

Prevalência da Infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) em Homens Sexualmente Ativos, Portadores de Câncer de Pênis do Estado de Goiás¹

Alexandre Magno Bahia Reis², Megmar Aparecida dos Santos Carneiro³, Nativa Helena Alves Del-Rios⁴, Dulce Helena Rebouças Souza⁵, Adriano Augusto Peclat⁶, Márcia Alves Dias de Matos⁷

Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO 74605020, Brasil
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO 74605050, Brasil

E-mail: alexandre_mbreis@hotmail.com, megmar@iptsp.ufg.com,
nativa_rios@yahoo.com.br, dlceu@hotmail.com, adrianopaula@brturbo.com.br,
marciaalvesdias@yahoo.com.br

PALAVRAS-CHAVE: carcinoma de pênis, HPV

1. Introdução

O câncer de pênis (CP) é uma neoplasia rara, cujo tratamento causa efeitos físicos e metais devastadores nos pacientes, sendo considerado um grave problema de saúde pública (Holland et al., 2003; Favorito et al., 2008; Koifman et al., 2011). A baixa incidência desta doença nos países desenvolvidos, em contraste com a alta incidência nos países em desenvolvimento, indica claramente a associação da doença com perfil socioeconômico de cada país (de Paula et al., 2005; Silva Reis et al., 2010).

¹ Revisado pelo orientador.

² Orientando e Acadêmico do 7º período de Medicina - Universidade Federal de Goiás, Aluno Voluntário de Iniciação Científica.

³ Orientadora Prof. Dra. do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública - Universidade Federal de Goiás.

⁴ Mestre em Medicina Tropical pelo Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública - Universidade Federal de Goiás.

⁵ Aluna de Pós-Graduação em Medicina Tropical pelo Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública - Universidade Federal de Goiás.

⁶ Aluno de Pós-Graduação em Medicina Tropical pelo Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública - Universidade Federal de Goiás.

⁷ Prof. Dra. do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública - Universidade Federal de Goiás.

O Brasil é um país com uma das maiores incidências de câncer de pênis no mundo, a frequência dessa neoplasia é variável, dependendo da região estudada. O Instituto Nacional do Câncer estimou mais de 4600 casos de câncer de pênis no Brasil em 2009, sendo a região Nordeste a mais prevalente (INCA, 2010). Segundo dados não publicados do Registro de Câncer de Base Populacional de Goiânia-GO, referentes ao período de 2000 a 2008, a incidência anual de CP em Goiás variou de 0,87 a 2,03 casos novos/100.000 homens.

A etiologia do câncer de pênis ainda não foi completamente elucidada, podendo ser considerada como multi-fatorial. O principal fator de risco para CP é a higiene precária, às vezes corroborada pela presença de fimose na vida adulta (Daling et al., 2005; McDougal, 2005; Bleeker et al., 2009). Pois a fimose pode favorecer a persistência de infecções bacterianas (*Mycobacterium smegmatis*) e virais (HPV) na genitália masculina (Reis et al., 2010).

A presença do HPV em carcinomas de pênis foi demonstrada pela primeira vez, no Brasil em 1986 por Villa e colaboradores. Estudos moleculares demonstram que mais de 50% dos carcinomas de pênis apresentam DNA de HPV (Chan et al., 1994; Torsenello et al., 2008; Cubilla et al., 2010).

O papilomavírus humano (HPV) é um vírus DNA, classificado na família *Papillomaviridae*, e filogeneticamente, o HPV genital pertence ao gênero Alfa (Villiers et al., 2004) mais de 100 tipos de HPV têm sido caracterizados molecularmente e cerca de 40 tipos são capazes de infectar a região anogenital (Munoz et al., 2006). Os tipos de HPV que infectam o trato genital podem ser divididos em dois grupos: de baixo risco oncogênico, representado pelos tipos (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81) e alto risco oncogênico (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82) (Munoz et al., 2003) e outros considerados provavelmente de alto risco oncogênico como os tipos 26, 53 e 66 (Munoz et al., 2003).

A importância do HPV na gênese do câncer de pênis não está ainda bem estabelecida, sendo o percentual de detecção do vírus em carcinoma invasor, de 22,2% a 82,9%, segundo alguns autores (Gregoire et al., 1995; Kirrander et al., 2010). A prevalência do HPV em homens saudáveis varia de 8 a 30% (Giuliano et al., 2008). Supostamente este número é ainda maior e crescente, se considerarmos o potencial de transmissão viral e a mudança global de comportamento humano, favorecendo a promiscuidade sexual.

No Brasil, os estudos realizados em paciente com CP verificaram uma prevalência de HPV variando de 30% a 72% (Gil et al., 2001; Scheiner et al., 2008). Em Goiânia-GO

existem dois estudos sobre a prevalência de DNA- HPV em homens. Reis conduziu uma investigação em 100 homens sem evidência clínica de infecção e verificou uma positividade de 23% de DNA-HPV nesses pacientes (Reis, 2005). Mendanha Sousa encontrou 34,5% de prevalência de DNA-HPV em 29 casos de carcinoma peniano, utilizando amostras crio-preservedas (Mendanha Sousa, 2008).

A relação entre câncer cervical e a infecção por HPV do tipo oncogênico já está bem estabelecida, através de técnicas de biologia molecular, em que se consegue detectar DNA do HPV em 92,9% a 99,7% dos espécimes invasivos analisados (Walboomers et al., 1999; Munoz et al., 2003; Bosch et al., 2008). Por outro lado, a analogia do CP com o câncer de colo é frequente, porém equivocada. Apesar de ambos apresentarem a histologia epitelial escamosa, enquanto a prevalência de HPV no câncer cervical é aproximadamente 100%, no CP ela fica em torno de 50% (Walboomers et al., 1999; Munoz et al., 2003; Backes et al., 2009). Portanto é questionável o papel oncogênico do HPV no carcinoma peniano (CP), sua importância na carcinogênese desta neoplasia ainda é incerta. Devemos ressaltar a importância de estudos dessa natureza para entender qual o papel desse vírus no processo oncogênico para desenvolvimento do carcinoma peniano.

Por isso, o déficit de conhecimento sobre as consequências da infecção desses vírus em homens ainda é muito grande, o que justifica a realização de mais pesquisas que consigam relacionar características clínicas do tumor com a prevalência do HPV nestas lesões, assim será possível prever um prognóstico mais concreto e estabelecer melhores medidas terapêuticas.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral:

Analisar a associação entre infecção por HPV em homens sexualmente ativos com diagnóstico de câncer de pênis atendidos no hospital Araújo Jorge de Goiânia-GO.

2.2. Objetivos Específicos:

Determinar a prevalência de HPV em homens sexualmente ativos, portadores de câncer de pênis, e oriundos do estado de Goiás.

3. Material e métodos

Estudo de coorte prospectiva envolvendo pacientes portadores de carcinoma de pênis (CP) tratados no serviço de Uro-Oncologia do Hospital Araújo Jorge (HAJ) da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG), no período de janeiro de 2001 a julho de 2008.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Araújo Jorge (protocolo N° 007/2008).

A partir de janeiro de 2001, coletou-se, prospectivamente, dados clínicos e histopatológicos de todos os pacientes com diagnóstico de CP admitidos no serviço de Uro-Oncologia. Os desfechos de interesse eram a presença ou desenvolvimento de metástase inguinal e o óbito por CP. Os casos que evoluíram a óbito por complicações de tratamento ou outra causa, na vigência de CP incurável, foram considerados como óbito câncer-específico. Para cálculo de sobrevida consideramos a data da cirurgia do tumor primário (pênis) como inicial. A censura foi aplicada na data da última consulta aos pacientes vivos e aos mortos por causa não-oncológica e sem CP em atividade.

Extração de DNA

A partir dos blocos de parafina contendo os fragmentos do tecido (previamente fixados em formalina), os espécimes (0,5 a 2,0 mg de tecido) eram transferidos para microtubos de centrífuga e submetidos à desparafinização. Após três lavagens sucessivas em 500 µl de xileno, por 15 minutos cada, a 55°C, procedia-se a centrifugação a 14.500 rpm por 3 minutos, descartando-se o sobrenadante. Após a desparafinização, o xileno era retirado por meio de três banhos em etanol absoluto, por 15 minutos cada, a 55°C, e nova centrifugação a 14.500 rpm por 3 minutos. Do material resultante, as amostras eram submetidas à purificação de DNA para posterior amplificação do gene GAPDH e detecção de HPV. Para a extração de DNA, foi utilizado o kit comercial de purificação do DNA genômico *Wizard®* (Promega Corporation, EUA), seguindo-se as instruções do fabricante.

Deteção de DNA Humano e DNA-HPV

O DNA extraído foi submetido à reação de PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene GAPDH (gene constitutivo humano), que amplificam um

fragmento de aproximadamente 90 pb (pares de base). A amplificação do GAPDH é necessária para assegurar a qualidade do DNA extraído e a ausência de inibidores inespecíficos da reação de PCR. Para não haver contaminação da PCR, esta era realizada em câmara de fluxo previamente limpa com álcool a 70% e irradiada com luz ultravioleta por 30 minutos. Todos os reagentes da PCR eram rapidamente centrifugados e homogeneizados no vórtex, sendo previamente descongelados sobre o gelo picado. Um controle negativo da reação contendo todos os componentes, exceto o DNA, era incluído em toda amplificação. Como controle positivo utilizou-se DNA humano extraído do sangue. As reações de PCR para amplificação de GAPDH foram realizadas num volume final de 25 µl, utilizando um termociclador (PE 2400, Perkin Elmer), em mistura contendo 2,0 mM MgCl₂, 1,25 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 200 µM de cada desoxinucleotídeo-trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, e dTTP), 100 pmol de cada *primer* (GAPDH P1 (f) : 5' - TGGACTCCACGACGTACTCAG - 3' e GAPDH P2 (f) : 5' - TTGTCATCAATGGAAATCCCATCA - 3') e 25 ng de DNA em tampão 1 vez concentrado (Taq DNA Polimerase Buffer - Invitrogen). O protocolo de ciclagem utilizado incluía uma etapa inicial de desnaturação de 5 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos com 30 segundos de desnaturação a 94 °C, 1 minuto de anelamento a 59 °C, 1 minuto de extensão a 72 °C, com um ciclo final de 7 minutos de extensão a 72 °C. Os produtos obtidos pelas reações de PCR, com aproximadamente 90 pares de bases, foram analisados em gel de poliacrilamida a 8%.

Para detecção do genoma do HPV, foi utilizada a técnica convencional de PCR com *primers* consensuais GP5+ e GP6+. Todas as amostras negativas para a presença do HPV foram testadas três vezes. Como descrito anteriormente, todos os reagentes da PCR foram rapidamente centrifugados e homogeneizados no vórtex, sendo previamente descongelados sobre o gelo picado. Um controle negativo da reação contendo todos os componentes, exceto o DNA, foi incluído em todas as amplificações. Como controle positivo utilizou-se uma amostra positiva de HPV, previamente testada e DNA extraído da linhagem celular HeLa. Os produtos obtidos pelas reações de PCR para detecção do DNA de HPV, com aproximadamente 140 pares de bases, foram analisados em gel de poliacrilamida a 8%.

4. Resultados

Cento e quarenta e oito pacientes com CP foram operados no HAJ no período estabelecido. Vinte e um pacientes foram excluídos, sendo quatro devidos ausências de bloco

de parafina do tumor primário disponível para análise e os demais por terem recebido tratamento prévio fora do HAJ. Cento e vinte e sete casos obedeciam aos critérios de inclusão.

A média de idade dos pacientes foi de 59,3 anos, variando de 24 a 101 anos (desvio padrão 15,27). Cento e oito pacientes apresentavam fimose (85%). O tratamento local foi: excisão local (7,9%), penectomia parcial (80,3%), penectomia total (7,9%) e emasculação (3,9%) (dados não apresentados).

Todos os cento e vinte e sete casos analisados mostraram positividade na PCR para o gene GAPDH, atestando a boa qualidade de material genético (DNA) obtido. Cinquenta e cinco pacientes apresentaram resultados positivos para a detecção do DNA do HPV, resultando em uma prevalência de 43% (IC 95%: 34,6 – 52,3) (Figura 1).

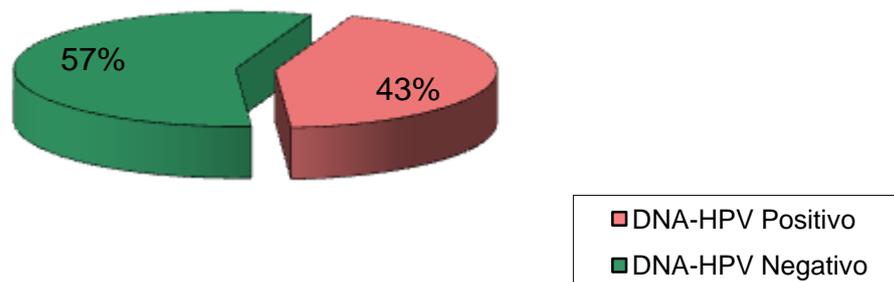


Figura 1 - Prevalência de DNA-HPV em pacientes com carcinoma peniano em Goiânia-Go.

5. Discussão

O câncer de pênis é um tipo raro de neoplasia, que acomete indivíduos de países subdesenvolvidos com baixo nível social e precários hábitos de higiene associado à fimose e não circuncizados. Este tipo de câncer ocorre frequentemente entre a quarta e sétima décadas de vida, o que foi evidenciado neste estudo, onde a média de idade dos pacientes portadores de carcinoma peniano em Goiânia-Go foi de 59,3 anos, variando de 24 a 101 anos (desvio

padrão 15,27), este dado é concordante com outros estudos brasileiros (Mendanha Sousa, 2008; Fonseca et al., 2010; Koifman et al., 2011).

A presença de fimose é freqüente em pacientes com câncer de pênis, sendo observada em 44 a 85% dos casos e considerada como fator de risco (De Paula et al., 2005; Micali et al., 2006). Neste estudo, Cento e oito pacientes apresentavam fimose (85%). Dado semelhante ao verificado por Mendanha Souza et al. (2008) em estudo conduzido em Goiânia em vinte nove casos de carcinoma peniano, onde 72% apresentaram fimose. De Paula e colaboradores (2005) sugeriram que a ausência da circuncisão dificulta a higienização adequada da glândula, que pode favorecer o estabelecimento de infecções bacterianas e virais (*Mycobacterium smegmatis*/ HPV) sendo considerados fatores de alto risco para o desenvolvimento desta neoplasia. Em países onde a circuncisão neonatal é um hábito cultural, verifica-se que a incidência do carcinoma de células escamosas do pênis (CCE) é baixa (Micali et al., 2006). A higiene adequada e a circuncisão precoce previnem a ocorrência da neoplasia na idade adulta.

A prevalência da infecção por HPV na população estuda foi de 43% (IC 95%: 34,6 – 52,3), este dado corrobora com os da literatura, pois estudos utilizando métodos moleculares como PCR verificaram a presença de HPV em carcinoma peniano, variando de 30 a 100% dos casos (Bezerra et al. 2001; Neves et al., 2002; Tornesello et al., 2008). O índice de associação do carcinoma de pênis com a infecção pelo HPV varia de acordo com a técnica utilizada para a detecção do vírus, uma vez que algumas técnicas podem ser mais sensíveis ou específicas, Em geral, o genoma do HPV é encontrado em aproximadamente 82% dos casos avaliados por PCR.

O progresso no entendimento da etiologia, patogênese e o prognóstico mais acurado dos tumores malignos de pênis, têm sido lento devido à carência de estudos moleculares que investiguem as prováveis alterações genéticas, aspectos clínicos e agentes biológicos como o HPV, associados ao desenvolvimento e progressão dessa neoplasia. Por isso, estudos epidemiológicos associando a infecção por HPV e as neoplasias penianas são fundamentais para esclarecer como o esses vírus podem interagir com mecanismos celulares e contribuir para o desenvolvimento do câncer de pênis. O conhecimento gerado em pesquisa dessa natureza pode proporcionar esclarecimento importante à população no sentido da prevenção do diagnóstico do câncer de pênis nos estágios iniciais, reduzir a incidência e a severidade da doença, como também proporcionar maiores chances de cura e aumento da sobrevida.

6. Conclusão

- A média de idade dos pacientes portadores de câncer de Pênis em Goiânia-GO foi de 59,3 anos, variando de 24 a 101 anos (desvio padrão 15,27). Cento e oito pacientes apresentavam fimose (85%).

- A prevalência de HPV foi de 43,% (IC 95%: 34,6 – 52,3) em indivíduos portadores de CP em Goiânia-GO.

7. Referências

Backes, D. M., Kurman, R. J., Pimenta, J. M. et al.: Systematic review of human papillomavirus prevalence in invasive penile cancer. *Cancer Causes Control*, 20: 449, 2009.

Bezerra AL, Lopes A, Santiago GH, Ribeiro KC, Latorre MR, Villa LL. Human papillomavirus as a prognostic factor in carcinoma of the penis: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy. *Cancer*;91:2315-21, 2001.

Bleeker MC; DA Heideman; PJ Snijders; S Horenblas; J Dillner ,CJ Meijer. Penile cancer: epidemiology, pathogenesis and prevention. *World J Urol* 27(2): 141-50, 2009.

Bosch FX; AN Burchell; M Schiffman; AR Giuliano; S de Sanjose; L Bruni; G Tortolero-Luna; SK Kjaer ,N Munoz. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine* 26 Suppl 10: K1-16, 2008.

Chan KW, Lam KY, Chan ACL, Lau P, Srivastava G. Prevalence of human papillomavirus types 16 and 18 in penile carcinoma: a study of 41 cases using PCR. *J Clin Pathol* ; 47:823-826, 1994.

Cubilla AL; B Lloveras; M Alejo; O Clavero; A Chaux; E Kasamatsu; EF Velazquez; C Lezcano; N Monfuleda; S Tous, et al. The basaloid cell is the best tissue marker for human papillomavirus in invasive penile squamous cell carcinoma: a study of 202 cases from Paraguay. *Am J Surg Pathol* 34(1): 104-14, 2010.

Daling JR; MM Madeleine; LG Johnson; SM Schwartz; KA Shera; MA Wurscher; JJ Carter; PL Porter; DA Galloway; JK McDougall, et al. Penile cancer: importance of circumcision, human papillomavirus and smoking in in situ and invasive disease. *Int J Cancer* 116(4): 606-16, 2005.

de Paula AAP; JC Almeida Netto; AD Cruz ,R Freitas Junior Carcinoma epidermóide do pênis: considerações epidemiológicas, histopatológicas, influência viral e tratamento cirúrgico. *Rev Bras Cancerol* 51(3): 243-252, 2005.

Favorito LA; Nardi A C; Ronalsa M; Zequi Stenio C., Francisco J. B. Sampaio, Sidney Glina. Epidemiologic Study on Penile Cancer in Brazil. *International Braz J Urol* 34 (5): 587-593, 2008.

Fonseca AG; Pinto JASA; Marques MC; Drosdoski FS; Neto LORF. Epidemiological study of penile cancer in Pará State, Brazil. *Rev Pan-Amaz Saude* 1(2): 85-90, 2010.

Gil AO; ACL Pompeo; PJ Goldstein; LB Saldanha; JLB Mesquita ,S Arap. Analysis of the association between human papillomavirus with penile carcinoma. *Int Braz J Urol* 27(5): 461-468, 2001.

Giuliano AR; G Tortolero-Luna; E Ferrer; AN Burchell; S de Sanjose; SK Kjaer; N Munoz; M Schiffman ,FX Bosch. Epidemiology of human papillomavirus infection in men, cancers other than cervical and benign conditions. *Vaccine* 26 Suppl 10: K17-28, 2008.

Gregoire L; AL Cubilla; VE Reuter; GP Haas ,WD Lancaster. Preferential association of human papillomavirus with high-grade histologic variants of penile-invasive squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 87(22): 1705-9, 1995.

Holland JF, Frei E. Penile cancer. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Bast Jr. RC, Gansler TS, Holland JF, Frei E, editors. *Cancer Medicine* 6. London: BC Decker Inc, 2003.

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

Kirrander P; A Kolaric; G Helenius; T Windahl; O Andren; JR Stark; G Lillsunde-Larsson; F Elgh ,M Karlsson. Human papillomavirus prevalence, distribution and correlation to histopathological parameters in a large Swedish cohort of men with penile carcinoma. *BJU Int.* 2010.

Koifman L, Vides AJ, Koifman N, CarvalhoJP, Ornellas AA. Epidemiological Aspects of Penile Cancer in Rio de Janeiro: Evaluation of 230 cases. *Int Braz J Urol International Braz J Urol* Vol. 37 (2): 231-243, 2011.

McDougal WS). Advances in the treatment of carcinoma of the penis. *Urology* 66(5 Suppl): 114-7, 2005.

Mendanha Sousa A. Detecção e genotipagem de papilomavirus em tumores de pênis. Goiania, PUC de Goias, 2008.

Micali G, Nasca MR, Innocenzi D, Schwartz RA. Penile Cancer. *J Am Acad Dermatol* 2006; 54:369-391, 2006.

Munoz N; FX Bosch; S de Sanjose; R Herrero; X Castellsague; KV Shah; PJ Snijders ,CJ Meije. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348(6): 518-27, 2003.

Munoz N; X Castellsague; AB de Gonzalez ,L Gissmann. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 24 Suppl 3: S3/1-10, 2006.

Neves D; GNL Camara; TR Alencar; MR Da Cruz; CRF Martins ,LGS Carvalho. Prevalence of Human Papillomavirus in Penile Carcinoma. *Braz J Urol* 28(3): 221-226, 2002.

Reis A. O papel do papilomavirus humano na carcinogenese dos tumores de pênis: uma abordagem epidemiológica e molecular. Goiania, PUC de Goias, 2005.

Reis AAS, Paula LB, Paula AAP, Saddi VA, Cruz AD. Aspectos clínico-epidemiológicos associados ao câncer de pênis. *Ciência & Saúde Coletiva* 15: 1105-1111, 2010.

Scheiner MA; MM Campos; AA Ornellas; EW Chin; MH Ornellas ,MJ Andrada-Serpa. Human papillomavirus and penile cancers in Rio de Janeiro, Brazil: HPV typing and clinical features. *Int Braz J Urol* 34(4): 467-74; discussion 475-6, 2008.

Silva Reis A A, Paula LB, de Paula A AP, Saddi VA, Cruz A D. Aspectos clínico-epidemiológicos associados ao câncer de pênis *Ciência & Saúde Coletiva*, 15(Supl. 1):1105-1111, 2010

Tornesello ML; ML Duraturo; S Losito; G Botti; S Pilotti; B Stefanon; G De Palo; A Gallo; L Buonaguro ,FM Buonaguro. Human papillomavirus genotypes and HPV16 variants in penile carcinoma. *Int J Cancer* 122(1): 132-7.2008.

Villa LL, Lopes A. Human Papillomavirus DNA sequence in penile carcinomas in Brazil. *Int J Canc* 37:853-855, 1986.

Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324:17-27 , 2004.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* ; 189: 12-19. 1999.