorre ruptura da estrutura anelar do vírus, ao nível do gene E2, que é o responsável pelo controle negativo das regiões promotoras dos genes E6 e E7. A perda deste controle negativo se traduz num aumento da expressão destes genes com aumento da produção das proteínas E6 e E7, que se ligam às proteínas supressoras de tumor p53 e pRb respectivamente, causando inativação das

mesmas (THIERRY et al. 1987, ROMANCZUK et al. 1992, DOWHANICK et al. 1995).

Mutações no gene p53 são freqüentes em tumores sólidos, porém o carcinoma gênito-anal é uma exceção, talvez pelo fato do HPV bloquear a ação do p53, sendo esta uma via alternativa para inativação do mesmo, na carcinogênese destes tumores (CHEN et al. 1993).

O gene p53 está localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p), é constituído de 11 exons, possui 20 kb e traduz uma proteína composta por uma cadeia de 393 aminoácidos de 53 kd. A proteína p53 foi descoberta em 1979 como uma proteína que se precipitava em associação com o antígeno T-grande, em extratos de tumores induzidos pelo vírus SV40 (vírus símeo) (LANE e CRAWFORD 1979, LINZER e LEVINE 1979). A proteína p53 formava um complexo com o produto do gene SV40, sendo esta interação importante para a transformação das células. Inicialmente o p53 foi denominado de antígeno tumoral. Estudos com DNA genômico e DNA complementar de p53 em cultura de fibroblastos embrionários de roedores observaram que este apresentava a capacidade de imortalizar as células e quando em ação conjunta com o oncogene *ras* causava transformação destas células (JENKINS et al. 1984), sendo então considerado um oncogene. Posteriormente, após experimentos de transfecção com p53 selvagem em linhagens celulares tumorais, evidenciaram uma redução ou parada da proliferação celular, sendo então denominado de gene supressor (MERCER et al. 1990, DONEHOWER et al. 1992).

Foi observado aumento da expressão deste gene em situações de danos no DNA, como por exemplo decorrentes de radiação ultra-violeta ou gama, presença de radicais livres, reparando-o ou induzindo-o à morte celular programada, ativando a transcrição de vários genes. Assim, a proteína p53 ativa a proteína p21 que promove a parada do ciclo celular em G1, interagindo com o sistema p16-ciclina D1-cdk4-RB (LI et al. 1994). Geralmente um destes quatro genes encontra-se mutado em quase todas as neoplasias malignas. O p16 é o regulador negativo do complexo ciclina-cdk. A proteína do gene retinoblastoma (Rb) liga-se a complexos ciclina D1-cdk4 para regulação do ciclo celular (Figura 2). A proteína Rb regula o complexo E2F-DP, a qual regula uma seqüência de genes que codificam as ciclinas A e E e a proteína PCNA, necessárias para a iniciação da fase S do ciclo celular. A proteína GADD45 também se liga ao PCNA, servindo como um substituto da atividade do p21, ela interage com o antígeno nuclear de proliferação celular, o qual é um importante co-fator da síntese replicativa do DNA (DENG et al. 1995).

O p53 está associado a diversos tumores, em aproximadamente 50% das neoplasias humanas. Estudo de seu seqüenciamento revelou um espectro de mutações que produzem uma proteína defeituosa, sendo mutações de ponto as mais freqüentes. Raramente deleções do gene, que causam ausência da proteína, são descritas. A maior parte das mutações estão localizadas entre os exons 5 a 8. Em análise da distribuição de 560 mutações no gene p53 observou-se que 87% estavam localizadas entre os exons 5 a 8, 8% no exon 4 e 4% no exon 10 (PINHEIRO 1996).

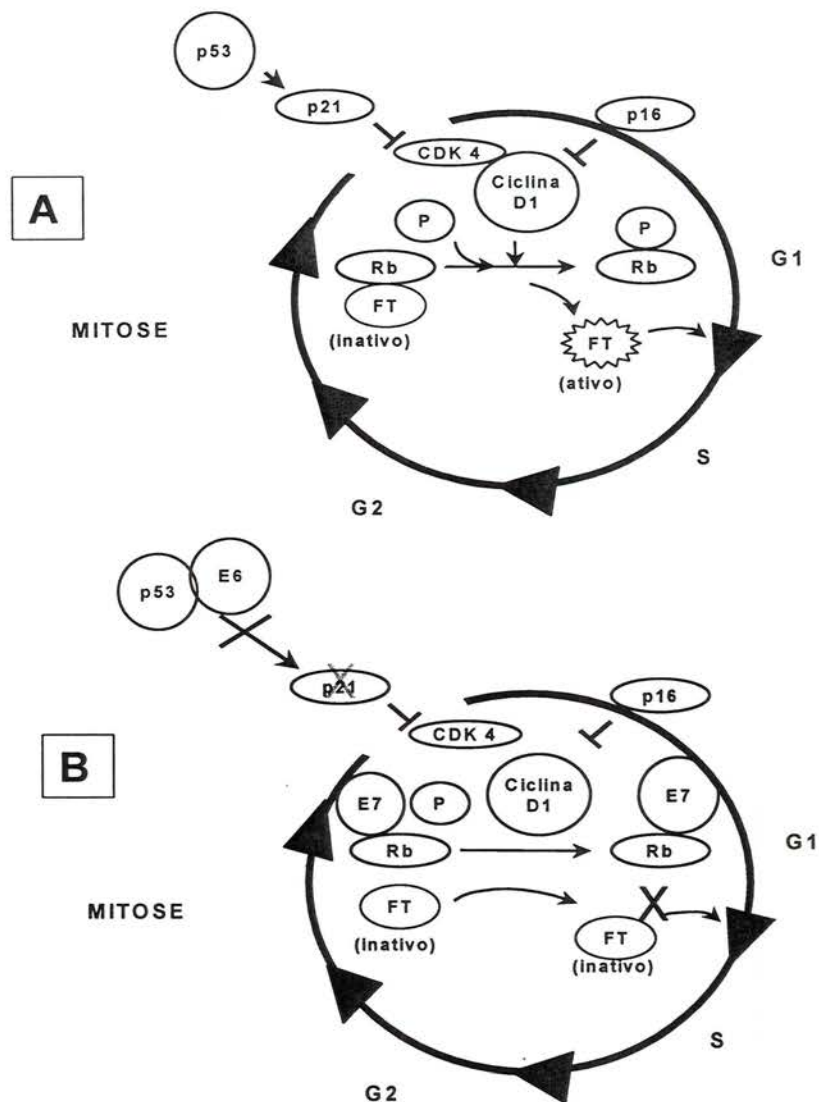


Figura 2: A - Modelo esquemático do ciclo celular
 B - Modelo esquemático das oncoproteínas do HPV
 (Adaptado de FERREIRA e HADDAD 1999)

A proteína p53 está dividida estruturalmente em 4 domínios. O primeiro domínio é constituído pela sequência aminoterminal, que são os primeiros 42 aminoácidos iniciais. Este domínio apresenta a atividade de

transcrição, que é regulada negativamente pela proteína do adenovírus E1B e pela proteína humana MDM2 (LIN et al. 1994, KUSSIE et al. 1996). O segundo domínio é de ligação do DNA e está localizado entre os resíduos de aminoácidos 102 a 292. A manutenção da conformação espacial deste domínio é de fundamental importância para a sua interação direta com o DNA. Noventa por cento das mutações do tipo *missense* ocorrem neste domínio, sendo as mais frequentes R248 e R273, levando a perda da capacidade do p53 de ativar outros genes. Mutações entre os codons 212 a 217 causam uma alteração da estrutura terciária da proteína, o que também leva a perda de sua atividade. O terceiro domínio é de oligomerização. A proteína p53 selvagem age em trêmeros e para tanto, é necessário a manutenção das seqüências entre os codons 324 e 355. A formação de trêmeros é importante para sustentação da sua atividade de transcrição (JEFFREY et al. 1995, CHEO et al. 1996, CHEO et al. 1997). O quarto domínio compreende os últimos 26 aminoácidos, denominado carboxiterminal. Esta seqüência da proteína apresenta-se livre para a identificação e ligação com segmentos complementares de DNA e RNA. A ativação das suas principais funções de "guardião" do genoma pode ser intermediada por esta região. Assim, os produtos de lesão do genoma, como fragmentos curtos de fita única de DNA, ligam-se ao domínio carboxiterminal, ativando o domínio central para a ligação com sítios específicos do genoma. Outra função deste domínio é de catalisar a reassociação das fitas únicas do DNA (JAYARAMAN e PRIVES 1995). Ele se liga às terminações do DNA, bem como às alças de deleção do mesmo

decorrentes de erros de replicação e desencadeia um processo de reparação (LEE et al. 1995).

Na célula normal a proteína p53 está em baixas concentrações e apresenta uma meia vida curta, em torno de 20 minutos. Em situações de dano ao DNA, ocorre um aumento na concentração da proteína decorrente do aumento de sua meia vida ou de sua expressão, os quais são proporcionais à intensidade deste dano (LU et al. 1998). A hipóxia é um fator de ativação da expressão da proteína p53. Sugere-se que clones malignos em fase inicial podem ser abortados por falta de uma neovascularização adequada decorrente da expressão da trombospondina, um fator antiangiogênico, ativado pelo p53 (HOLMGREN et al. 1998, AOTAKE et al. 1999, D'AMICO et al. 1999, TYNER et al. 1999).

A maioria das mutações no p53 ocorrem no domínio de ligação ao DNA. Isto pode significar que a ativação de diversos genes mediada pelo p53 são fatores críticos na formação do câncer. Alguns cânceres superam a função antitumoral do p53, sem a presença de mutações neste gene. Portanto, a perda da função do p53 pode ser decorrente de fatores outros além das mutações no próprio gene. A inativação do p53 normal pode ser decorrente da amplificação do gene MDM2, que ocorre em 30% dos sarcomas (OLINER et al. 1992, CORDON-CARDO et al. 1994, LATRES et al. 1994). Alguns fatores citoplasmáticos poderiam impedir a migração do p53 do citoplasma para o núcleo, presente em alguns casos de tumores de mama e neuroblastoma. A proteína p53 pode apresentar uma degradação aumentada em associação a oncoproteínas virais, como a associação a

proteína E6 produzida pelo HPV. Estudo em vitro verificou que a formação do complexo E6-p53 leva a degradação acelerada do p53 envolvendo o sistema de proteólise dependente de ubiquitina (CIECHANOVER et al. 1991).

Fortes evidências sugerem a importância do p53 no prognóstico e na qualidade da resposta às terapêuticas adjuvantes para os cânceres que acometem os humanos. A terapia adjuvante ao câncer habitualmente baseia-se na indução de danos ao DNA das células. O p53 normal parece atuar complementando as ações dessas terapias, induzindo a apoptose na presença de lesões do DNA. Esta indução da apoptose não ocorre nos tumores onde a proteína p53 está alterada. Teoricamente pacientes portadores de neoplasias com inativação do p53 apresentariam uma resistência às terapias adjuvantes, com implicações prognósticas relevantes, como no tratamento do câncer de pulmão, cólon, reto, bexiga e próstata (APRIKIAN et al. 1993, EASTHAM et al. 1995, AAS et al. 1996, KOMIYA et al. 1999, WEN et al. 1999).

Estudos do p53 poderiam permitir a adequação terapêutica para esses tumores agressivos e individualizar o tratamento para cada paciente, ajustando-se a terapêutica às características determinantes de mau prognóstico, diminuindo assim as chances de progressão e letalidade.

Em carcinoma do colo do útero alguns estudos evidenciaram uma frequência de 100% de mutação do p53 nos casos onde não havia infecção por HPV e raramente nos casos com HPV positivos (CROOK et al. 1991, 1992, SCHEFFNER et al. 1991, SRIVASTAVA et al. 1992). Outros estudos

não confirmaram tal diferença drástica, porém evidenciaram o reduzido número de mutações em HPV positivos de 4% e de 15% em HPV negativos (BORRESEN et al. 1992, CHEN et al. 1993). Na série de pacientes onde este trabalho teve origem, foi encontrada imunorreatividade para o p53 em 26% de 58 casos, sendo 6 (24%) dos 25 casos HPV positivos e 9 (27%) de 33 casos HPV negativos (LEVI et al. 1998). Outro estudo encontrou 17 (40%) de 42 casos com p53 positivo, nenhum caso de carcinoma verrucoso apresentou alteração e todos os casos de imunorreatividade positiva para p53 eram HPV positivos (LAM et al. 1995), em contradição ao que acontece nas pacientes com carcinoma do colo do útero. Entretanto, nenhum destes estudos correlacionou a alteração da proteína p53 com o prognóstico.

O principal fator prognóstico em câncer de pênis, é o comprometimento dos linfonodos regionais. A sobrevida média em 5 anos para pacientes sem metástases linfáticas é de 66% e para os com metástases é de 27% e quando estas não são tratadas raramente sobrevivem mais que 2 anos após o diagnóstico (SUFRIN e HUBEN 1987). As cadeias linfáticas inguinais são os principais sítios de disseminação da doença (BEGGS e SPRATT 1964, POMPEU 1993, SOUZA 1993). As metástases hematogênicas são raras e ocorrem em 1% a 10% dos casos (STAUBITZ et al. 1955, RIVEROS GOROSTIAGA 1962, CAVALCANTI GENTIL 1966, DERRICK et al. 1973). Na evolução natural, os linfonodos metastáticos crescem infiltrando o feixe vâsculo-nervoso ilíaco ou femoral, podendo também infiltrar a pele, ulcerar e infectar. As principais causas de morte são por comprometimento local e regional, devido à hemorragia por

ruptura de grandes vasos, sepsis e caquexia, ocorrendo num período médio de dois anos (BEGGS SPRATT 1964, SKINNER et al. 1972, DERRICK et al. 1973, POMPEU 1993).

A presença de linfonodos inguinais palpáveis na ocasião do diagnóstico do tumor primário varia de 20% a 96% e em média de 58% dos pacientes (SUFRIN e HUBEN 1987). Cerca de 50% dos linfonodos inguinais clinicamente tumorais não apresentam comprometimento anatomopatológico pela neoplasia (BEGGS e SPRATT 1964, CATALONA 1980). Por outro lado 20% dos pacientes com linfonodos clinicamente normais apresentam doença microscópica (BEGGS e SPRATT 1964, deKERNION et al. 1973). Devido a este fato, uma das alternativas para o diagnóstico do comprometimento linfonodal da região inguinal é a realização de linfadenectomias inguinais bilaterais profiláticas de rotina, após a amputação do pênis nos casos de tumores infiltrativos.

As linfadenectomias ilioinguinais são acompanhadas de altos índices de morbidade, variando de 30% a 86,6% (BEGGS e SPRATT 1964, SKINNER et al. 1972, GURSEL et al. 1973, KAMAT et al. 1993). As principais complicações são: necrose do retalho em 14% a 16%, infecção da ferida operatória em 10%, seroma e linfedema irreversíveis em 19% a 50% dos casos (HERR 1992).

As decisões terapêuticas baseadas na avaliação clínica dos linfonodos, mesmo com ultra-sonografia, tomografia computadorizada, linfografia ou exame clínico possui altos índices de falso positivo e falso negativo. A biópsia do linfonodo sentinela despertou grande interesse inicial,

porém atualmente mostrou não ser confiável e até pode prejudicar a evolução do paciente (LOPES et al 1996).

Lopes et al (1996) numa série de 268 linfadenectomias analisaram fatores anatomopatológicos que influenciaram na ocorrência de metástases linfáticas sendo o principal fator a presença de embolização linfática e venosa. Neste estudo, avaliamos a associação entre a presença do vírus papiloma humano com o acúmulo nuclear anormal da proteína p53 correlacionando-os com a incidência de metástase linfonodal no carcinoma espinocelular de pênis.

OBJETIVO

OBJETIVO

Correlacionar o comprometimento metastático dos linfonodos regionais com a presença do vírus papiloma humano e o acúmulo nuclear alterado da proteína p53 no carcinoma de pênis.

JUSTIFICATIVA

O câncer de pênis possui um mau prognóstico quando há envolvimento linfonodal. A progressão desta doença geralmente é locorregional, principalmente para os linfonodos e raramente com metástases viscerais. A via de disseminação mais freqüente é para as cadeias linfáticas inguinais e ilíacas, sendo o comprometimento desses linfonodos a principal causa de morte na evolução da doença. Portanto, é de fundamental importância o conhecimento do estado linfonodal quanto ao comprometimento metastático, para uma abordagem terapêutica adequada e estabelecimento do prognóstico.

O exame clínico para o estadiamento dos linfonodos inguinais é falho, e não há atualmente exames de imagem ou outros métodos não invasivos para a avaliação do comprometimento linfático, sendo uma opção a realização de linfadenectomias profiláticas. Porém essa cirurgia possui uma alta taxa de morbidade, interferindo com grande freqüência na qualidade de vida do paciente. Nos casos onde há a suspeita de comprometimento neoplásico, aproximadamente 50% não estão e cerca de 20% dos casos onde a avaliação clínica do linfonodo é negativa, o mesmo está comprometido. Portanto, se a linfadenectomia profilática for realizada de rotina, um grande número de cirurgias possuirão linfonodos negativos, por outro lado, o exame clínico possui uma alta taxa de falso positivo e falso negativo.

A intenção deste estudo é analisar um provável fator preditivo, não invasivo, para uma possível correlação entre a presença de HPV e a alteração

da expressão da proteína p53 com o comprometimento dos linfonodos regionais no câncer de pênis, possibilitando um melhor conhecimento da biologia desta patologia.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Foram estudados 48 pacientes portadores de carcinoma espinocelular de pênis. Os pacientes foram atendidos inicialmente pelo Departamento de Cirurgia Pélvica do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer A. C. Camargo, da Fundação Antonio Prudente, em São Paulo, Brasil, entre o período de 1984 a 1992, e seguidos até fevereiro de 2000.

As peças operatórias provenientes dos produtos de amputação do pênis foram encaminhadas ao Serviço de Anatomia Patológica, sendo conservadas em blocos de parafina ou o material fresco foi mantido congelado a - 70 °C. A partir deste material, foi avaliado o acúmulo nuclear da proteína p53 e a presença e tipagem do HPV.

Os dados referentes ao diagnóstico, estadiamento, tratamento e seguimento, foram coletados dos prontuários do Serviço de Arquivo Médico e Estatístico do Hospital.

CRITÉRIOS PARA ELEGIBILIDADE AO ESTUDO

- Paciente com diagnóstico histológico de carcinoma espinocelular do pênis.
- Paciente submetido ao tratamento cirúrgico radical do tumor primário.
- Informação anatomopatológica do estado dos linfonodos, ou evidência indubitável ao exame físico de comprometimento tumoral, ou seguimento clínico mínimo de 2 anos para os casos onde inicialmente, ao exame físico, não foi observada metástase linfonodal.

-Avaliação da expressão nuclear da proteína p53 por imunohistoquímica e da presença do HPV por reação de polimerização em cadeia (PCR).

DADOS DEMOGRÁFICOS

A idade variou de 31 a 88 anos, com média de $61 \pm 13,5$ anos e mediana de 62 anos. Vinte e nove pacientes eram brancos, 16 mulatos e 3 negros. Quarenta e dois pacientes apresentavam vida conjugal e 6 não, porém não havia informações sobre o número de parceiros sexuais. A distribuição da procedência do paciente foi: 36 pacientes da região sudeste, 8 do nordeste, 3 do centro-oeste e 1 da região sul.

DADOS CLÍNICOS

AVALIAÇÃO CLÍNICA:

A avaliação clínica foi realizada através de anamnese e de exame físico, com atenção especial em relação ao tumor primário e a presença de linfonodos inguinais clinicamente tumorais, suspeitos ou não comprometidos, estabelecendo-se portanto, o estadiamento local com respeito ao tumor primário e estado linfonodal.

O critério utilizado para o estadiamento é o proposto pela União Internacional Contra o Câncer TNM (HARMER 1978):

Tumor primário (T)

TX tumor primário não pode ser avaliado

T0 sem evidência do tumor primário

Tis carcinoma *in situ*

T1 tumor de 2 cm ou menos em sua maior dimensão. Estritamente superficial ou exofítico

T2 tumor maior que 2 cm, mas não ultrapassa 5 cm na sua maior dimensão

T3 tumor maior que 5 cm na sua maior dimensão ou com extensão profunda incluindo a uretra

T4 tumor invade outras estruturas adjacentes

Linfonodos regionais (N)

NX linfonodo regional não pode ser avaliado

N0 linfonodo regional sem metástases

N1 metástase em linfonodos regionais unilaterais e móveis

N2 metástases em linfonodos regionais fixos

N3 metástases em linfonodos inguinais ou pélvicos, uni ou bilaterais

Metástases à distância (M)

MX metástases à distância não podem ser avaliadas

M0 sem metástases à distância

M1 metástases à distância

A distribuição dos pacientes, após avaliação clínica, utilizando-se a classificação do TNM foi:

1) em relação ao tumor primário (T)

T1 - 7(14,6%),

T2 - 17 (35,4%),

T3 - 19 (39,6%) e

T4 - 5 (10,4%).

2) em relação ao estado dos linfonodos (N):

N0 - 26 (54,1%),

N1 - 09 (18,8%),

N2 - 11 (22,9%) e

N3 - 02 (4,2%).

3) em relação à presença de metástases todos casos foram M0 inicialmente.

ABORDAGEM TERAPÊUTICA

O tumor primário foi tratado com cirurgia em todos os casos. O princípio geral foi a ressecção total do tumor com margem macroscópica mínima de 2 cm. Nos tumores estágio T1, quando possível, foi realizada a ressecção local ou amputação parcial. Nos estádios T2 e T3 foi feita a amputação parcial ou total do pênis.

Nos pacientes sem suspeita clínica de comprometimento metastático dos linfonodos, foi realizada a linfadenectomia profilática inguinal ou foram seguidos clinicamente. Os linfonodos foram avaliados pelo cirurgião no intra-operatório. Linfonodos suspeitos macroscopicamente foram encaminhados ao exame anatomopatológico de congelação. Os casos com comprometimento metastático comprovado por anatomopatológico dos linfonodos inguinais, foram submetidos no mesmo ato operatório à linfadenectomia das regiões ilíacas e obturadoras bilaterais.

A linfadenectomia terapêutica inguinal e/ou ilíaca, unilateral ou bilateral dependendo da cadeia comprometida, foi feita na presença de linfonodos suspeitos ou clinicamente característicos de infiltração tumoral.

A linfadenectomia paliativa foi realizada apenas com a finalidade higiênica em certos casos e para controle de sangramento local ou de dor.

Foram realizadas 18 linfadenectomias, sendo 10 unilaterais e 8 bilaterais, 6 com intenção profilática e 11 terapêutica. Em 1 caso foi realizada a linfadenectomia paliativa com intenção higiênica.

Os casos com estágio T4 ou N3 foram submetidos a quimioterapia neoadjuvante com a intenção de redução da massa tumoral e possibilitar a sua ressecção.

EXAME ANATOMOPATOLÓGICO

As peças operatórias foram fixadas em formol a 10% e avaliadas quanto a extensão e profundidade do comprometimento do órgão, para se estabelecer os critérios de estadiamento. Cortes representativos da peça operatória com a margem de ressecção foram incluídos em parafina e corados pela hematoxilina-eosina. Em todos os pacientes o diagnóstico prévio de carcinoma espinocelular foi confirmado pelo estudo anatomopatológico.

O grau de diferenciação celular foi classificado em: 1) grau I - bem diferenciado - com poucas mitoses, pequeno grau de anaplasia, evidente queratinização e presença de pérolas córneas; 2) grau II - moderadamente diferenciado - numerosas mitoses com atipias e pleiomorfismo celular, pérolas córneas escassas ou ausentes; 3) grau III - pouco diferenciado - mitoses atípicas e freqüentes, acentuado pleiomorfismo e hiperchromasia com predomínio de células pequenas alongadas e indiferenciadas.

Dos 48 tumores avaliados, 33 (68,8%) foram bem diferenciados (grau I), 13 (27,1%) foram moderadamente diferenciados (grau II), 1 pouco

diferenciado (grau III) e em 3 casos não foi possível obter o grau de diferenciação.

EVOLUÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES

O acompanhamento dos pacientes foi realizado através de consultas ambulatoriais mensais no primeiro semestre, bimensais no segundo semestre, trimestrais no 2º e 3º ano e após anuais. Todos os pacientes foram orientados quanto aos sinais clínicos de uma provável recorrência e quanto a necessidade de retornar ao serviço.

Nas consultas foram avaliados de forma sistemática os seguintes sinais e sintomas: presença de dor em hipogástrio ou membros inferiores, aparecimento de nódulo cutâneo, dificuldade miccional, emagrecimento, dispnéia, tosse ou hemoptise. No exame físico foi avaliado o coto peniano quanto à presença de nódulos, lesões ulceradas e quanto a região do implante uretral. Também foram realizadas palpação abdominal e avaliação das cadeias linfáticas cervicais, supraclaviculares, axilares e inguinais. Radiografias torácicas foram feitas anualmente.

Durante o seguimento os pacientes foram classificados da seguinte forma: 1) paciente assintomático sem indícios de recorrência da neoplasia, 2) paciente vivo com doença neoplásica em atividade, 3) óbito decorrente da

doença neoplásica ou de complicações da terapia, 4) óbito decorrente de causas não relacionadas diretamente a neoplasia ou a sua terapia.

O tempo de seguimento em anos foi de: 0,3 a 12,7, média de $5,34 \pm 3,93$ e mediana de 3,96. Para os linfonodos negativos, o tempo de seguimento em anos foi de: 2,25 a 12,6, com média de $7,15 \pm 3,6$ e mediana de 6,6. No final deste estudo a situação dos pacientes era: 24 (50%) vivos sem doença e nenhum com doença em atividade, 15 (31,2%) morreram pela doença e 9 (18,8%) morreram por outras causas.

ESTUDO DO HPV E p53

A avaliação da presença e tipagem do HPV e da expressão da proteína p53 foram realizados por Levi JE, Rahal P, Sarkis AS, Villa LL no Instituto Ludwig de Pesquisa ao Câncer (LEVI et al. 1998).

REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA (PCR) PARA DETECÇÃO DO HPV E TIPAGEM POR HIBRIDIZAÇÃO COM SONDAS ESPECÍFICAS

Inicialmente o DNA do tecido tumoral conservado por congelamento (n = 24) foi extraído a partir da técnica que utiliza proteinase K-fenol-clorofórmio

(VILLA e LOPES 1986). O DNA de tecido conservado em parafina (n = 24) foi extraído através cortes de 6 µm dos blocos de parafina e submetido a sucessivas lavagens com álcool. Este material foi digerido com proteinase K por 3 horas a 55 °C e fervido para inativar a enzima. Um microlitro do sobrenadante foi empregado na PCR.

Condições da PCR: 1 µL de DNA, 40 nM dos *primers* GH20/PCO4 (SAIKI et al. 1986), foram utilizados para amplificar um segmento com 268 pares de bases do gene da β-globina, com o objetivo de ser um controle interno da reação, a fim de verificar a integridade do DNA e evitar resultados falsos negativos para o HPV.

Em reação separada: 1 µL de DNA e 760 nM de cada um dos 3 *sets* de *primers* específicos para HPV, foram utilizados para amplificar segmentos com 116, 111 e 107 pares de bases correspondentes ao gene E6 do HPV. A sequência dos *primers* está descrita abaixo:

HPV – 16 *sense* : 5'ATGTTTCAGGACCCACAGGA3'

HPV – 16 *antisense*: 5'CTCCTGTGGGTCCTGAAACAT3'

HPV – 18 *sense*: 5'ATGGCGCGCTTTGAGGATCC3'

HPV – 18 *antisense*: 5'CTCCTGTGGGTCCTGAAACAT3'

HPV – 6/11 *sense*: 5'ATGGCGCGCTTTGAGGATCC3'

HPV – 6/11 *antisense*: 5'TACACAGGTTATTTCTCATGTC3'

Todas as reações continham uma mistura de 10 mM de Tris-HCl pH 8,3, 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM dos 4 dNTP, e 0,5 U da enzima Taq DNA polimerase (CENBIOT, Brasil). Ciclos da PCR: 1 ciclo de 5 minutos a 94 °C, 40 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 2 minutos a 53°C e 3 minutos a 72°C, e 1 ciclo de 7 minutos a 72°C.

A tipagem do HPV foi realizada pela seguinte metodologia: os produtos de PCR com *primers* específicos para o HPV foram transferidos para membranas de nylon (Amersham, United Kingdom) de acordo com as instruções do fabricante. As membranas foram hibridizadas com as sondas HPV-16, HPV-18 e HPV-6/11, marcadas com P³². A sequência de nucleotídeos de cada sonda está descrita abaixo:

HPV-16: AGTTACCACAGTTATGCACAGAGCTGCA

HPV-18: GACCCTACAAGCTACCTGAT

HPV-6/11: TATATAAACCAGCCCTAAA

Dos 48 pacientes selecionados neste estudo, 33 não apresentaram produto de amplificação na PCR para o gene E6 do HPV (HPV negativo) e 15 apresentaram produto de amplificação nesta reação (HPV positivo), os quais estavam distribuídos na seguinte freqüência de acordo com a tipagem em: cinco com HPV16, dois com HPV6/11, um com HPV18 e sete não eram nenhum dos tipos anteriores (outros).

P53: ANTICORPOS MONOCLONAIS E IMUNOHISTOQUÍMICA

As lâminas originais coradas pela H&E foram reavaliadas por um patologista, para a validação do grau histológico e do estágio cirúrgico destes tumores. A lâmina contendo o tumor mais representativo foi selecionada, em cada caso, para o estudo da expressão nuclear da proteína p53. Cortes de 6µm foram obtidos do bloco correspondente à esta lâmina, para a análise da expressão nuclear da proteína p53 por imunohistoquímica, utilizando-se um anticorpo monoclonal específico, o PAb1801, que reconhece ambas as formas do p53, selvagem e mutante, por ligação a um epítipo localizado entre os aminoácidos 32 e 79, à montante das regiões do gene p53 de risco para o aparecimento de mutações. Outro corte de tumor de cada paciente foi utilizado para o controle negativo da reação. Os cortes representativos dos 48 tumores de pênis foram submetidos à imunohistoquímica para a avaliação da expressão nuclear da proteína p53, com o anticorpo monoclonal PAb1801.

Como controle positivo da expressão nuclear da proteína p53, foram utilizadas lâminas de câncer de mama com mutação do TP53 e expressão nuclear anormal da proteína p53, detectada por imunohistoquímica. Como controle negativo da reação para o anticorpo monoclonal Pab1801, foi utilizado, na mesma concentração, um anticorpo monoclonal da mesma subclasse, o MigS1-Kp-1 (Pharmingen, San Diego, Califórnia, EUA), nos cortes de câncer de mama e em cortes adicionais de cada tumor de pênis analisado.

As lâminas contendo os cortes de 6 µm foram submetidas à

desparafinização e hidratação em três banhos de 10 minutos em xilol, seguidos de três banhos de 10 minutos de cada uma das seguintes soluções: álcool a 100%, a 95% e água destilada. Os espécimes foram então tratados por 15 minutos com peróxido de hidrogênio a 1% (diluído em PBS). O cortes foram incubados com a solução de 10% de soro normal de cavalo por trinta minutos. O excedente de soro foi aspirado e subsequenteemente incubado com o anticorpo monoclonal PAb1801 numa concentração de 200ng/ml. A incubação deste anticorpo primário, foi mantida a 4 °C, por 20 a 24 horas.

Os cortes foram lavados com solução tampão de PBS, e subsequenteemente incubados por 30 minutos com a solução de 1:100 de um anticorpo monoclonal anti-camundongo obtido de cavalo. Este anticorpo secundário é conjugado com moléculas de biotina (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Califórnia, EUA). Em seguida foi feita a incubação com o complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Califórnia, EUA) numa diluição de 1:25 por 30 minutos em temperatura ambiente. A coloração da reação de imunoperoxidase foi feita com diaminobenzidina a 0,06%. A hematoxilina a 1% foi utilizada como contraste do núcleo celular (SARKIS et al. 1993).

A expressão aumentada do p53 foi considerada quando o sinal foi presente em mais do que 5% das células tumorais.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram utilizadas análises estatísticas descritivas (média, mediana e desvio padrão) e de frequência para as variáveis estudadas.

A verificação da associação entre linfonodos e as variáveis HPV, p53, estadiamento, óbito, foi obtida através do teste Exato de Fisher.

O modelo de regressão logística com intervalo de confiança de 95% foi utilizado para obtenção de estimativa do risco relativo com análises univariadas e multivariadas para ocorrência do linfonodo positivo, sendo considerados os fatores HPV, p53 e grau de diferenciação celular.

Foi considerado significativo quando $p < 0,005$.

RESULTADOS

ANÁLISE DAS VARIÁVEIS

IDADE

A idade variou de 31 a 88 anos, com média de $61 \pm 13,5$ anos e mediana de 62 anos. A média de idade entre os pacientes com HPV positivos foi $58,9 \pm 20,2$ e mediana de 58 anos.

GRUPAMENTO ÉTNICO

Com a alta miscigenação racial presente na população brasileira e as informações presentes no prontuário foi possível dividir os pacientes somente em dois grupos étnicos: branco ($n = 29$) e não branco (mulatos $n = 16$ e negros $n = 3$). Quatorze (48,3%) pacientes da raça branca e 7 (36,8%) da raça não branca apresentaram linfonodos positivos ($p = 0,55$) (Tabela 1).

ESTÁDIO T

Dos 48 casos, 7 (14,6%) foram classificados como estágio T1, 17 (35,42%) casos como T2, 19 casos (39,6%) como T3 e 5 casos (10,4%) como T4. Dos pacientes avaliados como T1 nenhum apresentou metástase para linfonodos. Dos casos com estágio T2, 9 apresentavam linfonodos metastáticos, sendo 4 unilaterais e 5 bilaterais. Nos pacientes com estágio T3, em 9 casos os linfonodos estavam comprometidos, 3 unilaterais e 6 bilaterais. Nos casos avaliados como estágio T4, 3 apresentavam-se com linfonodos comprometidos, 1 unilateral e 2 bilaterais ($p = 0,072$) (Tabela 2).

COMPROMETIMENTO METASTÁTICO DE LINFONODOS

Dos 48 pacientes, 26 (54,2%) apresentaram linfonodos clinicamente não comprometidos, destes, 6 (23,1%) foram posteriormente diagnosticados como comprometido baseado pela sua evolução clínica ou por exame anatomopatológico do produto de linfadenectomia bilateral (4 N1 e 2 N2). Vinte e dois (45,8%) pacientes apresentaram linfonodos considerados comprometidos pela avaliação clínica, e 7 destes casos (31,8%) foram posteriormente confirmados como não comprometidos, 4 avaliados inicialmente como N1 e 3 como N2 (Tabela 3).

ESTADO ATUAL DOS PACIENTES

Vinte e um pacientes apresentaram confirmação histopatológica ou seguimento clínico de comprometimento dos linfonodos. Destes, 15 evoluíram a óbito pela doença, dois morreram por outras causas e 4 permanecem vivos após terem sido submetidos à linfadenectomia.

Dentre os 27 pacientes que apresentaram linfonodos negativos, 20 estão vivos sem evidência de doença e 7 morreram por outras causas. Nenhum paciente com N0 morreu por câncer. A correlação estatística entre linfonodo comprometido e óbito pela neoplasia foi altamente significativa ($p < 0,0001$) (Tabela 4).

GRAU DE DIFERENCIAÇÃO HISTOLÓGICA

Em três casos não foi possível a determinação do grau de diferenciação celular e em 1 caso, o carcinoma foi pouco diferenciado. Estes 4 casos não fizeram parte da análise estatística quanto ao grau de diferenciação. De 44 casos, 19 (43,2%) pacientes com carcinoma espinocelular bem diferenciado e 4 (9,0%) com carcinoma espinocelular moderadamente diferenciado apresentaram linfonodos negativos. Dos pacientes com linfonodos comprometidos, 12 (27,3%) eram bem diferenciados e 9 (20,5%) moderadamente diferenciados ($p = 0,09$) (Tabela 1).

PRESENÇA DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

Quinze pacientes (31,3%) apresentaram produto de amplificação na PCR para o gene do HPV (HPV positivos). Classificados quanto ao tipo: 2 foram HPV6/11 (13,3%), 5 foram HPV16 (33,3%), 1 foi HPV18 (6,7%) e 7 (46,7%) casos apresentavam outros tipos de HPV que não os estudados (outros).

Dos 33 pacientes (68,8%) que não apresentaram produto de amplificação na PCR para o gene do HPV a partir de DNA tumoral (HPV negativo), 16 (48,5%) não apresentavam linfonodos comprometidos e 17 (51,5%) estavam comprometidos. Dentre os 15 (31,3%) pacientes com produto de amplificação na PCR (HPV positivos), 11 (73,3%) apresentavam linfonodos não comprometidos (2 com HPV6/11, 4 com HPV16 e 5 o tipo não foi identificado) e 4 (26,7%) apresentavam linfonodos positivos (1 HPV16, 1 HPV18 e em dois casos o tipo do HPV não foi identificado) (Tabela 5). A correlação entre a presença do HPV com o comprometimento linfonodal, foi marginal ($p = 0,13$) (Tabela 1).

Correlacionando a presença e o tipo do HPV com o estágio T, observamos a seguinte associação:

HPV negativo (33 casos): 5 com estágio T1, 11 com T2, 13 com T3 e 4 com T4;

HPV 6/11 (2 casos): 2 com estágio T2;

HPV 16 (5 casos): 3 com estágio T2 e 2 com T3;

HPV 18 (1 caso): 1 com estágio T 3 e

outros (7 casos): 2 com estágio T1, 1 com T2, 3 com T3 e 1 com T4

($p = 0,75$) (Tabelas 6 e 7).

EXPRESSÃO NUCLEAR DA PROTEÍNA P53

Dos 48 casos, 38 (79,2%) tumores apresentaram-se arreativos (p53 negativo) ao anticorpo PAb1801, destes, 17 casos (44,7%) apresentaram acometimento linfonadal.

Acúmulo nuclear anormal da proteína p53 foi encontrada em 10 casos (21%), sendo que em 4 pacientes (40%) havia envolvimento neoplásico dos linfonodos. Dos 21 pacientes com comprometimento dos linfonodos, 17 casos (81%) foram p53 negativos. Não houve associação estatística significativa entre a expressão anormal nuclear da proteína p53 e a presença de linfonodos acometidos ($p = 1$).

A análise da associação entre a expressão da proteína p53 e a presença de HPV, detectada por técnicas moleculares, revelaram positividade de ambos (HPV e p53) em 4 casos. Em 11 casos somente o HPV foi positivo. Em 6 casos apenas o p53 foi positivo. Em 27 (56,3%) casos, tanto o HPV quanto o p53 apresentaram-se negativos (Tabela 8).

ANÁLISE DO RISCO RELATIVO

Aplicando-se o modelo de regressão logística, com análises univariadas e multivariadas, com intervalo de confiança (IC) de 95% e 1,00 como valor de referência, para obtenção da estimativa do risco relativo para ocorrência de linfonodo metastático com as variáveis: p53, HPV e grau de diferenciação celular. Na análise univariada encontramos um risco de 0,34 (IC = 0,09 a 1,3 e $p=0,115$) e na análise multivariada um risco de 0,25 (IC = 0,59 a 1,05 e $p=0,058$) para os tumores com HPV positivo apresentarem linfonodos comprometidos. Estes resultados sugerem que pacientes portadores de carcinoma espinocelular de pênis com HPV positivo apresentam um risco menor em relação aos que não possuem HPV para apresentar metástases em linfonodos regionais, porém com um significado estatístico marginal.

Na avaliação do p53 observou-se que este apresenta na análise univariada um risco de 0,82 (IC = 0,09 a 1,30 e $p=0,788$) e na análise multivariada um risco de 0,76 (IC = 0,14 a 3,96 com $p=0,742$), o que sugere que não há correlação entre o resultado do p53 encontrado e o estado de comprometimento metastático linfonodal regional em pacientes portadores de carcinoma espinocelular de pênis.

O grau de diferenciação celular foi analisado no modelo de regressão logística univariado, encontrando-se um risco relativo de 3,56 (IC = 0,89 a 14,19 e $p=0,072$) para o acometimento linfonodal. A análise multivariada revelou um

risco relativo de 4,01 (IC = 0,89 a 18,07 e $p=0,071$) para tumores moderadamente diferenciados apresentarem linfonodos regionais comprometidos. Estes dados sugerem que os pacientes com tumores moderadamente diferenciados apresentam um maior risco para apresentarem linfonodos regionais comprometidos (Tabela 9).

Tabela 1: Correlação de diferentes variáveis com o comprometimento metastático dos linfonodos regionais.

Variáveis	Linfonodos		p
	Negativo	Positivo	
Raça			
Branca	15	14	0,55
Não Branca	12	07	
Grau de diferenciação celular			
Bem Diferenciado	19	12	0,09
Mod. Diferenciado	04	09	
P53			
Negativo	21	17	1,00
Positivo	06	04	
HPV			
Negativo	16	17	0,13
Positivo	11	04	

Mod. = Moderadamente

Tabela 2: Correlação do estágio T com os linfonodos regionais

Estádio T	Número de casos (%)	Linfonodos	
		positivos (%)	negativos(%)
T1	07 (14,6)	0 (0)	07 (25,9)
T2	17 (35,4)	9 (42,9)	08 (29,6)
T3	19 (39,6)	9 (42,9)	10 (37,1)
T4	05 (10,4)	3 (14,2)	02 (7,4)
Total	48 (100)	21 (100)	27 (100)

p = 0,072

Tabela3: Correlação da avaliação dos linfonodos pela clínica com anatomia patológica ou seguimento

		Nº pcts.	N patológico ou seguimento	
			Positivo	Negativo
N clínico	Positivo	22	15	07
	Negativo	26	06	20
	Total	48	21	27

N clínico: avaliação clínica dos linfonodos

p = 0,003

N patológico ou seguimento: linfonodo avaliado por anatomopatológico ou por seguimento clínico

Tabela 4: Estado atual do paciente correlacionado com o comprometimento dos linfonodos regionais

	nº pcts.	Óbito		vivo SED*
		pela doença	outras causas	
Linfonodo positivo	21	15	02	04
Linfonodo negativo	27	0	07	20
Total	48	15	09	24

* vivo SED: vivo sem evidência de doença

p < 0,0001

Tabela 5: Correlação entre o tipo do HPV com o comprometimento dos linfonodos regionais

Tipo do HPV	nº de casos (%)	Linfonodo	
		positivo	negativo
Negativo	33 (68,8%)	17	16
6/11	02 (4,1%)	0	02
16	05 (10,4%)	01	04
18	01 (2,1%)	01	0
outros	07 (14,6%)	02	05
Total	48 (100)	21	27

p = 0,265

Tabela 6: Correlação entre a presença do HPV e o estágio T

Estádio T	Número de casos (%)	HPV	
		positivos (%)	negativos(%)
T1	07 (14,6)	02 (13,3)	05 (15,2)
T2	17 (35,4)	06 (40)	11 (33,3)
T3	19 (39,6)	06 (40)	13 (39,4)
T4	05 (10,4)	01 (6,7)	04 (12,1)
Total	48 (100)	15 (100)	33 (100)

p = 0,968

Tabela 7: Correlação entre o tipo de HPV e estágio T

Tipo do HPV	nº de casos (%)	T1	T2	T3	T4
Negativo	33 (68,8%)	05	11	13	04
6/11	02 (4,1%)	0	02	0	0
16	05 (10,4%)	0	03	02	0
18	01 (2,1%)	0	0	01	0
outros	07 (14,6%)	02	01	03	01
Total	48 (100)	07	17	19	05

p = 0,765

Tabela 8: Correlação entre a presença de HPV e imunorreatividade do p53

		p53	
		Positivo	Negativo
HPV	Positivo	04	11
	Negativo	06	27
	Total	10	38

p = 0,728

Tabela 9: Modelo de regressão logística com análises univariadas e multivariadas correlacionando HPV, p53 e grau de diferenciação celular com o comprometimento metastático dos linfonodos regionais.

Variáveis	categoria	RR*(95%IC*) Univariada	p	RR**(95%IC*) Multivariada	p
HPV	-	1,00 ref	0,115	1,00 ref	0,058
	+	0,34 (0,09 - 1,30)		0,25 (0,59 - 1,05)	
p53	-	1,00 ref.	0,788	1,00 ref	0,742
	+	0,82 (0,09 - 1,30)		0,76 (0,14 - 3,96)	
Grau	Bem				
	Diferenciado	1,00 ref	0,072	1,00 ref	0,071
	Moderadamente				
	Diferenciado	3,56 (0,89 - 14,19)		4,01 (0,89 - 18,07)	

*IC = Intervalo de confiança
 RR = Risco Relativo
 Ref.= Referência

DISCUSSÃO

O objetivo da terapia em oncologia é o de permitir a resolução completa da neoplasia, com máxima preservação funcional e estética do órgão ou do sistema afetado. Uma avaliação prognóstica imprecisa, baseada em fatores clínicos e histopatológicos vigentes, pode determinar tratamentos mais conservadores em tumores de características biológicas agressivas, prejudicando as possibilidades de cura ou, contrariamente, determinar tratamentos excessivamente agressivos, expondo o paciente a riscos desnecessários, além de poder ocasionar eventuais mutilações ou sérias conseqüências para a qualidade de vida (KOWALSKI 1986). O grande avanço de técnicas de biologia molecular pode contribuir a elucidar com maior precisão, se comparadas aos fatores prognósticos atuais, as características biológicas de cada tumor. Indicações terapêuticas mais adequadas poderiam ser assim delineadas, ou seja, baseadas no potencial de progressão e desenvolvimento de metástases, objetivando-se aumentar as possibilidades de cura dos pacientes portadores de tumores agressivos e aumentar a qualidade de vida dos pacientes com tumores menos agressivos, tratados de maneira mais conservadora. Para conhecer esse equilíbrio, torna-se necessário o conhecimento da evolução da doença e dos fatores que possam predizer ou influenciar sua evolução.

Uma regra aplicável na grande maioria dos planejamentos terapêuticos das neoplasias malignas é o estudo da histologia do tumor seguido da avaliação da extensão do seu comprometimento, tendo-se em vista o tumor primário (T), o comprometimento linfático (N) e a presença de metástases (M). Esses dados são fundamentais para a avaliação

prognóstica e para planejar uma abordagem terapêutica adequada. É uma forma padronizada de avaliação para comunicações científicas e permite a comparação dos resultados entre os serviços.

O tumor primário do pênis inicia-se na pele, progride localmente infiltrando os corpos cavernosos e/ou esponjosos, e demais órgãos e estruturas adjacentes. Geralmente, a principal via de disseminação é a linfática, sendo os linfonodos inguinais a primeira estação comprometida por metástase (CABAÑAS 1977, CATALONA 1988). O acometimento da cadeia linfonodal ilíaca com linfonodos inguinais normais é extremamente raro (HORENBLAS et al. 1991, LOPES 1995). O comprometimento metastático dos linfonodos regionais é o fator indicador do prognóstico mais importante no carcinoma de pênis, estando associado a índices piores de sobrevida (BEGGS e SPRATT 1964, HARDNER et al. 1972, SKINNER et al. 1972, DERRICK et al. 1973, KOSSOW et al. 1973, HORENBLAS e VAN TINTEREN 1994, THEODORESCU et al. 1996, HORENBLAS et al. 2000). Observando-se a evolução natural do carcinoma de pênis, nota-se que raramente a doença evolui com disseminação metastática à distância, ocorrendo em freqüências que variam entre de 1 a 10% (STAUBITZ et al. 1955, RIVEROS e GOROSTIAGA 1962, BEGGS e SPRATT 1964, CAVALCANTI e GENTIL 1966, DERRICK et al. 1973, JOHNSON et al. 1973, KOSSOW et al. 1973, PURAS et al. 1978, LOPES et al. 1996). Neste estudo, somente 2% dos pacientes evoluíram com esta forma de disseminação. Apesar do pênis apresentar um grande fluxo sangüíneo, desconhece-se o fato da baixa freqüência de metástases por via

hematogênica. Portanto, o conhecimento do estado dos linfonodos inguinais é fundamental para o prognóstico e planejamento terapêutico.

Comparando-se a avaliação clínica inicial do estado linfonodal inguinal com o resultado obtido pelo exame anatomopatológico ou com o do seguimento a longo prazo, observamos 23% de falso negativos e 32% de falso positivos, sendo que em 14% houve erro no estadiamento quanto ao lado da cadeia inguinal avaliada. Estes dados mostram que a avaliação clínica inicial dos linfonodos inguinais é falha. Nossos dados são semelhantes aos relatados na literatura onde 50% dos linfonodos clinicamente aumentados ao exame físico não estão comprometidos por neoplasia, como nos revela o estudo anatomopatológico (BEGGS e SPRATT 1964, CATALONA 1980, LOPES et al. 1996). Por outro lado, 20% dos linfonodos considerados negativos podem estar comprometidos (BEGGS e SPRATT 1964, KRAUS e PEREZ-MEZA 1966, HANASH et al. 1970, HARDNER et al. 1972, deKERNION et al. 1973, KOSSOW et al. 1973, WAJSMAN et al. 1977, NARAYANA et al. 1982, JOHNSON e LO 1987; HORENBLAS et al. 1991, LOPES et al. 1996, HORENBLAS et al. 2000).

É controverso a abordagem de pacientes com carcinoma espinocelular de pênis infiltrativo, com linfonodos clinicamente não comprometidos. As alternativas para o diagnóstico da presença de metástase nos linfonodos inguinais são: 1) realização de linfadenectomia inguinal profilática, 2) seguimento cuidadoso e linfadenectomia terapêutica no caso dos linfonodos se tornarem clinicamente positivos, 3) punção com agulha fina do linfonodo suspeito 4) linfadenectomia dos quadrantes mediais,

5) biópsia do linfonodo sentinela, com localização anatômica, dirigida por azul patente ou linfocintilografia, com contraste injetado na base da lesão. A linfadenectomia tem sido associada a altos índices de cura (30% a 70%). Entretanto é também associada a altos índices de morbidade (30 a 50%) e mortalidade (3%) (deKERNION et al. 1973, BOSTWICK et al. 1979, CATALONA 1980, FAIR et al. 1989). Um número significativo de pacientes não apresentam linfonodos comprometidos nas linfadenectomias profiláticas, sendo submetidos a um procedimento de considerável morbidade. Por outro lado, quando não se realiza a linfadenectomia, corre-se o risco de perder o momento da cirurgia e o paciente já se apresentar no retorno com doença irresssecável. McDOUGAL et al (1986) relataram 88% de sobrevida em 5 anos nos pacientes tratados com linfadenectomia profilática e 38% quando a linfadenectomia foi realizada com intenção terapêutica.

A punção com agulha fina e análise da citologia do aspirado só tem valor se o resultado for positivo (WAJSMAN et al. 1982). A biópsia do chamado linfonodo sentinela proposta por CABAÑAS (1977), apresenta um grande número de falso negativo (20%) (PERINETTI et al. 1980, WESPES et al. 1986, PETTAWAY et al. 1995). A realização de uma linfadenectomia inguinal mais conservadora, incluindo apenas os quadrantes mediais em relação a veia safena magna, também não se mostrou confiável, dificultando o diagnóstico nos casos de recorrência. Um método promissor, é a realização da biópsia do linfonodo sentinela dirigido por linfocintilografia, que realiza uma avaliação individual em relação a localização anatômica deste

linfonodo, e mostrou-se superior a linfografia com azul patente em 26% dos casos (HORENBLAS et al. 2000).

Em nossa série foram realizadas 18 linfadenectomias, 6 com intenção profilática e 11 terapêutica. Não foi possível estudar as curvas de sobrevida pelo grande número de pacientes perdidos no seguimento. Este fato provavelmente deve-se porque este é um hospital de referência para tratamento do câncer e atende pacientes que não residem em São Paulo e que apresentam baixo nível sócio-econômico, o que impossibilitou os retornos nas datas previstas.

Vinte pacientes considerados N0 não foram submetidos a linfadenectomia e foram seguidos clinicamente por um período de 2 anos. A possibilidade de um paciente inicialmente ser avaliado clinicamente como N0, e após um período de 2 anos desenvolver doença metastática sem desenvolver linfadenomegalia regional neoplásica, é extremamente rara. Em uma série de 258 pacientes com carcinoma espinocelular de pênis invasivo N0, todos os linfonodos comprometidos foram detectados entre 2 a 17 meses (média = 6,2 meses) (RAVI 1993).

O prognóstico dos pacientes com carcinoma de pênis e metástase linfonodal é reservado. Observamos uma nítida correlação entre óbito pela neoplasia e a presença linfonodo comprometido ($p < 0,0001$), por outro lado nenhum paciente com estágio N0 morreu de câncer.

Em nossa casuística analisamos o p53 por imunohistoquímica, utilizando o anticorpo monoclonal Pab1801. Este anticorpo reconhece um epítopo presente em todos os tipos da proteína p53, quer seja na sua forma

selvagem ou apresentando qualquer tipo de mutação. A proteína p53 selvagem pode ser localizada no núcleo, porém com uma meia vida muito curta e está presente em uma quantidade pequena, não detectável normalmente por testes de imunohistoquímica. Quando ocorre uma alteração da proteína p53, sua degradação torna-se lenta e se acumula dentro do núcleo da célula, passando a ser identificada por reações de imunohistoquímica. Neste estudo, a ausência sistemática de detecção nuclear da proteína p53 em todas as células não tumorais corroborou com dados da literatura nas quais a concentração desta proteína selvagem é mínima na sua forma não mutada, e que a sua detecção por imunohistoquímica representa a detecção da molécula de p53 mutada, na maior parte das vezes. Acúmulo anormal desta proteína, por este anticorpo monoclonal, foi achado exclusivo das células tumorais.

Esse acúmulo nuclear de proteína p53 tem sido correlacionado com um pior prognóstico em vários tumores (HURLIMANN 1993, ZENG et al. 1994, SARKIS et al. 1995, LACOMBE et al. 1996). A proteína p53 pode estar alterada tanto pela presença de mutações no gene p53 quanto pela ação de oncoproteínas virais, como por exemplo do HPV.

Neste estudo encontramos 21% dos casos com acúmulo nuclear anormal da proteína p53, porém não houve uma associação significativa com o comprometimento linfonodal ($p = 1.0$). Na literatura encontra-se imunorreatividade da proteína p53 em aproximadamente 40% dos casos de lesões superficiais, porém raramente encontram-se mutações no gene p53 utilizando-se técnicas de seqüenciamento ou de rastreamento de mutações

(SSCP), este fato pode ocorrer pela inativação da proteína p53 pelo HPV (SCHEFFNER et al. 1991). Na publicação anterior desta série de pacientes, foi encontrada imunorreatividade nuclear da proteína para o p53 em 26% dos 64 casos estudados (LEVI et al. 1998). Houve uma diferença entre a positividade do p53 em relação ao modo de conservação do tumor peniano. Dos 10 casos com p53 positivo, 7 foram provenientes de material conservado em congelação e 3 de parafina. A diferença entre o número de positividade entre o material conservado, por congelação ou parafinado, pode estar também na qualidade do DNA extraído deste material. Em uma coletânea de 84 estudos, com a intenção de comparar a avaliação do p53 com o seqüenciamento do gene p53 em tumores onde não há outra forma de alteração da proteína a não ser pela alteração gênica, verificou-se que o p53 foi positivo por imunohistoquímica em 44% dos tumores e apenas 36% deles continham mutação, sendo a sensibilidade da imunohistoquímica de 75% (PINHEIRO 1996). Portanto uma série de fatores podem interferir no resultado da avaliação da proteína p53, como por exemplo, a degradação da proteína por oncoproteínas virais (E6), qualidade de conservação do material a ser analisado, sensibilidade própria do método de análise pela imunohistoquímica, dentre outros.

Num único estudo publicado para avaliar o comportamento sexual com a incidência de câncer peniano, não houve nenhuma associação entre o início precoce da atividade sexual ou o número de parceiros sexuais durante a vida (HELLBERG et al. 1987). Se um agente sexualmente transmitido estivesse envolvido no desenvolvimento do câncer peniano, o

número de parceiros seria um fator importante. Por outro lado, a presença de neoplasia intraepitelial (PIN) tem sido associada com a presença de neoplasia intraepitelial do colo do útero, contendo tipos idênticos de HPV que seus parceiros sexuais. Alguns estudos documentaram um aumento na incidência de câncer peniano em determinadas localizações geográficas (FRANCO et al. 1988).

Há um aumento na incidência de câncer de colo de útero em esposas de portadores de câncer peniano em algumas casuísticas, porém estes estudos foram objeto de críticas quanto a metodologia empregada. Um estudo caso controle, não foi capaz de correlacionar um aumento no risco de câncer do colo do útero ou câncer vulvar nas esposas de homens portadores de câncer peniano, comparando-as com as esposas de homens sem câncer peniano na Escandinávia (HELLBERG et al. 1989).

Há evidências que o HPV participa de alguma forma na gênese do carcinoma peniano, porém não tão claro quanto a relação com o carcinoma do colo uterino. GRIFFITHS e MELLON (1999) encontraram DNA de HPV em 55% dos carcinomas invasivos do pênis, 92% dos carcinomas *in situ*, 92% das neoplasias intraepiteliais do pênis, 4% das balanites xeróticas obliterantes, 9% em espécimes provenientes de postectomias realizadas em adultos e não detectaram a sua presença em carcinoma verrucoso e postectomias realizadas em neonatos.

Sessenta e seis por cento dos homens com infecção por HPV não apresentam manifestação clínica, 85% dos pacientes com lesões por HPV

os tipos predominantes são o 6 e 11. Lesões subclínicas geralmente estão associadas com HPV tipos 16 e 18 (GRIFFITHS E MELLON 1999).

Pacientes portadores de carcinoma peniano com HPV tendem apresentar uma faixa etária mais baixa. A mediana de idade do estudo foi de 62 anos e a dos pacientes portadores do HPV foi 58 anos.

Pelo longo período entre a infecção do HPV e o desenvolvimento do carcinoma peniano, provavelmente existem outros fatores além do HPV na gênese desta neoplasia, e em uma parte o HPV participa e em outra não.

Este estudo sugere uma correlação com menor incidência de linfonodos comprometidos quando há a presença do HPV, com risco relativo de 0,25 do HPV positivo apresentar metástase linfonodal (intervalo de confiança de 0,59 a 1,05 e $p = 0,058$). Pacientes com lesões de baixo grau também tiveram uma menor incidência de linfonodos comprometidos com um risco relativo de 4,01 (intervalo de confiança de 0,14 a 3,96 com $p = 0,071$). Estes dados foram marginais quanto a significatividade estatística. O contrário tem sido observado em carcinoma do colo do útero. Há a possibilidade da gênese destes tumores serem diferentes.

GREGOIRE L et al. (1995) avaliaram 115 casos com carcinoma de pênis e analisaram a associação da presença do HPV com lesões de alto grau, e a presença do HPV não esteve associada de forma significativa com o comprometimento linfonodal ($p=0,412$). O que era de se esperar que lesões de alto grau em geral possuem uma maior incidência de metástases para os linfonodos. Estes fatos sugerem que quando o HPV participa da

gênese do carcinoma de pênis, o potencial metastático para linfonodos é menor.

Os tumores ano-genitais formam um grupo de neoplasias que tem em comum a participação do HPV. Carcinomas cervicais do útero possuem uma forte associação com a presença do HPV (80% a 90%) (ZUR HAUSEN 1989), os carcinomas do ânus possuem HPV em cerca de 70% dos casos (HIGGINS et al. 1991), e o HPV está associado em 55% dos carcinomas invasivos do pênis, 92% dos carcinomas *in situ*, 92% das neoplasias intraepiteliais do pênis, 4% das balanites xeróticas obliterantes, 9% em espécimes provenientes de postectomias realizadas em adultos e não detectaram a sua presença em carcinoma verrucoso e postectomias realizadas em neonatos (GRIFFITHS e MELLON 1999). Provavelmente cada neoplasia anogenital apresenta seu mecanismo próprio de carcinogênese e o HPV atua participando como um cofator. Possivelmente modelos procurando enquadrar essas neoplasias em um único grupo comparando umas às outras, quanto a evolução clínica e prognóstico, talvez, não sejam corretos. As etapas no desenvolvimento destes tumores necessitam serem melhor esclarecidas, a presença do HPV é sem dúvida um fator importante, mas outros fatores devem ser considerados, investigados e analisados individualmente, para cada tipo destes tumores

O conhecimento do mecanismo de carcinogênese desses tumores poderia ajudar a caracterizar e diferenciar os tumores de alto risco dos de baixo risco de progressão tumoral, de desenvolvimento de metástases e de evoluir a óbito. Neste estudo, embora a análise

imunohistoquímica do acúmulo da proteína p53 não se revelou importante no prognóstico dos pacientes com carcinoma espinocelular tratados por penectomia, houve uma associação marginal entre tumores penianos HPV positivos e um risco relativo menor de apresentar acometimento metastático dos linfonodos regionais. Outros estudos serão necessários para confirmar a importância do HPV como fator protetor à progressão e desenvolvimento de metástases nos pacientes com câncer de pênis.

CONCLUSÕES

1 - O acúmulo nuclear anormal do p53 não se associou com o comprometimento dos linfonodos inguinais destes pacientes.

2 - A presença do HPV no carcinoma espinocelular de pênis, não se associou com o acometimento metastático dos linfonodos regionais, porém houve uma correlação estatística marginal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aas T, Borresen AI, Geisler S, Smith-Sorensen B, Johnsen H, Varhaug JE, Asklen LA, Lonning PE. Specific p53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. **Nat Med** 1996; 2:811-4.

Aotake T, Lu CD, Chiba Y, Muraoka R, Tanigawa N. Changes of angiogenesis and tumor cell apoptosis during colorectal carcinogenesis. **Clin Cancer Res** 1999; 5:135-42.

Aprikian AG, Sarkis AS, Fair WR, Zhang ZF, Fuks Z, Cordon-Cardo C. Immunohistochemical determination of p53 protein nuclear accumulation in prostatic adenocarcinoma. **J Urol** 1994; 151:1276-80.

Baker CC, Howley PM. Structural and translational analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinomas cell lines. **J Virol** 1987; 61:962-71.

Baker TS, Newcomb WW, Olson NH, Cowset LM, Olson C, Brown JC. Structures of bovine and human papillomaviruses: analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. **Biophys J** 1991; 60:1445-6.

Beaudenon S, Kremsdorf D, Obalek S, Jablonska S, Pehaw-Arnaudet G, Croissant O, Orth G. Plurality of genital human papillomaviruses: characterization of two new types with distinct biological properties. **Virology** 1987; 161:374-84.

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

Bissada NK, Morcos RR, El-Senoussi M. Post-circumcision carcinoma of the penis I clinical aspects. **J Urol** 1986; 135:283-5.

Borrel A. Epithelioses infectieuses et epitheliomas. **Ann Inst Pasteur** 1903; 17:81-112.

Borresen AL, Helland A, Nesland J, Holm R, Trope C, Kaern J. Papillomavirus, p53, and cervical cancer. **Lancet** 1992; 339:1350-1.

Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, Zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. **EMBO J** 1984; 3:1151-57.

Bostwick J, Hill HI, Nahal F. Repairs in the lower abdomen, groin, or perineum with myocutaneous or omental flaps. **Plast Reconstr Surg** 1979; 63:186-94.

Boyer SN, Wazer DE, Band V. E7 protein of human papilloma virus 16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. **Cancer Res** 1996; 56:4620-4.

Brechot C, Pourcel C, Louise A, Rain B, Tiollais P. Presence of integrated hepatitis B virus DNA sequences in cellular DNA of human hepatocellular carcinoma. **Nature** 1980; 286: 533-5.

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

Burgers Jk, Badalament RA, Drago JR. Penile cancer clinical presentation, diagnosis and staging. **Urol Clin North Am** 1992; 19:247-56.

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

Castellsague X, Ghaffari A, Daniel RW, Bosch FX, Munoz N, Shah K. Prevalence of penile human virus DNA in husbands of woman with and without cervical neoplasia: a study in Spain and Colombia. **J Infect Dis** 1997; 176:353-61.

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

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.

Cavalcanti S, Gentil FC. Câncer do pênis com metástase solitária no pulmão. **Rev Bras Cir** 1966; 53:267-9.

Chen TM, Chen CA, Hsieh CY, Chang DY, Chen YH, Defendi V. The state of p53 in primary human cervical carcinomas and its effects in human papillomavirus-immortalized human cervical cells. **Oncogene** 1993; 8:1511-8.

Cheo DI, Meira LB, Hammer RE, Burns DK, Doughty AT, Friedberg EC. Synergistic interactions between XPC and p53 mutations in double-mutant mice: neural tube abnormalities and accelerated UV radiation-induced skin cancer. **Curr Biol** 1996; 6:1691-4.

Cheo DI, Ruven HJ, Meira LB, Hammer RE, Burns DK, Tappe NJ, Van Zeeland AA, Mullenders LH, Friedberg EC. Characterization of defective nucleotide excision repair in XPC mutant mice. **Mutat Res** 1997; 374:1-9.

Ciechanover A, Diguseppe JA, Bercovich B, Orian A, Richter JD, Schwartz AL, Brodeur GM. Degradation of nuclear oncoproteins by the ubiquitin system *in vitro*. **Proc Natl Acad Sci USA** 1991; 88:139-43.

Cordon-Cardo C, Latres E, Drobnjak M, Oliva MR, Pollack D, Woodruff JM, Marechal V, Chen J, Brennan MF, Levine AJ. Molecular abnormalities of mdm2 and p53 genes in adult soft tissue sarcomas. **Cancer Res** 1994; 54:794-9.

Crook T, Wrede D, Tidy J, Scholefield J, Crawford L, Vousden KH. Status of c-myc, p53 and retinoblastoma genes in human papillomaviruses positive and negative squamous cell carcinomas of the anus. **Oncogene** 1991; 6:1251-7.

Crook T, Wrede D, Tidy JÁ, Peter Mason W, Evans DJ, Vousden KH. Clonal p53 mutation in primary cervical cancer: association with human-papillomavirus-negative tumours. **Lancet** 1992; 339:1070-3.

D'Amico MDT, Massey MDM, Herndon IIP, Moore MB, Harpole DHJ. A biologic risk model for stage I lung cancer: immunohistochemical analysis of 408 patients with the use of ten molecular markers. **J Thorac Cardiovasc Surg** 1999; 117:736-43.

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

Deng C, Zhang P, Harper JW, Elledge SJ, Leder P. Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. **Cell** 1995; 82:675-84.

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.

De Villiers EM. human pathogenic papillomaviruses: an update. **Curr Top Microbiol Immunol** 1994; 86:1-2.

DiPaolo JA, Woodworth CD, Popescu NC, Notario V, Doniger J. Induction of human cervical squamous cell carcinoma by sequential transfection with human papillomavirus 16 DNA and viral Harvey *ras*. **Oncogene** 1989; 4:395-9.

Donehower LA, Harvey M, Slagle BL. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors. **Nature** 1992; 356:215-21.

Dowhanick JJ, McBride AA, Howley PM. Suppression of cellular proliferation by the papillomavirus E2 protein. **J Virol** 1995; 69:7791-9.

Durst M, Croce C, Gissmann L, Schwarz E, Huebner K. Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some cervical carcinomas. **Proc Natl Acad Sci USA** 1987; 84:1070-4.

Dyson N, Howley PM, Münger K, Harlow E. The human papillomavirus-16E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. **Science** 1989; 243:934-7.

Eastham JA, Stapleton AMF, Gousse AE, Timme TI, Yang G, Slawin KM, Wheeler TM, Scardino PT, Thompson TC. Association of p53 mutations with metastatic prostate cancer. **Clin Cancer Res** 1995; 1:1111-8.

Fair WR, Perez CA, Anderson T. Cancer of the urethra and penis. In: De Vita Jr VT, Hellmann S, Rosenberg AS, editors. **Cancer: principles and practice of oncology**. 3rd ed. Philadelphia: J.B. Lippincott; 1989. p.1059-70.

Ferreira FO, Haddad FJ. Estado atual da biologia molecular dos tumores. In: Rossi BM, Pinho M ed.. **Genética e biologia molecular para o cirurgião**. 1ª ed. Lemar, São Paulo; 1999.p.227.

Franco EL, Campos Filho N, Villa LL, Torloni H. Correlation patterns of cancer relative frequencies with some socioeconomic and demographic indicators in Brazil: an ecologic study. **Int J Cancer** 1988; 41:24-9.

Frew ID, Jefferies JD, Swiney J. Carcinoma of penis. **Br J Urol** 1967; 39:398-404.

Gentil FC, Lima EWL, Abrão A. Melanoma do pênis: relato de dois casos. **Rev Bras Cir** 1965; 52:183-9.

Graham S, Priore R, Graham M, Browne R, Burnet W, West D. Genital cancer in wives of penile cancer patients. **Cancer** 1979; 44:1870-4.

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

Griffiths TRL, Mellon JK. Human papillomavirus and urological tumours: I basic science and role in penile cancer. **BJU Int** 1999; 84:579-86.

Gursel EO, Georgountzos C, Uson AC, Melicow MM, Veenema RJ. Penile cancer: clinicopathology study of 64 cases. **Urology** 1973; 1:569-78.

Hanash KA, Forlow WL, Utz DC, Harrison Jr EG. Carcinoma of the penis: a clinicopathologic study. **J Urol** 1970; 104:291-7.

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 ed. In: **TNM Classification of malignant tumours**. 3^a ed., Geneva, UICC, 1978.p.126-8.

Heins HC, Dennis DJ, Pratt-Thomas HR. The possible role of smegma in carcinoma of cervix. **Am J Obstet Gynecol** 1956; 76:726.

Hellberg D, Valentin J, Eklund T, Nilsson S. Penile cancer: is there an epidemiological role for smoking and sexual behaviour?. **Br Med J** 1987; 295:1306-8.

Hellberg D, Nilsson S. Genital cancer among wives of men with penile cancer: a study between 1958 and 1982. **Br J Obstet Gynaecol** 1989; 96:221-5.

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

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

Holmgren L, Jackson G, Arbiser J. p53 induces angiogenesis-restricted dormancy in a mouse fibrosarcoma. **Oncogene** 1998; 17:819-24.

Horembas S, Van Tinteren H, Delemarre JFM, Moonen LMF, Lustig V, Kröger 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.

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

Horemblas 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. Principles of Viral carcinogenesis. In: Devita Jr WT, Hellman S, Rosenberg SA, **Cancer: Principles of Oncology**. 4^a ed., Philadelphia, JB Lippincott; 1993.p.188-94.

Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM. Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. **Mol Cell Biol** 1993; 13:775-84.

Hurlimann J. Prognostic value of p53 expression in breast carcinomas. **Pathol Res Pract** 1993; 189:996-1003.

Jayaraman J, Prives C. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by short single strands of DNA requires the p53 C-terminus. **Cell** 1995; 81:1021-9.

Jeffrey PD, Gorina S, Pavletich N. Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 17 angstroms. **Science** 1995; 267:1498-502.

Jenkins JR, Rudge K, Currie GA. Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. **Nature** 1984; 312:651-4.

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

Johnson DE, Lo RK. Tumors of the penis, urethra and scrotum. In: Dekernion JB, Paulson DF, editors. **Genitourinary cancer management**. Philadelphia: Lea & Febiger; 1987. p.219-58.

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

Klingelhutz AJ, Foster SA, McDougall JK. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. **Nature** 1996; 380:79-82.

Komiya T, Hirashima T, Kawase I. Clinical significance of p53 in non-small-cell lung cancer. **Oncol Res** 1999; 6:19-28.

Kossow JH, Hotchkiss RS, Morales PA. Carcinoma of penis treated surgically: analysis of 100 cases. **Urology** 1973; 2:169-72.

Kowalski LP. **Fatores prognósticos em carcinomas de laringe tratados por cirurgia**: análise multifatorial de variáveis demográficas, clínicas, anatomopatológicas, e terapêuticas. São Paulo; 1986. [Tese de Doutorado - Escola Paulista de Medicina].

Kraus FT, Perez-Mesa C. Verrucous carcinoma: clinical and pathological study of 105 cases involving oral cavity, larynx and genitalia. **Cancer** 1966; 19:26-38.

Kussie PH, Gorina S, Marechal V, Elenbaas B, Moreau J, Levine AJ, Pavletich N. Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. **Science** 1996; 274:948-53.

Lacombe L, Dalbagni G, Zhang ZF, Cordon-Cardo C, Fair WR, Herr HW, Reuter VE. Overexpression of p53 protein in a high-risk population of patients with superficial bladder cancer before and after bacillus Calmette-Guerin therapy: correlation to clinical outcome. **J Clin Oncol** 1996; 14:2646-52.

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

Lane DP, Crawford L. T-antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. **Nature** 1979; 278:261-3.

Latres E, Drobnjak M, Pollack D, Oliva MR, Ramos M, Karpeh M, Woodruff JM, Cordon-Cardo C. Chromosome 17 abnormalities and TP53 mutations in adults soft tissue sarcomas. **Am J Pathol** 1994; 145:345-55.

Lee S, Elenbaas B, Levine A, Griffith J. p53 and its 14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. **Cell** 1995; 81:1013-20.

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

Li R, Naga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. Different effects of the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. **Nature** 1994; 371:534-7.

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

Lin J, Wu X, Chen J, Chang A, Levine AJ. Functions of the p53 protein in growth regulation and tumor suppression. **Cold Spring Harb Sym Quant Biol** 1994; 59:215-23.

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

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

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

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

Lorincz AT, Reid R, Jenson Ab, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman Rj. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. **Obstet Ginecol** 1992; 79:328-37.

Lu H, Taya Y, Ikeda M, Levine AJ. Ultraviolet radiation, but not gamma radiation or etoposide-induced DNA damage, results in the phosphorylation

of the murine p53 protein at serine-389. **Proc Natl Acad Sci USA** 1998; 71:6399-402.

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

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

Mercer WE, Amim M, Sauve GJ, Appela E, Ullrich SJ, Romano J. Wild type human p53 antiproliferative in SV40-transformed hamster cells. **Oncogene** 1990; 5:973-80.

Nahamias AJ, Josey WE, Naib ZM, Luce CF, Guest BA. Antibodies to herpes virus hominis type I and II in humans: II. Women cervical cancer. **Am J Epidemiol** 1970; 91:522-47.

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

Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DI, Vogelstein B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. **Nature** 1992; 358:80-3.

Perinetti E, Crane DB, Catalona WJ. Unreliability of sentinel lymph node biopsy for staging of penile carcinoma. **J Urol** 1980; 124:734-5.

Pettaway CA, Pisters LI, Dinney CPN, Jularbal F, Swanson DA, Von Eschenbach AC, Ayala A. Sentinel lymph node dissection for penile

carcinoma: the MD Anderson Cancer Center experience. **J Urol** 1995, 154:1999-2003.

Pfister H, Fuchs PG. Papillomaviruses: particles, genome organization and proteins. In: Syrjänen K, Gissmann L, Koss LG (eds.). **Papillomaviruses and human diseases**, Ed. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg; 1987.p.1-18.

Pinheiro NA. **Detecção de mutações no gene p53 em câncer cervical associado ao papilomavírus humano**. São Paulo; 1996. [Dissertação de Mestrado - Instituto de Química da Universidade de São Paulo].

Pompeu ACL. **Linfadenectomia inguinal estadiadora 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 effect of human smegma: an experimental study. **Cancer** 1956; 9:671-80.

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

Ravi R. Prophylactic lymphadenectomy vs observation vs Inguinal biopsy in node-negative patients with invasive carcinoma of the penis. **Jpn J Clin Oncol** 1993; 23:53-8.

Rawls WE, Tompkins WAF, Figueroa ME, Melnick JL. Herpes simplex virus type 2: association with carcinoma of the cervix. **Science** 1968; 161:1255-6.

Riveros M, Gorostiaga R. Cancer of the penis. **Arch Surg** 1962; 85:377-82.

Romanczuk H, Howley PM. Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. **Proc Natl Acad Sci USA** 1992; 89:3159-63.

Russo P, Genega EM. Diagnosis and management of benign and malignant lesions of the penis. Curso Institucional In: **"95th Annual Meeting of American Urology Association"**, 2000, Atlanta, GA.

Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQalpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. **Nature** 1986; 324:163-6.

Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, Zhang ZF, Sheinfeld J, Fair WR, Herr HW, Reuter V. Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: a marker for disease progression. **J Nat Cancer Inst** 1993; 85:53-9.

Sarkis AS, Bajorin DF, Reuter VE, Herr HW, Netto G, Zhang ZF, Schultz PK, Cordon-Cardo C, Scher HI. Prognostic value of p53 nuclear overexpression in patients with invasive bladder cancer treated with neoadjuvant MVAC. **J Clin Oncol** 1995; 13:1384-90.

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.

Schlegel R, Phelps WC, Zhang Y-L, Barbosa M. Quantitative keratinocyte assay detects two biological activities of human papillomaviruses DNA and identifies viral types associated with cervical carcinoma. **EMBO J** 1988; 7:3181-7.

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.

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

Smith PG, Kinlen LJ, White GC, Adelstein AM, Fox AJ. Mortality of wives of men dying with cancer of the penis. **Br J Cancer** 1980; 41:422-8.

Smotkin D. Virology of human papillomaviruses. **Clin Obst & Gynecol** 1989; 32:117-26.

Souza AAO. **Câncer do pênis: incidência e avaliação das diversas formas de tratamento: estudo restropectivo com 455 pacientes no Instituto Nacional do Câncer.** São Paulo; 1993. [Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo].

Spalholz BA, McBride AA, Safan T, Quintero J. Binding of bovine papillomaviruses E1 to the origin is not sufficient for DNA replication. **Virology** 1993; 193:201-12.

Srivastava S, Tong YA, Devadas K, Zou ZQ, Chen Y, Pirollo KF, Chang EH. The status of the p53 gene in human papillomavirus positive or negative cervical carcioma cell lines. **Carcinogenesis** 1992; 13:1273-5.

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

Stoler MH, Broker TS. In situ hybridization detection of human papillomavirus DNA and messenger RNA in genital condylomas and cervical carcinoma. **Human Pathol** 1986; 17:1250-8.

Storey A, Pim D, Murray A, Osborn K, Banks L, Crawford L. Comparison of the in vitro transforming activities of human papillomavirus types. **EMBO J** 1988; 7:1815-20.

Sufrin G, Huben R. Benignant and malignant lesions of the penis In: Gillewnateer JY. **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.

Thierry F, Yaniv M. The BPV1-E2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV18 regulatory region. **EMBO J** 1987; 6:3391-7.

Tommasino M, Adamczewsk JP, Carlotti F, Barth CF, Manetti R, Contorni M, Cavalieri F, Hunt T, Crawford L. HPV 16 E7 associates with the protein kinase p33^{cdk2} and cyclin A. **Oncogene** 1993; 8:195-202.

Tyner SD, Choi J, Lauricica R, Ford RJ, Donehower LA. Increased tumor cell proliferation in murine tumors with decreasing dosage of wild-type p53. **Mol Carcinog** 1999; 24:197-208.

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

Wajsman Z, Moore RH, Merrin CE, Murphy G. Surgical treatment of penile cancer: a follow-up report. **Cancer** 1977; 40:1697-9.

Wajsman Z, Gamarra M, Park JJ. Fine needle aspiration of metastatic lesions and regional lymph nodes in genitourinary tract. **Urology** 1982; 19:356-60.

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

Wen WH, Reles A, Runnebaun IB, Sullivan-Halley J, Bernstein L, Jones LA, Felix JC, Kreienberg R, Elnaggar A, Press MF. P53 mutations and expression in ovarian cancers: correlation with overall survival. **Int J Gynecol Pathol** 1999; 18:29-41.

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

Yee CI, Krishnan-Hewlett I, Baker CC, Schlegel R, Howley PM. Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. **Am J Pathol** 1985; 119:361-6.

Zeng ZS, Sarkis AS, Zhang ZF, Klimstra DS, Charytonowicz E, Guillem JG, Cordon-Cardo C, Cohen AM. p53 nuclear overexpression: an independent predictor of survival in lymph node-positive colorectal cancer patients. **J Clin Oncol** 1994; 12:2043-50.

Zur Hausen H. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. **Curr Top Microbiol Immunol** 1977; 78:1-30.

Zur Hausen H. Intracellular surveillance of persisting viral infections: human genital cancer resulting from a failing cellular control of papillomavirus-gene expression. **Lancet** 1986; 2:489-91.

Zur Hausen H. Papillomaviruses in human cancers. **Mol Carcinogenesis** 1988; 1:147-50.

Zur Hausen H. Papillomavirus in anogenital cancer as a model to understand the role of viruses in human cancers. **Cancer** 1989; 49:4677-81.

Zur Hausen H. Viruses in human cancers. **Science** 1991; 254:1167-73.

Zur Hausen H, De Villiers EM. Human papillomavirus. **Ann Ver Microbiol** 1994; 48:427-47.