

ANALYSIS OF THE ASSOCIATION BETWEEN HUMAN PAPILLOMAVIRUS WITH PENILE CARCINOMA

ANTONIO O. GIL, ANTONIO C. L. POMPEO, PAULO J. GOLDSTEIN, LUIZ B. SALDANHA, JOSÉ L. B. MESQUITA, SAMI ARAP

Division of Urology, General Hospital, School of Medicine, State University of São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil

ABSTRACT

Objective: To determine the incidence and which type of human papillomavirus (HPV) was more prevalent in penile epidermoid carcinoma. To determine the influence of HPV in the biological behavior of the tumor in relation to the following variables: coilocytosis, clinical and pathological staging and histological grading. Prognostic factors like survival curve and death risk from the tumor are also studied in relation to the presence of HPV.

Material and Methods: Fifty-five patients with penile epidermoid carcinoma, surgically treated between 1979 and 1995, were retrospectively studied. The mean follow-up was 31.6 months. The presence of HPV was studied by polymerase chain reaction (PCR) on the most representative surgical specimens of the primary tumor and metastasis. The patients whose tumors had HPV type-16 were placed into groups separated from those uninfected by the virus and those infected by any other viral type.

Results: Patients having HPV type-16 in their tumors were submitted to major surgical procedures to remove the primary tumor ($p = 0.04$). The relative risk of death for patients with HPV type-16 was 7.59 times greater than that for the virus negative group. Also, patients presenting HPV type-16 in the tumor presented a lower tendency for survival (without statistical significance). Coilocytosis was detected in 12 patients, presenting a significant correlation with the presence of HPV type-16 ($p = 0.026$).

Conclusion: The infection by HPV was strongly associated with penile epidermoid carcinoma (30.9%). Also, the presence of coilocytosis is strongly associated with viral infection. The presence of HPV type-16 in the tumors was associated with increased tumor-related mortality.

Key words: penis; penile carcinoma; epidermoid carcinoma; tumors; human papillomavirus
Braz J Urol, 27: 461-468, 2001

INTRODUÇÃO

O câncer de pênis constitui neoplasia rara, correspondendo a 0.4% das neoplasias malignas no homem em países desenvolvidos (1). No Brasil a incidência varia conforme a região estudada, de 5.5% a 16% nas regiões Norte e Nordeste e de 1 a 4% nas regiões Sul e Sudeste (2).

A incidência maior de câncer de pênis ocorre entre a quarta e sétima décadas de vida (3), com 97% dos casos representados pelo carcinoma epidermóide (CE).

Apesar de não haver provas inequívocas da associação da infecção pelo Papilomavírus humano (HPV) e carcinoma de pênis, alguns trabalhos publicados na literatura demonstraram associação de 30% a 50% do HPV, principalmente o tipo 16, com este tumor (4,5).

A presença do HPV em carcinoma de pênis foi demonstrada pela primeira vez em 1983, por Durst et al. (6). No Brasil, Mccance et al. (7) e Villa & Lopes (8) encontraram o vírus em 8 de 18 e 27 de 53 pacientes, respectivamente.

Os HPV's de alto risco, particularmente os tipos 16 e 18, são capazes de produzir proteínas que alteram a função normal de replicação das células. A proteína E6 dos HPV's de alto risco tem a capacidade de complexar e inativar a proteína supressora de tumores p53, inibindo a resposta normal de parada do ciclo celular, favorecendo o acúmulo de mutações e deterioração maligna (9).

O CEP é doença com disseminação regional, e sua extensão no pênis e em linfonodos inguinais e/ou ilíacos tem relação com o prognóstico e sobrevida dos pacientes.

As diversas formas de tratamento dessa neoplasia visam sobrevida livre do tumor com mínima morbidade e poucas seqüelas funcionais após o tratamento.

O intuito desse trabalho foi determinar a prevalência do HPV em células de carcinoma epidermóide de pênis, avaliando a influência do HPV nestes tumores quanto ao estágio clínico inicial, estágio patológico, graduação histológica, presença de coilocitose nas células adjacentes ao tumor e a influência do HPV no prognóstico e sobrevida dos pacientes.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Foram estudados retrospectivamente 55 pacientes com diagnóstico de carcinoma epidermóide primário de pênis, tratados cirurgicamente de janeiro de 1979 a dezembro de 1995. Em todos os casos havia material anátomo patológico e prontuários para análise.

A faixa etária dos pacientes variou de 23 a 80 anos e o tamanho das lesões penianas de 1 a 8 cm no maior eixo, com médias de 57.20 anos e 3.40 cm.

Dos 55 pacientes, 48 tiveram seguimento pós-operatório satisfatório, que variou de 5 a 120 meses, com média de 31.6 meses.

Todos os pacientes foram submetidos a estadiamento clínico do tumor com exame físico, ultra-sonografia abdominal, radiografia de tórax e, em alguns casos, tomografia computadorizada de abdome.

Para avaliação do estágio clínico foram utilizados os critérios propostos por Jackson (10), com

a seguinte distribuição: estágio I - 17 casos (30.9%), estágio II - 22 (40.0%), estágio III - 14 (25.5%) e estágio IV - 2 casos (3.6%). Esta foi adotada pois a classificação TNM ainda não era adotada universalmente no início deste trabalho e, conforme alguns relatos, existe grande correlação entre estas classificações no CEP (11).

A amputação de pênis foi realizada em todos os pacientes, sendo parcial em 44 casos, total em 8, e 3 emasculações com ressecção parcial de escroto. Nos casos de amputação total do pênis ou emasculação, uretostomia perineal foi realizada.

Trinta e nove pacientes foram submetidos à linfadenectomia inguinal bilateral pelo menos 1 mês após o tratamento do tumor primário, e 2 à linfadenectomia ilíaca (11).

O diagnóstico histopatológico das peças cirúrgicas foi revisado por um único patologista, utilizando para a graduação histológica a classificação de Broders (12).

Após essa análise, foram selecionados os blocos de anátomo-patológico mais representativos dos tumores e realizados novos cortes para estudo da prevalência de infecção pelo HPV pela técnica de reação de cadeia de polimerase (PCR) segundo a seguinte metodologia (13):

- 1)- Realizou-se 1 corte de 12 micra no bloco de parafina e tratou-se a amostra para desparafinização da mesma e posterior exposição do DNA da amostra;
- 2)- As lâminas de corte foram trocadas após cada corte para se evitar contaminação das peças;
- 3)- Verificou-se a qualidade da amostra, realizando-se, inicialmente, a técnica de PCR para a presença de beta-globina, fazendo-se a amplificação do gene e análise em gel de acrilamida corado pela prata. A amplificação para os genes do HPV é realizada com 1 par de iniciadores: MY09 e MY11 que reconhecem todos os tipos de HPV conhecidos (Perkin Elmer, Foster City, Ca, USA). Como controle positivo, utiliza-se DNA extraído de linhagem celular SIHA, derivada de carcinoma de colo uterino, e também um controle negativo e outro com nenhum DNA. Para se aumentar a sensibilidade do teste, foi utilizado também nos cortes inicialmente negativos para a presença do HPV, a amplificação com um segundo tipo de iniciador, que é capaz de identificar um

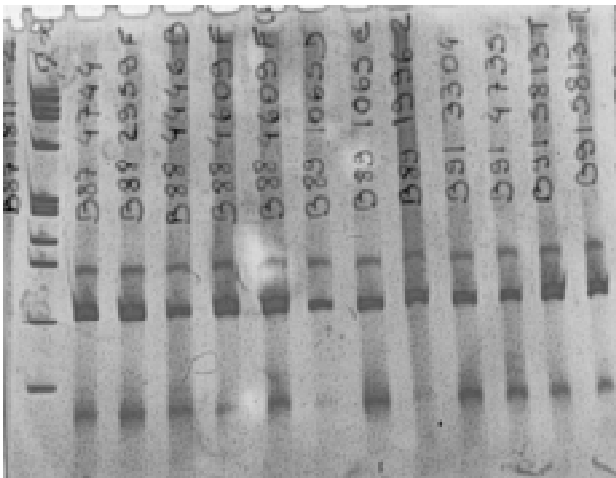


Figure 1 - Negative reaction for HPV.

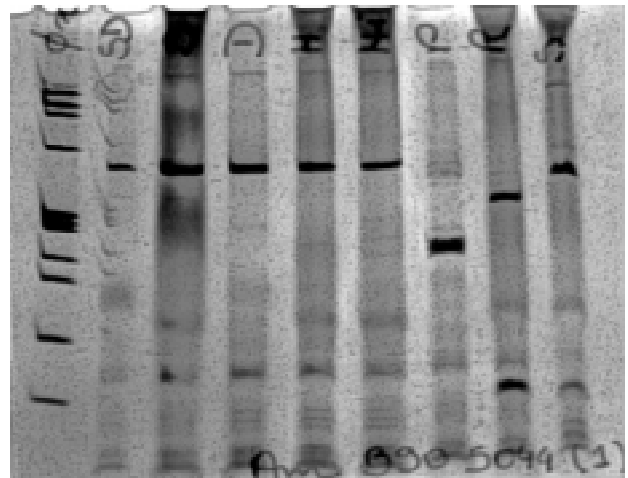


Figure 2 - Positive reaction for HPV type 16 by using polymerase chain reaction.

fragmento menor de DNA, que aqueles observados pelos iniciadores MY09 e MY11. A identificação do tipo de HPV foi realizada por aplicação em gel de poli-acrilamida do produto da digestão dos casos positivos com 7 enzimas de restrição. Após a eletroforese os fragmentos foram visualizados por coloração em nitrato de prata e análise das bandas conforme os mapas de restrição dos diversos tipos de HPV (Figures- 1 e 2).

Os outros fatores analisados como: graduação histológica, estágio clínico e patológico, coilocitose e óbito pelo tumor também foram estudados em relação à presença do DNA do HPV.

A análise estatística visou determinar fatores associados com a apresentação clínica desses tumores e também fatores prognósticos, utilizando-se o teste de χ^2 (qui-quadrado) ou o teste exato de Fisher. Para comparação de comportamento dos 2 métodos de avaliação do estadiamento foi utilizado o índice de reprodutibilidade Kappa.

A expectativa de sobrevida foi avaliada por meio das curvas de sobrevida de Kaplan-Meier, com relação à presença do HPV.

Para a obtenção de fatores preditivos de óbito pelo tumor foi utilizada a regressão logística. Os resultados das análises dos riscos de óbito foram obtidos segundo a técnica de regressão de Cox.

O nível de significância utilizado para os testes foi de 5%.

RESULTADOS

Durante o estudo de 48 pacientes com seguimento houve 14 óbitos (30.4%), sendo 12 (27.3%) relativos ao tumor.

Das 41 linfadenectomias realizadas, 19 apresentaram metástases para linfonodos (46.3%), sendo 11 unilaterais e 7 bilaterais para linfonodos inguinais e 1 para linfonodos ilíacos. Este paciente com metástase para linfonodos ilíacos apresentou

Table 1 - Clinical stage (CS) in relation to the presence of HPV (n = 55).

| HPV \ CS | I | % | II | % | III | % | IV | % | Total |
|------------------|----|-------|----|-------|-----|-------|----|------|-------|
| Negative | 14 | 36.84 | 14 | 36.84 | 8 | 21.05 | 2 | 5.26 | 38 |
| Positive | 3 | 42.86 | 2 | 28.57 | 2 | 28.57 | 0 | 0 | 7 |
| Positive type 16 | 0 | 0 | 6 | 60.00 | 4 | 40.00 | 0 | 0 | 10 |
| n | 17 | | 22 | | 14 | | 2 | | 55 |

Fisher p = 0.208

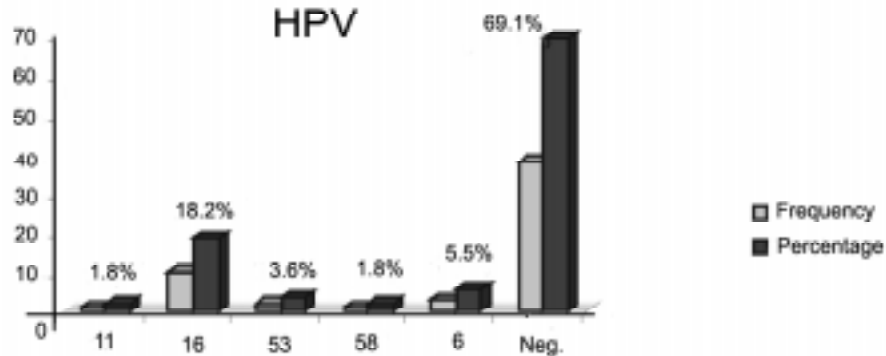


Figure 3 - Distribution of patients with HPV types 11, 15, 53, 58 and 6, as well as patients negative for HPV in the studied population (n = 55).

metástases inguinais previamente. Durante o estudo, ocorreram 3 recidivas (5.4%) em penectomias parciais e 4 recidivas em leito de linfadenectomia.

A presença do HPV foi detectada em 17 pacientes (30.9%), sendo 18.2% com infecção pelo tipo 16, e o restante dividido entre os outros tipos de vírus (Figure-3).

A maior parte dos tumores tinha graduação baixa ou intermediária, sendo 18 casos (32.7%) com grau I, 26 (47.3%) grau II e 11 casos (20.0%) grau histológico III. Os pacientes com HPV 16 nas células tumorais apresentaram tendência maior à histologia desfavorável, porém esses dados não obtiveram significância estatística (p = 0.221).

Não houve diferença significativa quanto aos estádios clínico ou patológico em relação à presença do HPV, conforme as Tables-1 e 2.

A coilocitose foi detectada em 12 pacientes, tendo associação estatisticamente significativa com a presença do HPV 16 (p = 0.026).

O óbito pelo tumor também foi influenciado pela presença do DNA do HPV, tendo os pacientes com o HPV 16 pior prognóstico que os outros grupos (Table-3).

Os pacientes com o HPV 16 foram submetidos a operações maiores, com significância estatística quando colocados no mesmo grupo os pacientes submetidos a emasculação e penectomia total. A Table-4 mostra estes resultados.

Os pacientes com presença do tipo 16 do HPV nos tumores apresentaram risco relativo de óbito 7.59 vezes maior que o grupo negativo para a presença do vírus.

As curvas de sobrevida mostram prognóstico pior para os pacientes com presença do tipo 16 do HPV, porém sem significância estatística. (Figure-4).

DISCUSSÃO

O índice de associação do CEP com o HPV pode variar de acordo com a metodologia aplicada

Table 2 - Relation between the presence of HPV and the pathological stage [PS] (n = 41).

| HPV | PS | I | % | II | % | III | % | IV | % | Total |
|-------------|----|-------|----|-------|---|-------|---|-------|----|-------|
| Negative | 7 | 24.14 | 10 | 34.48 | 7 | 24.14 | 5 | 17.24 | 29 | |
| Positive | 2 | 40.00 | 2 | 40.00 | 0 | 0 | 1 | 20.00 | 5 | |
| Positive 16 | 0 | 0 | 4 | 57.14 | 1 | 14.29 | 2 | 28.57 | 7 | |
| n | 9 | | 16 | | 8 | | 8 | | 41 | |

Fisher p = 0.606.

Table 3 - Relation between the presence of HPV16, other HPV types and tumor related death (n = 46)

| Death | HPV | | + HPV | | + HPV 16 | | Total |
|-------|------|-------|-------|-------|----------|-------|-------|
| | Neg. | % | % | % | % | | |
| No | 25 | 73.53 | 5 | 14.71 | 4 | 11.76 | 34 |
| Yes | 5 | 41.67 | 2 | 16.67 | 5 | 41.67 | 12 |
| n | 30 | | 7 | | 9 | | 46 |

Lost of follow-up = 9; Fisher p = 0.045.

para a detecção do vírus, tendo a análise de material a fresco positividade maior que o material parafinado (14). No nosso estudo, a porcentagem de casos onde não foi possível a obtenção de DNA para análise mesmo após amplificação foi de 5.53%.

Kulski et al. (15), utilizando hibridização in situ, encontraram DNA do HPV em 2 de 10 espécimes de carcinoma de pênis. Villa & Lopes (8) encontraram o vírus em 8 de 18 pacientes, utilizando a técnica de Southern blot.

A infecção pelo HPV foi determinada nesse estudo pela PCR, método mais sensível atualmente, identificando o vírus em 17 dos 55 pacientes ou 30.9%, sendo compatível com a literatura (16).

Chan et al. (17), estudando a presença do HPV pela PCR em 34 pacientes com carcinoma epidermóide de pênis encontraram os tipos 16 e/ou 18 em 6 pacientes (17.6%).

Gregoire et al. (18) estudaram 117 pacientes com carcinoma de pênis e encontraram o HPV por meio da PCR em 26 casos (22.2%), sendo estes associados a tumores mais indiferenciados. Na nossa casuística encontramos vários tipos, porém o tipo 16 foi o mais prevalente, sendo detectado em 60% dos pacientes positivos, correspondendo a 18.2% de todos os casos.

Todos esses estudos têm demonstrado frequência maior dos HPVs de alto risco, principalmente o tipo 16, à exceção do trabalho de Villa & Lopes (8) que encontraram o tipo 18 na maioria dos casos.

O estudo da influência do HPV na apresentação clínica e características anatomopatológicas do carcinoma de pênis é importante pois estes podem apresentar maior anaplasia quando associados à infecção viral (19).

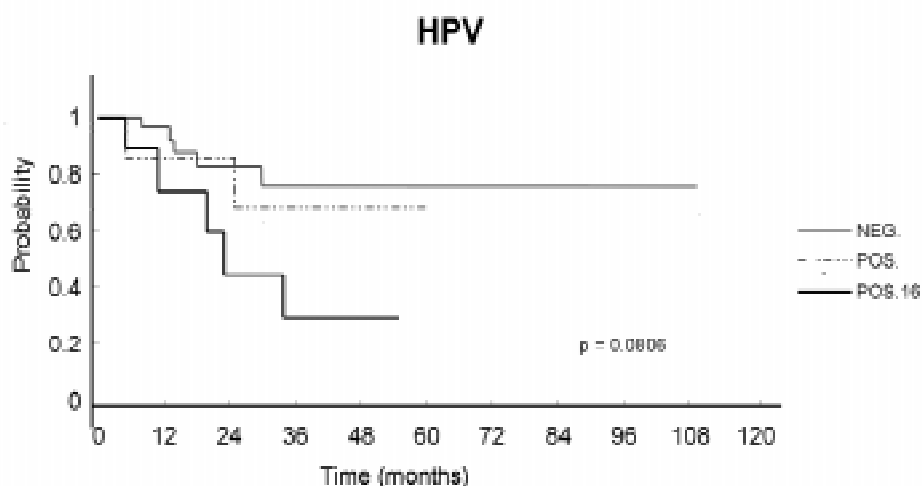


Figure 4 - Survival curve in relation to the presence of HPV (n = 48).

Table 4 - Relation between the surgical intervention on the primary tumor and the presence of HPV (n = 55).

| Surgery | HPV | | + HPV | | + HPV 16 | | Total |
|---------|------|-------|-------|-------|----------|-------|-------|
| | Neg. | % | % | % | % | | |
| PA | 33 | 75.00 | 6 | 13.64 | 5 | 11.36 | 44 |
| TA + EM | 5 | 45.54 | 1 | 9.09 | 5 | 45.45 | 11 |
| Total | 38 | | 7 | | 10 | | 55 |

Fisher - $p = 0.04$; PA = partial amputation; TA = total amputation; EM = emasculation.

Esses dados são conflitantes, pois Wiener et al. (16) estudaram 29 pacientes com carcinoma de pênis invasivo, encontrando positividade para o HPV nesses tumores de 31%, porém nenhuma diferença estatisticamente significativa com respeito à graduação histológica ou presença de metástases foi encontrada.

O CEP, conforme a literatura, é neoplasia que se caracteriza por apresentar diferenciação boa ou moderada na maioria dos casos (19). A graduação histológica dos tumores na nossa população segue esses dados, tendo 80% dos casos histologia bem ou moderadamente diferenciada, e apenas 20% tumores indiferenciados. O grupo positivo para infecção pelo HPV 16 apresentou-se com tumores mais anaplásicos que os outros grupos, porém sem significância estatística.

Chan et al. (17) encontraram apenas 15% de 41 pacientes com positividade para o DNA do HPV, que foram dos tipos 16 e 18 exclusivamente, e os tumores menos diferenciados também apresentaram maior prevalência do vírus.

A maior parte dos pacientes em nossa casuística apresentava-se com moléstia localizada quando vistos da primeira vez, reproduzindo dados da literatura (20). O estágio patológico comprovou estes achados, pois 65.5% dos pacientes estavam nos estádios I e II de Jackson e 34.5% nos estádios III e IV.

Observamos tendência dos pacientes com HPV 16 nas células tumorais apresentarem moléstia metastática, tendo 50% desses estádios III e IV, contra 31.58% dos pacientes negativos e 28.58% dos pacientes positivos para outros tipos. Wiener et al. (16) não encontraram essa tendência, havendo distribuição homogênea entre os pacientes com e sem metástases, e infecção pelo HPV nos tumores.

Merece destaque a correlação significativa encontrada entre coilocitose e presença do HPV. Sob o ponto de vista prático, estas alterações histológicas devem ser interpretadas como muito sugestivas de infecção pelo HPV.

A nossa casuística compreendeu pacientes com amputações parciais ou totais, com índice de recidiva local de 5.4% apenas nas amputações parciais. Quando se agruparam as operações de maior porte no tumor primário em um mesmo grupo, pudemos verificar que os pacientes com HPV 16 são frequentemente submetidos a procedimentos maiores, portanto com maior morbidade, sendo esta tendência estatisticamente significativa.

Durante o período de estudo, a sobrevida total dos pacientes foi de 70.8%, havendo 12 óbitos relacionados ao tumor. A presença do HPV 16 nos tumores influenciou negativamente o prognóstico dos pacientes, pois de 9 pacientes positivos para o tipo 16 com seguimento, 5 morreram devido ao tumor no período de seguimento, correspondendo a 41.67% do total de óbitos pela neoplasia. Estes dados obtiveram significância estatística e, como pudemos ver na curva de sobrevida dos pacientes com relação à presença do vírus, os pacientes com positividade para o HPV 16 tendem a ter menor sobrevida que os outros grupos (Figure-4). A odds ratio para óbito nos pacientes com tipo 16 foi de 7.59, com intervalo de confiança de 95%.

A busca de fatores prognósticos para pacientes portadores de neoplasia tem sido uma das metas da medicina, visando a melhora na qualidade e aumento na expectativa de vida. No caso do CEP, dados da literatura e os demonstrados neste trabalho mostram a importância da presença do HPV em relação ao comportamento biológico desses tumores.

CONCLUSÕES

O HPV demonstrou associação significativa com o carcinoma de pênis (30.9%), com maior prevalência do tipo 16.

Existe correlação expressiva entre coilocitose e infecção viral.

A presença do HPV 16 demonstrou tendência a influenciar negativamente a evolução dos pacientes, os quais apresentaram maior mortalidade e menor tempo de sobrevida.

REFERÊNCIAS

1. Droller, MJ: Carcinoma of the penis an overview. *Urol Clin North Amer*, 7: 783-784, 1980.
2. Brunini R, Torloni H, Henson DE, Gotlieb SLD, De Souza JMP: Câncer no Brasil: dados histopatológicos 1976 - 1980. Rio de Janeiro, Ministério da Saúde, 1982.
3. Narayana AS, Olney LE, Loenig SA, Weimar GW, Culp DA: Carcinoma of the penis: analysis of 219 cases. *Cancer*, 49: 2185-2191, 1982.
4. Malek RS, Goellner JR, Smith TF, Espy MJ, Cupp MR: Human papillomavirus infection and intraepithelial, in situ, and invasive carcinoma of the penis. *Urology*, 42: 159-170, 1993.
5. Della Torre G, Dongi R, Longoni A: HPV DNA in intraepithelial neoplasia and carcinoma of the vulva and penis. *Diagn Molec Pathol*, 1: 25-30, 1992.
6. Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, Zur Hausen H: A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci*, 80: 3812-3815, 1983.
7. McCance DJ, Kalache A, Ashdown K, Andrade L, Menezes F, Smith P, Doll R: Human papillomavirus types 16 and 18 in carcinomas of the penis from Brazil. *Int J Cancer*, 37: 55-59, 1986.
8. Villa LL, Lopes A: Human papillomavirus DNA sequences in penile carcinomas in Brazil. *Int J Cancer*, 37: 853-855, 1986.
9. Scheffner M, Werness BA, Hulbregtse JM, Levine AJ, Howley PM: The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, 63: 1129-1136, 1990.
10. Jackson SM: The treatment of carcinoma of the penis. *Br J Surg*, 53: 33-35, 1966.
11. Pompeo ACL: Linfadenectomia Inguinal Estadiada em Câncer do Pênis: Avaliação Prospectiva de 50 Pacientes. Tese (Livre Docência). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 124p., 1993.
12. Broders AC: Epithelioma of the genito-urinary organs. *Ann Surg*, 75: 574-604, 1922.
13. Pinto AP, Villa LL: A spin cartridge system for DNA extraction from paraffin wax embedded tissues. *Mol Pathol*, 51, 48-49, 1998.
14. Levi JE: Associação entre Papillomavirus Humano e Expressão do Gene p53 em Carcinomas de Pênis. Dissertação (Mestrado). Departamento de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, 95p., 1993.
15. Kulski JK, Demeter, T, Mutavdzic S, Sterrett GF, Mitchell KM, Pixley MB: Survey of histologic specimens of human cancer for human papillomavirus types 6/11/16/18/ by filter in situ hybridization. *AJCP*, 94: 566-570, 1990.
16. Wiener JS, Effert PJ, Humphrey PA, Yu L, Liu ET, Walther PJ: Prevalence of human papillomavirus types 16 and 18 in squamous cell carcinoma of the penis: a retrospective analysis of primary and metastatic lesions by differential polymerase chain reaction. *Int J. Cancer*, 50: 694-701, 1992.
17. 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.
18. 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 Natl Cancer Inst*, 87: 1705-1709, 1995.

19. Ornellas AA, Seixas ALC, Marota A, Wisenescky A, Campos F, De Moraes JR: Surgical treatment of invasive squamous cell carcinoma of the penis: retrospective analysis of 350 cases. *J Urol*, 151: 1244-1249, 1994.
20. Fraley EE, Zhang G, Sazama R, Lange PH: Cancer of the penis: prognosis and treatment plans. *Cancer*, 55: 1618-1624, 1985.

Received: November 23, 2000

Accepted after revision: September 29, 2001

Correspondence address:

Dr. Antonio Otero Gil
Rua Cotoxó, 611 / 105
São Paulo, SP, 05021-000, Brazil
E-mail: doctorgil@u-net.com.br