



Universidade Federal do Maranhão  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto  
Mestrado Acadêmico



**ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO GENE *TP53* (CÓDON 72)  
E SUA RELAÇÃO COM A INFECÇÃO PELO  
PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM TUMORES DE  
PÊNIS**

**THALITA MOURA SILVA ROCHA**

**São Luís**

**2022**

**THALITA MOURA SILVA ROCHA**

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO GENE *TP53* (CÓDON 72)  
E SUA RELAÇÃO COM A INFECÇÃO PELO  
PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM TUMORES DE  
PÊNIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Título de Mestre em Saúde do Adulto.

**Área de concentração:** HPV e Câncer

**Orientador:**

Prof. Dr. Gyl Eanes Barros Silva

**Coordenador:**

Prof. Dr. Marcelo de Souza Andrade

**São Luís**

**2022**

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Rocha, Thalita Moura Silva.

Análise do polimorfismo do gene TP53(códon 72) e sua relação com a infecção pelo papilomavírus humano(HPV) em tumores de pênis / Thalita Moura Silva Rocha. - 2022.  
64 f.

Orientador(a): Gyl Eanes Barros Silva.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Saúde do Adulto/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2022.

1. Câncer de pênis. 2. HPV. 3. Polimorfismo TP53. 4. Proteína p53. I. Silva, Gyl Eanes Barros. II. Título.

**THALITA MOURA SILVA ROCHA**

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO GENE *TP53* (CÓDON 72)  
E SUA RELAÇÃO COM A INFECÇÃO PELO  
PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM TUMORES DE  
PÊNIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Título de Mestre em Saúde do Adulto.

A Banca examinadora da defesa de Mestrado apresentada em sessão pública, considerou o candidato aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

---

**Prof. Dr. Gyl Eanes Barros Silva (Orientador)**  
Universidade Federal do Maranhão

---

**Prof. Dr. Marcelo Souza de Andrade**  
Universidade Federal do Maranhão

---

**Prof. Dr. Rui Miguel Gil da Costa Oliveira**  
Universidade Federal do Maranhão

---

**Profa. Dra. Flávia Castello Branco Vidal Cabral**  
Universidade Federal do Maranhão

A Deus, acima de todas as coisas.

Ao meu avô Kleber, por acreditar em mim e sonhar comigo!

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por tudo e todas as coisas e por ter me dado forças quando eu achava que não conseguiria. Senhor, obrigada por todas as vezes em que eu entreguei tudo em Tuas mãos e foste fiel comigo, como sempre.

Muito obrigada a minha família (Ruth, Klerton, Thaís e Kleber Neto), até mesmo quando não entendiam o que eu estava fazendo e nem porque estava fazendo, de uma forma ou de outra vocês tem participação especial na minha jornada. Dentro desse nicho familiar, um agradecimento especial ao meu avô Kleber, por ser a pessoa que mais acredita em mim no mundo e por muitas vezes ser a representação de força pra continuar nessa jornada que é a jornada científica. Às minhas avós Graça e Luzia, por todas as lições, risadas e tardes jogando conversa fora. Ao meu avô José Alberto (*in memoriam*) por ter sido o meu suporte e o grande responsável por quem sou hoje, sem você nada seria possível.

A cada um dos pacientes desta pesquisa. Saibam que suas passagens pelos meus dias ao longo desse trabalho me fizeram mais empática e mais humana.

A Thais Bastos, minha parceira de laboratório, por cada momento, conversa, risada, choro e redbull ao longo desses quase 3 anos. Deus sabe exatamente o motivo de cada pessoa em nossa vida, sem dúvidas você foi um dos meus maiores presentes. Obrigada pela amizade que desenvolvemos, por toda ajuda, cada palavra de conforto e por me inspirar de tantas formas incríveis. Sua energia é única, amo você.

Ao meu querido companheiro de laboratório, Denner Rodrigo, por ser uma das pessoas com o melhor coração que tive o prazer de conhecer. Obrigada, por mesmo sem saber, me inspirar a ver o lado bom das coisas. Sua ajuda ao longo do meu trabalho foi especialmente importante para mim. Peço a Deus que ilumine sempre seu caminho. Você é incrível, nunca perca o seu brilho!

A Marta Belfort, meu muito obrigada especialíssimo! Deus nos aproximou em um momento único. Obrigada por tanto! Cada conversa, café, risada, dia de beleza e lanches juntas. Você foi a grande responsável pela força encontrada em mim mesma na reta final deste trabalho. Sua amizade foi uma benção em meu caminho, sou imensamente grata. Seu coração é lindo e espero ter você por muito tempo por aqui na minha vida.

Ao meu (mais que) amigo, Antonio Augusto, por cada ensinamento, conversa, planos e oportunidades. Você é um dos grandes responsáveis por esse trabalho e por quem sou hoje. Obrigada por cada momento vivido, barra segurada e companheirismo desde 2013. Mais uma vez declaro: que nunca esqueçamos o caminho da volta. Sua amizade é muito importante para mim.

A Mairla Colins, por todos os altos e baixos desde 2013. Obrigada por sempre ser um ombro amigo e essa pessoa que acolhe. Obrigada por cada risada, parceria e conversa ao longo dos últimos anos e, em especial, ao longo do meu trabalho. Tudo é sempre leve quando estamos juntas.

A Pedro Figueiredo, por fazer parte da minha vida. Obrigada por ser amigo, companheiro, por todo respeito e cuidado comigo. Você foi especialmente importante nessa reta final da dissertação, cada palavra de apoio me deu forças!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gyl Eanes, pela oportunidade concedida e por ser uma inspiração de profissional e pesquisador.

Aos companheiros do GEPAM (Grupo de Estudos em Patologia Molecular), Juliana, Bruna, Wesliany e, em especial, a Fran (por quem desenvolvi um carinho que ultrapassa os muros do hospital). Um obrigada também a Jaque Pinho, por todo carinho sempre.

Aos demais amigos pela presença na minha vida e por em muitos momentos também terem me dado forças (ou momentos de descontração kkk). Florindomar, Karol, Wesley, Lara, Henrique, Mariana, João Victor e Victor Hugo e alguns outros que acabei esquecendo de mencionar.

A toda equipe do Hospital Universitário Presidente Dutra, Aldenora Belo e Hospital Geral. Por todo apoio durante as idas ao centro cirúrgico no desenvolvimento da pesquisa. Em especial: os setores de patologia dessas instituições.

Ao pessoal do LIME (Laboratório de Imunofluorescência e Microscopia Eletrônica), Victor, Rayanne e Fernanda, pela ajuda e aprendizado.

A Dra. Syomara e Dra. Liseana, por serem peças fundamentais da pesquisa que desenvolvemos no nosso grupo de pesquisa. Obrigada por toda gentileza e empatia.

Ao Programa de Pós Graduação em Saúde do Adulto (PPGSD) pelos anos de aprendizado na minha jornada. A cada um dos professores e corpo administrativo. Aos colegas da turma 19, pelos momentos compartilhados. Somos todos vencedores! Um obrigada especial aos colegas

André, Nívia e Joana, apesar de pouco tempo de convívio físico por conta da pandemia, compartilhamos experiências e momentos únicos ao longo desses anos de mestrado.

Ao Centro de Pesquisa Clínica (CEPEC) da Universidade Federal do Maranhão e seus coordenadores, pela infraestrutura disponível em muitos momentos deste trabalho. Ao Núcleo de Pesquisa em Oncologia da Universidade Federal do Pará, especialmente ao Antônio, a Amanda e ao Dr. André Salim, pelo suporte e aprendizado.

A banca examinadora pelo convite aceito e, de antemão, pelas contribuições. Aos professores Dr. Marcelo Souza de Andrade, Dr. Rui Miguel Gil da Costa Oliveira, Dra. Flávia Castello Branco Vidal Cabral, meu muito obrigada!

A Universidade Federal do Maranhão, por cada momento único que vivi na universidade. Laços construídos, conhecimento adquirido e experiências vividas.

A FAPEMA, pelo suporte financeiro para desenvolvimento deste trabalho.



*Luminous beings are we. Not this crude matter.*

**Mestre Yoda. Star Wars, Episódio V - O Império Contra-Ataca**

## RESUMO

O câncer de pênis (CaPe) é uma doença de baixa incidência em países desenvolvidos, mas chega a representar 10% de todas as neoplasias que acometem os homens em países em desenvolvimento. O Brasil possui uma das maiores incidências registradas para a doença, com maior concentração de casos nas regiões Norte e Nordeste. O estado do Maranhão responde por 10,6% de todos os casos de CaPe diagnosticados no país, e recentemente, foi considerada a localidade de maior incidência da doença no Brasil e no mundo. O CaPe possui etiologia multifatorial, sendo associado a fatores socioeconômicos/comportamentais e a infecção pelo papilomavírus humano (HPV). A doença tem se tornado um grave problema de saúde pública em certas regiões, sobretudo devido às limitações no arsenal terapêutico disponível para tratamento, reflexo da escassez de estudos que visem compreender os aspectos fisiopatológicos e a base genética desses tumores. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo investigar o polimorfismo do códon 72 do gene *TP53* em tumores de pênis e sua relação com o perfil de infecção por HPV e de expressão proteica de p53 nesses tumores. Para isso, um estudo prospectivo foi delineado e contou com o recrutamento de 53 pacientes com CaPe em três hospitais de referência em oncologia no Maranhão (HCAB, HUUFMA e HGTLF), entre 2020 e 2022. Todos os pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e foram entrevistados para coleta de dados sociocomportamentais. Para determinação alélica do códon 72 do gene *TP53*, amostras de sangue periférico foram coletadas de cada paciente para extração de DNA de células sadias. As amostras de DNA foram submetidas à amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) qualitativa utilizando pares de primers específicos para o alelo determinante do aminoácido Arginina (ArgF/R) e e para o alelo da Prolina (ProF/R). Para detecção do HPV, foram coletados fragmentos de tecido tumoral de cada paciente em centro cirúrgico. As amostras de tumor foram armazenadas em solução RNAlater e submetidas posteriormente a extração de DNA tumoral. Essas amostras foram amplificadas por PCR (nested) para detecção do HPV utilizando os *primers* genéricos PGMY09/11 (450 pb) na primeira rodada, e os primers GP5+/GP6+ (170 pb) na segunda. Os produtos de PCR para detecção de HPV, bem como de determinação alélica do códon 72 de *TP53* foram avaliados em gel de agarose 1,5%. Os casos positivos para HPV foram sequenciados por eletroforese capilar para determinação do genótipo viral. A análise de expressão proteica de p53 foi conduzida por imuno-histoquímica, utilizando anticorpo monoclonal anti-p53 (DO-7) e seguindo protocolo recomendado pelo fabricante (Dako, Agilent Technologies). Todos os tumores foram revisados por dois patologistas para caracterização dos aspectos histopatológicos. Os resultados revelaram alta frequência de alelo arginina em homozigose (Arg/Arg), detectado em 88,6% dos casos, e todos os demais casos (26,4%) foram heterozigotos (Pro/Arg). Cerca de 66,7% dos casos foram positivos para HPV, sendo mais frequente o subtipo 16 (67,9%), de alto risco oncogênico. A análise de expressão proteica de p53 revelou positividade em 59,6% dos casos. Quando associados os dados entre si e com os aspectos clínicos e histopatológicos dos casos, houve associação entre a positividade para HPV e a presença de coilocitose ( $p=0,001$ ). A ausência de invasão perineural ( $p=0,002$ ) e estadiamento pT2 ( $p=0,016$ ) foram associados aos casos sem infecção por HPV-16. Ademais, foi observada associação entre a positividade para HPV e os casos com genótipo Arg/Arg ( $p=0,004$ ), e a ausência de expressão da proteína p53 esteve associada à tumores sem transformação sarcomatoide ( $p=0,012$ ), com estadiamento II ( $p=0,019$ ) e ausência de coilocitose ( $p=0,027$ ). Os achados desta pesquisa sustentam o papel da infecção por HPV em tumores de pênis e descreve aspectos importantes da relação entre o polimorfismo do códon 72 de *TP53* e a infecção pelo vírus, como tem sido relatado em outros cânceres HPV-associados.

**Palavras-chave:** câncer de pênis; HPV; polimorfismo *TP53*; proteína p53;

## ABSTRACT

Penile cancer (CaPe) has a low incidence in developed countries, but it represents 1/10 of all tumors that affect men in developing countries. Brazil has one of the highest incidences ever recorded, with the highest number of cases in the North and Northeast regions. The state of Maranhão accounts for 10.6% of all cases of CaPe diagnosed in the country, and has recently been considered the location with the highest incidence of the disease in Brazil and globally. CaPe has a multifactorial etiology, being associated with socioeconomic/behavioral factors and human papillomavirus (HPV) infection. The disease has become a serious public health problem in certain regions, mainly due to limitations in the therapeutic arsenal available for treatment, reflecting the scarcity of studies aimed at understanding the pathophysiological aspects and the genetic basis of these tumors. Therefore, the present study aimed to investigate the codon 72 polymorphism of the *TP53* gene in CaPe and its association with HPV infection and p53 protein expression. For this, a prospective study was designed and included the recruitment of 53 patients with CaPe in three oncology referral hospitals in Maranhão (HCAB, HUUFMA, and HGTLF), between 2020 and 2022. All patients signed an informed consent form (TCLE) and were interviewed to collect socio-behavioral data. For allelic determination of codon 72 of the *TP53* gene, peripheral blood samples were collected from each patient for DNA extraction from healthy cells. The DNA samples were submitted to qualitative PCR (Polymerase Chain Reaction) amplification using specific primer pairs for the Arginine amino acid determinant allele (ArgF/R) and the Proline allele (ProF/R). For HPV detection, small fragments of tumor were collected from each patient at the time of surgery. Tumor samples were stored in RNAlater solution and submitted to tumor DNA extraction. These samples were submitted to PCR (nested) for HPV detection using the generic primers PGMY09/11 (450 bp) in the first round, and the GP5+/GP6+ primers (170 bp) in the second. PCR products for HPV detection as well as allelic determination of codon 72 of *TP53* were evaluated in 1.5% agarose gel. HPV-positive cases were sequenced by capillary electrophoresis to determine the viral genotype. Analysis of p53 protein expression was performed by immunohistochemistry, using an anti-p53 monoclonal antibody (DO-7) and following the protocol recommended by the manufacturer (Dako, Agilent Technologies). All tumors were reviewed by two pathologists to characterize the histopathological aspects. The results revealed a high frequency of homozygous arginine allele (Arg/Arg), detected in 88.6% of cases, and all other cases (26.4%) were heterozygous (Pro/Arg). About 66.7% of the cases were positive for HPV, with the high-risk type 16 being the most prevalent (67.9%). The analysis of p53 protein expression revealed positivity in 59.6% of the cases. When the data were associated with each other and with the clinical and histopathological aspects, there was an association between HPV positivity and the presence of koilocytosis ( $p=0.001$ ). The absence of perineural invasion ( $p=0.002$ ) and pT2 staging ( $p=0.016$ ) were associated with cases without HPV-16 infection. Furthermore, an association was observed between HPV positivity and cases with the Arg/Arg genotype ( $p=0.004$ ). The absence of p53 protein expression was associated with tumors without sarcomatoid transformation ( $p=0.012$ ), in stage II ( $p=0.019$ ), and the absence of koilocytosis ( $p=0.027$ ). These findings support the role of HPV infection in CaPe and describe important aspects related to *TP53* codon 72 polymorphism and virus infection, as has been reported in other HPV-associated cancers.

**Keywords:** penile cancer; HPV; polymorphism *TP53*; p53 protein.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Gráfico 1.** Distribuição de casos diagnosticados com câncer de pênis (n=53) por ano (2020-2021) no Hospital Universitário Presidente Dutra (HUUFMA), Hospital Geral Tarquínio Lopes Filho (HGTLF) e Hospital do Câncer Aldenora Bello (HCAB) ..... 43
- Figura 1.** Processo de infiltração nas lesões penianas ..... 23
- Figura 2.** Apresentação da estrutura genômica do papilomavírus humano ..... 28
- Figura 3.** Ciclo de vida do HPV ..... 29
- Figura 4.** Localização esquemática do polimorfismo do códon 72 do éxon 4 do gene *TP53*... 33
- Figura 5.** Resultado da eletroforese do produto de PCR de detecção do polimorfismo do gene *TP53* (éxon 4, códon 72) em gel de agarose 1,5%. Os poços 1 a 4 representam o resultado da PCR para o alelo prolina (177 pb), sendo 1 (controle positivo para), 2 (amostra em análise), 3 (controle negativo) e 4 (branco). Os poços 5 a 8 representam o resultado da PCR para o alelo arginina (155 pb), sendo 5 (controle positivo para), 6 (amostra em análise), 7 (controle negativo) e 8 (branco)..... 53
- Figura 6.** Expressão da proteína supressora tumoral p53 através da técnica de imuno-histoquímica em cortes histológicos com representação das áreas de positividade para o marcador. (A) Corte de amígdala utilizado como controle positivo; (B) Carcinoma epidermóide peniano negativo para p53 (< 20% de imunomarcação); (C) Carcinoma epidermóide peniano exibindo positividade (+) para p53 (entre 20 e 50% de imunomarcação ); (D) Carcinoma epidermóide peniano exibindo marcação positiva (++) para p53 (acima de 50% de imunomarcação) ..... 57

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>Quadro 1.</b> Classificação dos HPVs quanto à categoria de risco oncogênico .....	27
<b>Quadro 2.</b> Perfil clínico-histopatológico dos 53 pacientes com câncer de pênis avaliados no presente estudo .....	46
<b>Quadro 3.</b> Dados de detecção e genotipagem de HPV das 51 amostras de câncer de pênis avaliadas. ....	48
<b>Quadro 4.</b> Perfil clínico-histopatológico de acordo com a detecção de HPV .....	50
<b>Quadro 5.</b> Perfil clínico-histopatológico de acordo com o polimorfismo de TP53 .....	53
<b>Quadro 6.</b> Perfil clínico-histopatológico dos tumores de acordo com a expressão de p53 (N=52) .....	57
<b>Tabela 1.</b> Sistema TNM para estadiamento de câncer de pênis de acordo com AJCC e UICC .....	24
<b>Tabela 2.</b> Classificação histológica de CEC em câncer de pênis .....	25
<b>Tabela 3.</b> Classificação da graduação de Broders .....	26
<b>Tabela 4.</b> <i>Primers</i> utilizados para detecção de HPV nas amostras de câncer de pênis .....	39
<b>Tabela 5.</b> Sequência dos primers e tamanho dos amplicons obtidos .....	41
<b>Tabela 6.</b> Especificações do anticorpo utilizado nos ensaios de imunohistoquímica .....	42
<b>Tabela 7.</b> Distribuição da expressão da proteína p53 nos casos avaliados (n=52) .....	56

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>µL</b>	Microlitro
<b>AJCC</b>	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
<b>Arg</b>	Aminoácido arginina
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<b>CaPe</b>	Câncer de pênis
<b>CEC</b>	Carcinoma de células escamosas
<b>CECis</b>	Carcinoma de células escamosas <i>in situ</i>
<b>CEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>CEPEC</b>	Centro de Pesquisa Clínica
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>HCAB</b>	Hospital do Câncer Aldenora Bello
<b>HE</b>	Hematoxilina-Eosina
<b>HGTLF</b>	Hospital Geral Tarquínio Lopes Filho
<b>HPV</b>	Papilomavírus humano
<b>HUUFMA</b>	Hospital Universitário Presidente Dutra
<b>IARC</b>	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
<b>kb</b>	kilobase
<b>LCR</b>	<i>Long control region</i>
<b>LIME</b>	Laboratório de Imunohistoquímica e Microscopia Eletrônica
<b>Min</b>	Minuto
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>pb</b>	par de base
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>Pro</b>	Aminoácido prolina
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>SBU</b>	Sociedade Brasileira de Urologia
<b>SLD</b>	Sobrevida livre de doença
<b>SNP</b>	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>TNM</b>	(T)Tumor, (N) Nódulos linfáticos e (M) Metástases à distância
<b>UICC</b>	<i>Union for International Cancer Control</i>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	19
2.1 Epidemiologia do câncer de pênis .....	19
2.2 Etiologia e fatores de risco .....	20
2.3 Aspectos clínicos e histopatológicos .....	22
2.4 O papilomavírus humano (HPV) e o câncer de pênis.....	26
2.5 O polimorfismo do códon 72 do gene <i>TP53</i> .....	30
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	33
3.1 Geral .....	33
3.2 Específicos .....	33
<b>4. ARTIGO</b> .....	34
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	54
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	55
<b>7. ANEXOS</b> .....	62

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer é o nome dado a um conjunto de doenças malignas que se caracterizam por apresentarem crescimento celular contínuo e descontrolado, podendo ocorrer restrito ao seu sítio primário ou com capacidade de migração para outros órgãos através das metástases. O câncer é considerado um problema de saúde pública mundial e possui etiologia multifatorial (INCA, 2000; COOPER, 2000).

Entre os tumores que atingem os homens, o câncer de pênis (CaPe) representa cerca de 10% das neoplasias que afetam esse gênero em países em desenvolvimento, como os da África, Ásia e América do Sul (OLESEN et al., 2014). Em áreas de maior incidência, como em algumas regiões da África, o CaPe chega a representar 17% de todas as neoplasias malignas que afetam os homens (BATISTA et al., 2014). A incidência do CaPe flutua de acordo com a região estudada e parece acompanhar proporcionalmente os indicadores sociais e econômicos da população (HERNANDEZ, et al., 2008; BERTINATO et al., 2021). Dentre os países da América do Sul, destaca-se o Brasil, com as maiores taxas já registradas da doença no mundo e índices oscilando entre 2,9 e 6,8 afetados por 100.000 homens (POW-SANG et al., 2010; VIEIRA et al., 2020).

Os levantamentos epidemiológicos nacionais apontam as regiões Norte e Nordeste como as de maior incidência do CaPe no Brasil. Juntas, essas regiões respondem por 53,2% dos casos registrados no país segundo dados da Sociedade Brasileira de Urologia (SBU) De acordo com este levantamento da SBU, cerca de 10,6% dos casos registrados no país ocorreram no estado do Maranhão (FAVORITO et al. 2008). A alta incidência de CaPe nas regiões Norte e Nordeste justifica-se parcialmente pela precariedade dos indicadores socioeconômicos quando comparados a outras regiões do país, como Sul e Sudeste. Esses dados evidenciam um grave problema de saúde pública local, especialmente no Maranhão, estado recentemente ranqueado como a localidade de maior incidência global de CaPe já registrada na literatura científica (COELHO et al., 2018). Apesar das lesões externas, a sintomatologia do CaPe é por vezes confundida com doenças genitais não-neoplásicas (como IST's), podendo ser desde o aparecimento de feridas indolores a sintomas mais característicos com lesões ulceradas purulentas e/ou de odor fétido (KORKES, 2020). A presença de muitos fatores de risco associados ao surgimento do CaPe torna a doença multifatorial, podendo estar relacionada à



falta de higiene, presença de fimose, etilismo, tabagismo e com infecção pelo papilomavírus humano (HPV) (COSTA, 2013; RODNEY, 2016).

Dentre os fatores de risco citados, destaca-se a infecção pelo papilomavírus humano (HPV), que está atrelada ao potencial do vírus em induzir instabilidade genética e desregular a expressão e funcionamento de proteínas importantes para manutenção da homeostase celular, sendo este processo classicamente relatado em câncer de colo de útero (ZUR HAUSEN, H et al., 2000; MOCH, 2016). No entanto, em tumores de pênis esses mecanismos ainda não foram totalmente elucidados.

Os pacientes com CaPe são diagnosticados por exames clínicos e histopatológicos. Após diagnóstico clínico, a análise histopatológica caracteriza o tumor quanto ao seu sítio primário e presença de metástase na região inguinal (NAM et al. 2017). Quanto à histologia desses tumores, os carcinomas de células escamosas (CECs) compreendem 95% dos casos de câncer de pênis, sendo considerado o tipo histológico mais frequente de CaPe (POMPEO et al., 2006). O diagnóstico precoce do CaPe é um desafio para os serviços de saúde, uma vez que os fatores sociais e econômicos atrelados a doença retardam ou até mesmo inviabilizam dos pacientes aos centros de referência. (NAM et al., 2017).

O arsenal terapêutico para o CaPe ainda é tímido quando comparado a outras neoplasias, como a próstata. Os protocolos quimioterápicos geralmente utilizam esquemas de combinação com platina (cisplatina ou carboplatina) e outras drogas como taxanos (paclitaxel, docetaxel) e ifosfamida, mas até o momento não há estudos randomizados em fase III que sustentem a eficácia dessas abordagens. A radioterapia também pode ser adotada para esses pacientes, no entanto, o índice de radioresistência e recidiva local após resposta inicial é alto. Esses fatores restringem a conduta e aumentam o número de amputações do pênis, especialmente devido ao elevado número de casos diagnosticados em estágio avançado (III-IV). A amputação do pênis é uma cirurgia mutilante que compromete significativamente a qualidade de vida dos pacientes (PAGLIARO et al., 2010; DI LORENZO et al., 2012; DJAJADININGRAT et al., 2015).

Apesar de sua alta incidência em certas regiões e das problemáticas citadas, o CaPe é pouco estudado e há carência de pesquisas que avaliem os aspectos moleculares/genômicos desse tipo de tumor, abordagens primordiais na busca por potenciais alvos terapêuticos. Os trabalhos até então realizados sustentam múltiplas vias moleculares para o desencadeamento e evolução dos tumores, destacando-se vias associadas à infecção por HPV e aquelas atribuídas a processos de inflamação crônica. Diante disso, múltiplas vias moleculares para o

desencadeamento desse tumor são sugeridas, envolvendo fatores carcinogênicos e condições inflamatórias (KAYES et al., 2007).

Nos últimos anos, uma vertente que vem sendo bastante explorada é o estudo dos polimorfismos (*Single nucleotide polymorphism* - SNPs, substituições de nucleotídeos em sequências de DNA) e como eles contribuem para o aparecimento de doenças como o câncer. Estudos nessa linha fornecem dados de predisposição genética, prognóstico e resposta a possíveis tratamentos (BORDEN et al., 2003). Em CaPe, correlações entre as alterações que envolvem o gene supressor tumoral *TP53* e a proteína por ele codificada (p53), fornecem dados importantes para o entendimento da etiologia molecular desses tumores e suas implicações na gênese, progressão e resposta terapêutica do CaPe. Considerando a participação do HPV na fisiopatologia do CaPe, um polimorfismo específico no códon 72 do éxon 4 do gene *TP53* tem se destacado em virtude da sua possível influência na persistência da infecção pelo vírus. (PILLAI et al., 2002).

Desta forma, diante das altas incidências de CaPe HPV-positivo no Maranhão, o presente estudo tem como principal objetivo analisar de forma integrada, os aspectos clínicos, etiológicos e moleculares envolvidos no processo tumorigênico induzido pela ação viral, buscando compreender a progressão de tumores de pênis e suscetibilidade à infecção por HPV no estado.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1. Epidemiologia do câncer de pênis**

O CaPe é uma neoplasia de alta morbimortalidade, de incidência relativamente rara em países desenvolvidos, como os da América do Norte e Europa ocidental, correspondendo apenas a 1% das doenças malignas que afetam os homens nos Estados Unidos segundo a Sociedade Americana de Câncer (*American Cancer Society*) (CHRISTOULIDOU et al., 2015). Notoriamente, em países que praticam a circuncisão neonatal, como Israel, há poucos relatos da doença, em contraste, o CaPe possui alta incidência em países em desenvolvimento, como os da África, Ásia e América do Sul, podendo ser responsável por mais de 10% das neoplasias

que afetam os homens em algumas dessas localidades (SHAVIT et al., 2013; OLESEN et al., 2014).

A disparidade entre a distribuição geográfica mundial, nacional e regional enquadra o CaPe como problema de saúde pública. Apresentando ampla magnitude principalmente em regiões economicamente desfavorecidas. Encontra-se principalmente atrelada a questões comportamentais, com dificuldade de acesso à educação e negligência na busca por assistência à saúde (REIS et al., 2010; KOIFMAN et al., 2011).

Na América do Sul, o Brasil apresenta um dos maiores índices registrados de CaPe. A incidência no país oscila de 2,9 a 6,8 afetados por 100.000 homens de acordo com a região estudada (FAVORITO, et al., 2008; POW-SANG et al., 2010). Na região nordeste, apresenta-se ranqueando na quarta posição em frequência de tumores mais recorrentes em homens (BARROS; MELO, 2009).

Estimativas da Sociedade Americana de Câncer para CaPe especulam cerca de 2.070 novos casos e 470 mortes pela neoplasia até o final de 2022. Em 2010, o coeficiente de mortalidade por CaPe em São Luís (capital do Maranhão) era de 5,51 óbitos por milhão de habitantes. Em 2020, esse índice aumentou 60,4%, passando para 8,84 óbitos por milhão de habitantes (BONFIM et a., 2017).

A alta incidência de CaPe no estado do Maranhão vem sendo evidenciada nos últimos 10 anos e recentemente foi considerada a maior do Brasil e do mundo (0,1 casos / 100.000 homens) em um trabalho publicado por Coelho e colaboradores (2018). Apesar disso, pesquisas que visem contribuir para a melhor compreensão da biologia desses tumores e busquem por biomarcadores com potencial diagnóstico, prognóstico e terapêutico para a doença ainda são escassas.

## **2.2. Etiologia e fatores de risco**

Apesar de sua etiologia ser considerada heterogênea do ponto de vista clínico e molecular, alguns fatores de risco como a fimose, má higiene genital e infecção por HPV têm sido fortemente atrelados ao desenvolvimento do CaPe (RODNEY, S. 2016). Trabalhos como os de Chaux e colaboradores (2013) e Morrison (2014) discorrem sobre a apresentação da neoplasia através de duas possíveis vias sendo a primeira associada à infecção pelo HPV, bem

como sua associação à fatores de risco atrelados às atividades sexuais (múltiplos parceiros sexuais, prática de zoofilia, etc); e a segunda (não associada ao HPV) a atividades sociocomportamentais (como exemplos: higiene, etilismo e tabagismo).

Quanto à infecção por HPV, sua associação com CaPe têm sido mais abordada à medida que se encontra uma maior positividade para o vírus nesses tumores (AFONSO et al., 2012; COUTO et al., 2014). O vírus parece desempenhar um importante papel no desenvolvimento de um subgrupo desses carcinomas, sendo sua presença relacionada com determinados subtipos histológicos (ALEMANY et al., 2016). Em CaPe, o mecanismo molecular envolvido na carcinogênese HPV-dependente parece ser semelhante a outros tumores associados ao vírus, como o câncer de colo do útero e de cabeça e pescoço. Nesses tumores, a ação do HPV está principalmente relacionada à inativação de duas importantes proteínas reguladoras do ciclo celular, a pRb (via oncoproteína viral E6) e a p53 (mediada pela oncoproteína viral E7) (SOARES, 2014; MOCH, 2016).

Ao longo da última década, muitos trabalhos vêm relatando a presença do HPV em cerca de 40-50 % de pacientes com câncer de pênis (STANKIEWICZ et al., 2011; ALEMANY, 2016; OLESEN et al., 2019), sendo esse percentual aumentado em regiões como o Maranhão (80-90%) (MARTINS et al., 2018). Apesar disso, apenas a presença do HPV no tecido tumoral não é suficiente para considerá-lo participante efetivo da carcinogênese, sendo necessário avaliar se a infecção está ativa para comprovação que mecanismo viral efetivamente está desregulando a homeostasia celular (BOSCH et al., 2013). Na prática clínica, uma abordagem comum indicação de infecção ativa por HPV de alto risco oncogênico é a análise de superexpressão da proteína p16 por imuno-histoquímica (MARTINS et al., 2018).

Entre os fatores sociocomportamentais atrelados ao CaPe, destaca-se a fimose, condição anatômica que impossibilita a retração do prepúcio. A fimose tem sido reportada em diversos estudos com CaPe, especialmente em função do seu impacto na higienização adequada do pênis. Além disso, a fimose torna o microambiente peniano mais propício ao surgimento de condições inflamatórias, como a balanite, a postite e o líquen escleroso, sobretudo em função da constante irritação do epitélio escamoso (LEE et al., 2013; SONPAVDE et al., 2013; MORRIS et al., 2017).

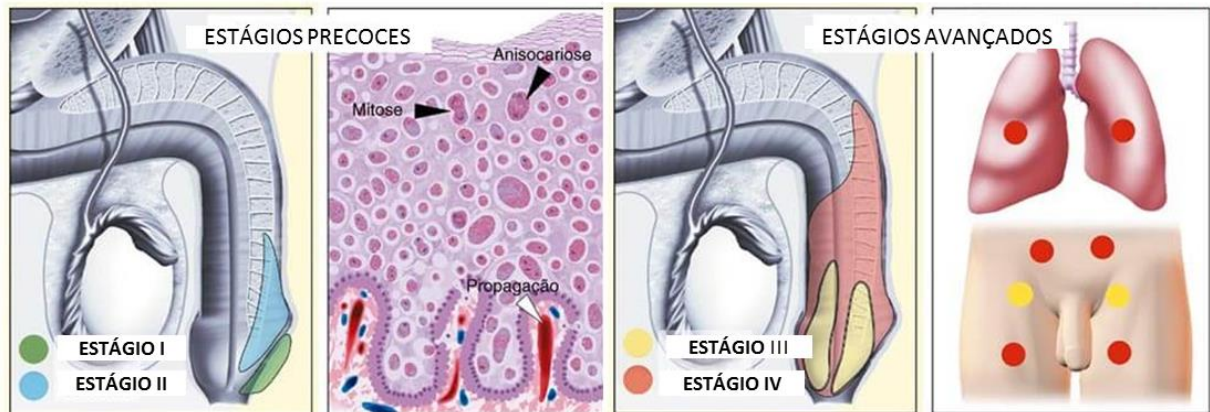
A doença acomete majoritariamente pacientes com idade entre 50 e 70 anos, sendo observada no Maranhão, média de idade de 60 anos. O nível socioeconômico e educacional desses pacientes é baixo e desfavorável, atrelado ainda a maus hábitos de higiene, consumo

excessivo de álcool e tabagismo (DE SOUSA et al., 2005; LISBÔA, 2019). Tabagismo e etilismo são fatores de risco que vêm sendo associados a vários tipos de neoplasias (Couto et al., 2014). Trabalhos como os de Koifman e colaboradores (2011) demonstraram que 56,5% dos casos de pacientes com CaPe eram fumantes, sugerindo que o tabagismo pode representar um fator de risco para o desenvolvimento da neoplasia. Ademais, a relação com o etilismo e o desenvolvimento da doença também já foi relatada, como em estudo de Gao e colaboradores (2016) e Mcintyre e colaboradores (2022).

### **2.3. Aspectos clínicos e histopatológicos**

O diagnóstico do CaPe é majoritariamente clínico, onde, segundo a Sociedade Americana de Câncer (2015), alterações na cor e textura da pele, presença de nódulos, feridas, úlceras e secreções persistentes com ou sem sangramento representam as principais queixas associadas ao surgimento do tumor. Apesar da acurácia do diagnóstico clínico, a realização de biópsia excisional para confirmação histológica é indispensável (PIZZOCARO et al., 2010; CHRISTOULIDOU et al., 2015)

Os CECs de pênis geralmente iniciam no epitélio da glândula ou prepúcio (estágio I) e infiltram precocemente para áreas adjacentes (estágio II). Se não tratadas, essas lesões evoluem para metástase regional (linfonodos inguinais e pélvicos) ou metástase à distância (estágios III-IV) (Figura 1) (DE PAULA et al., 2012). Em um trabalho realizado por Couto e colaboradores (2014), cerca de 31,9% dos casos de CaPe possuíam metástase linfonodal unilateral ou bilateral. Ao avaliar esse parâmetro, Shah e colaboradores (2016) descreveram o impacto do comprometimento linfonodal na sobrevida livre de doença (SLD) e observaram que esse intervalo é de aproximadamente cinco anos em casos com linfonodos negativos. Em trabalhos de Novara e colaboradores (2007), observa-se uma queda nesse percentual quando analisado em relação ao número de linfonodos comprometidos, demonstrando uma correlação negativa entre a SLD e o comprometimento linfonodal.



**Figura 1.** Processo de infiltração nas lesões penianas. Fonte: Medical Illustration.

Em pacientes com CaPe, a presença e extensão de metástase envolvendo os linfonodos inguinais são os fatores preditivos mais importantes de sobrevida, pois estão geralmente associados a um quadro de prognóstico desfavorável. A linfadenectomia (esvaziamento linfonodal) é comumente realizada em CaPe e este procedimento tem um papel essencial no manejo de pacientes com metástase para linfonodos inguinais (PAIVA, 2010; HAKENBERG et al., 2018).

A grande maioria dos pacientes que possuem comprometimento linfonodal têm em comum o fato de apresentarem diagnóstico tardio (SOUSA et al., 2014). Corroborando com dados do Hospital A.C Camargo (2015), no Brasil, cerca de 90% dos pacientes só procuram atendimento médico quando apresentam estágios mais avançados da doença (SOUZA e MARQUES, 2015). A demora na procura por atendimento limita a conduta terapêutica a ser realizada e a indicação cirúrgica passa a ser a única opção viável para a erradicação da doença. As penectomias, parciais ou totais, são os procedimentos cirúrgicos mais realizados em casos cujo estadiamento são agressivos. Ambos os procedimentos representam mudanças irreversíveis na saúde masculina, tanto física quanto psicológica (KOIFMAN et al., 2013; RAPOSO et al., 2016).

Após o diagnóstico clínico, a análise histopatológica caracteriza o tumor quanto ao seu sítio primário e comprometimento da região inguinal, a configurando como peça-chave na classificação e determinação do estadiamento tumoral (NAM et al., 2017). O sistema de classificação recomendado para CaPe é o TNM (tabela 1) o qual foi proposto pela *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* juntamente com a *Union for International Cancer Control (UICC)*, que leva em consideração extensão do tumor (T), o comprometimento de linfonodos

regionais (N) e a presença de metástase à distância (M). São essas informações que fornecem a base para avaliação do estadiamento tumoral.

Os carcinomas de células escamosas (CEC) compreendem 95% dos casos de CaPe, sendo o tipo histológico mais frequente, e caracteriza-se histologicamente por queratinização, formação de pérola córnea e apresentação de vários graus de atividade mitótica, variando de acordo com o grau de agressividade, padrões de crescimento e prognóstico. O principal subtipo histológico do CEC de pênis é o usual (48-65%), seguido pelo condilomatoso (17%), verrucoso (8%), papilar (7-10%) e basalóide (5-15%) (CUBILLA, 2009). Geralmente os demais subtipos apresentam padrões infiltrativos e crescimento variado (CALMON et al., 2011).

Em 2016, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou uma classificação histopatológica para tumores de pênis onde os subtipos histológicos foram divididos em dois grupos, aqueles associados à infecção por HPV e aqueles não associados (Tabela 2). Os subtipos histológicos possuem papel chave no diagnóstico do paciente, e sua associação ou não associação com HPV está atrelada a um risco maior de metástases e óbitos (GUIMARÃES et al., 2009).

**Tabela 1.** Sistema TNM para estadiamento de câncer de pênis de acordo com AJCC e UICC.

<b>Tumor primário (T)</b>	<b>Descrição</b>
<b>Tx</b>	Tumor primário não é passível de avaliação
<b>T0</b>	Sem evidência de tumor primário
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ
<b>Ta</b>	Carcinoma de células escamosas, localizado e não invasivo
<b>T1</b>	Glande: tumor invade a lâmina própria
	Prepúcio: tumor invade a derme, lâmina própria ou dartos
	Haste: tumor invade o tecido conectivo entre epiderme e corpo cavernoso
	Todos os sítios com ou sem invasão linfática ou perineural, sendo de alto grau ou não.
<b>T1a</b>	Sem invasão linfovascular ou perineural e não é de alto de grau
<b>T1b</b>	Apresenta invasão linfovascular ou perineural e é de alto de grau
<b>T2</b>	Tumor invade corpo esponjoso, invadindo ou não o trato uretral
<b>T3</b>	Tumor invade os corpos cavernosos (incluindo túnica albugínea), invadindo ou não o trato uretral
<b>T4</b>	Tumor invade outras estruturas adjacentes (escroto, próstata, osso púbico)
<b>Linfonodos regionais (N)</b>	

<b>NX</b>	Linfonodos regionais não passíveis de avaliação
<b>N0</b>	Sem metástases nos linfonodos regionais
<b>N1</b>	Metástase unilateral
<b>N2</b>	Metástase múltiplas ou bilaterais superficiais
<b>N3</b>	Metástase em linfonodos profundos pélvicos ou inguinais
<b>Metástase distante (M)</b>	
<b>MX</b>	Metástase distante não é passível de avaliação
<b>M0</b>	Ausência de metástase à distância
<b>M1</b>	Presença de metástase a distância
<b>Estadiamento</b>	
<b>Ois</b>	Tis, N0, M0
<b>Oa</b>	Ta, N0, M0
<b>I</b>	T1a, N0, M0
<b>IIa</b>	T1b, N0, M0
<b>IIa</b>	T2, N0, M0
<b>IIb</b>	T3, N0, M0
<b>IIIa</b>	T1-3, N1, M0
<b>IIIb</b>	T1-3, N2, M0
<b>IV</b>	T4, N+, M0
<b>IV</b>	Tis-T4, N3, M0
<b>IV</b>	Tis-T4, N+, M1

Fonte: AJCC, 2018.

**Tabela 2.** Classificação histológica de CEC em câncer de pênis.

<b>CEC HPV-não-associado</b>	<b>CEC HPV-associado</b>
CEC usual	CEC condilomatoso
CEC verrucoso	CEC basalóide
CEC papilar	CEC warty-basalóide
CEC pseudo-hiperplásico	CEC medular
CEC sarcomatóide	CEC linfoepitelioma-like
CEC pseudoglandular	CEC células claras
CEC adenoescamoso	CEC misto*
CEC misto*	



(\*) dois subtipos não relacionados ao HPV; (\*\*) pelo menos um componente HPV-associado. Fonte: Adaptado de Who (2018) e CANETE-PORTILLO et al., (2020).

Quanto ao grau de diferenciação desses tumores, o CaPe é classificado segundo os critérios de Broders (2016) em três categorias como estão descritas na Tabela 3: Grau I (bem diferenciado); Grau II (moderadamente diferenciado) e Grau III (pouco diferenciado). Trabalhos como os de Cubilla e colaboradores (2001) e Pompeo (2010) relataram estreita associação entre lesões com alto grau de diferenciação e metástase linfonodal, à distância e mortalidade em CaPe.

**Tabela 3.** Classificação da graduação de Broders.

Grau	Descrição
G1	Bem diferenciado
G2	Moderadamente diferenciado
G3	Pouco diferenciado

Fonte: MOCH, 2016

## 2.4. O papilomavírus humano (HPV) e o câncer de pênis

O papilomavírus humano (HPV) pertence a uma família constituída por mais de 150 vírus, – a família *Papillomaviridae*. São vírus compostos por um capsídeo não envelopado que engloba uma fita dupla de DNA circular com aproximadamente 8.000 pares de bases (PARTRIDGE, KOUTSKY, 2006; BERNARD et al., 2010). Esses vírus são classificados pela Agência Internacional de Pesquisa em Avaliação do Câncer (IARC) em três grupos (Quadro 1), e essa classificação é realizada de acordo com a capacidade do vírus de transformar células epiteliais em células cancerígenas. As principais manifestações clínicas dos subtipos de baixo risco oncogênico são: verrugas na pele, boca, lábios e genitais, enquanto as manifestações dos riscos intermediários e de alto risco se caracterizam por lesões pré-malignas e tumores invasivos (DE SANJOSÉ et al., 2018). Dentre os subtipos de alto risco oncogênico, o 16 e o 18 estão

entre os mais encontrados em amostras de CaPe, tanto invasivos quanto *in situ* (FLAHERTY et al., 2014; SOUSA, 2015).

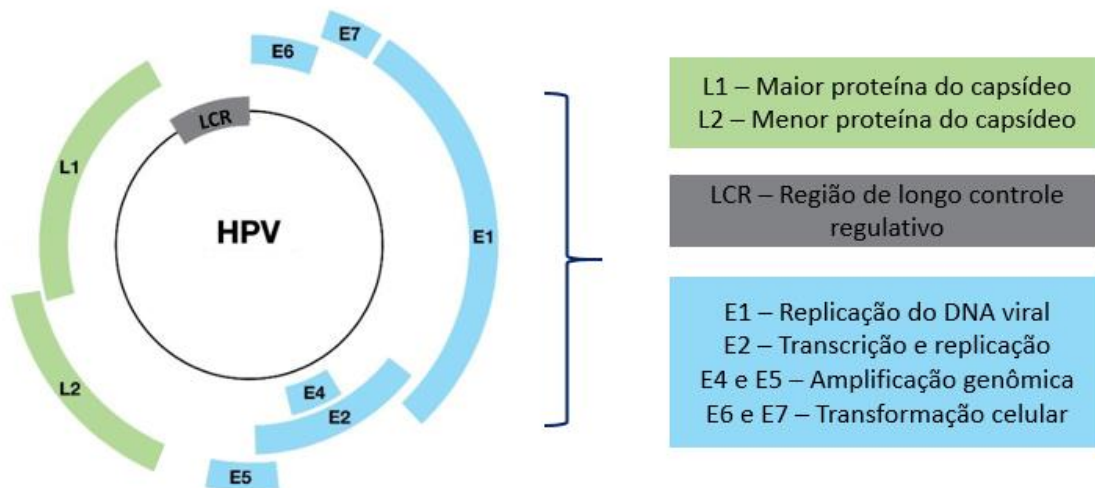
Os subtipos de alto risco vêm sendo observados com altas prevalências em diversos tipos de carcinomas, dentre eles: carcinoma anal (BENEVOLO et al., 2016), carcinoma de cérvix (SABEENA et al., 2016), carcinoma de vulva e de cabeça e pescoço (DOK e NUYTZ, 2016). As maiores estimativas de prevalência global em CaPe são dos subtipos de HPV-16 (cerca de 60,2%) e de HPV18 (cerca de 13,4%) (FLAHERTY et al., 2014). Scheiner e colaboradores (2008) e Afonso e colaboradores (2012), em trabalhos realizados no Rio de Janeiro, apresentaram prevalências variando entre 60-75% com maior frequência do subtipo 16.

**Quadro 1.** Classificação dos HPVs quanto à categoria de risco oncogênico.

Risco oncogênico	Subtipo de HPV
Baixo	6, 11, 26, 42, 43, 53, 54, 61, 70, 81
Intermediário	32, 34, 53, 62, 64, 71, 72, 73, 82, 83, 84, 85, 89, 97, 102, 106
Alto	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 82

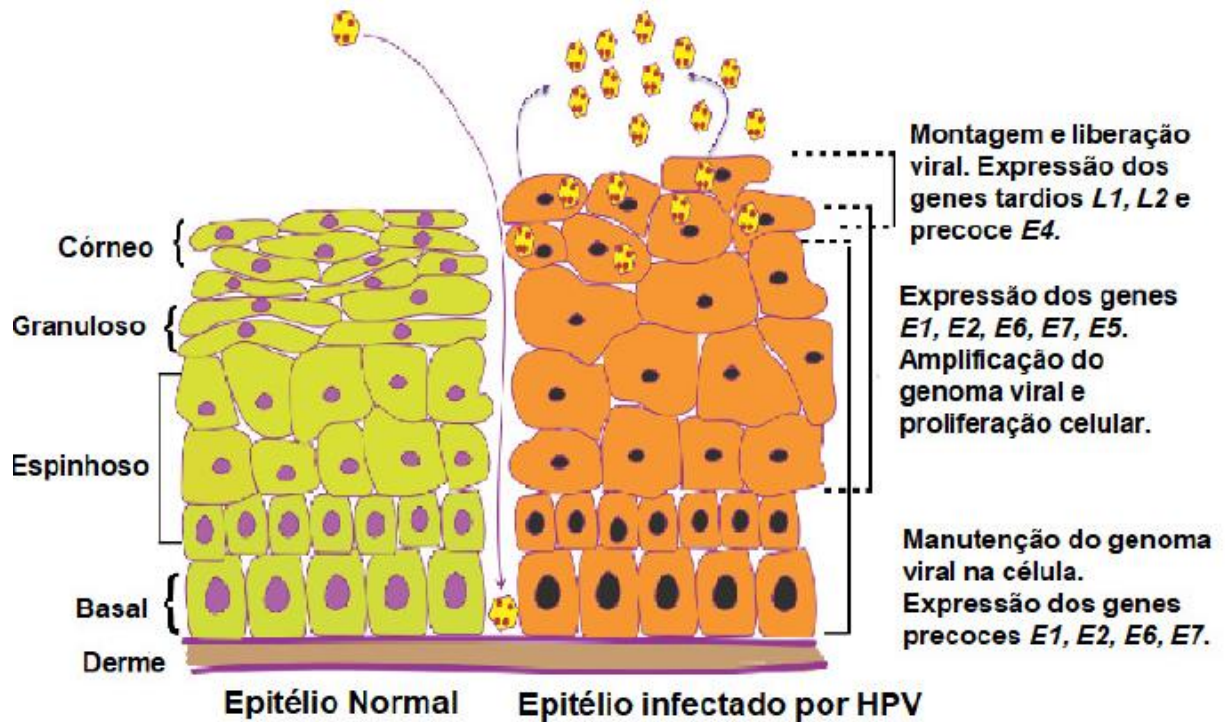
Fonte: SOUSA et al., 2015.

A organização do DNA do HPV é simples e costuma ser dividida em regiões codificantes e uma região não codificante. A região codificante, ou região precoce, é constituída por um conjunto de oito genes que estão envolvidos com a codificação de proteínas envolvidas na replicação e transcrição (E1 e E2) e os genes envolvido na amplificação genômica e transformação celular (E4, E5, E6 e E7); a região não codificante, ou região tardia, que conta com os genes L1 e L2, responsáveis por codificar as proteínas da estrutura do capsídeo viral; e ainda, uma região denominada de LCR (longo controle regulativo) responsável pelo controle da transcrição, conforme demonstrado na Figura 2 (DOORBAR et al., 2012; MITTAL; BANKS, 2017).



**Figura 2.** Apresentação da estrutura genômica do papilomavírus humano (Adaptado de YU, 2017).

Alguns mecanismos moleculares estão envolvidos no processo de tumorigênese induzida por HPV, incluindo genes virais importantes no processo de desregulação celular e multiplicação viral (CAMPOS et al., 2017). Ao longo de todo o ciclo infeccioso do vírus, esses genes são expressos de diferentes maneiras, tanto espaciais quanto temporais. Após o início da infecção viral na região mais basal do epitélio, o genoma do HPV começa a se comportar como elemento extracromossômico para integrar-se ou não ao DNA da célula do hospedeiro. Com a diferenciação celular, essas células passam para as camadas superficiais da epiderme ao passo que os genes vão sendo transcritos e posteriormente ativados para que ocorra a amplificação do DNA viral e proliferação anormal celular. Durante a amplificação, algumas células migram para camada mais superficial do epitélio e iniciam o processo final de diferenciação, ativando os genes que codificam as proteínas da estrutura do capsídeo, levando ao seu encapsulamento e liberação, para que posteriormente ocorra nova infecção e o reinício do ciclo viral (Figura 3) (GILL, et al., 2014; GHITTONI et al., 2015; MITTAL; BANKS, 2017).



**Figura 3.** Ciclo de vida do HPV. Fonte: Adaptado de Mittal e Banks (2017).

As proteínas virais lançam mão de um complexo mecanismo para induzirem à desregulação da célula hospedeira. O principal deste, e mais conhecido, é o potencial oncogênico das proteínas E5, E6 e E7, que juntas atuam diretamente no descontrole da homeostase celular, promovendo proliferação descontrolada e transformação maligna (ZUR HAUSEN, H. 2000). Essas oncoproteínas podem interagir com proteínas celulares, miRNAs, mRNAs, fatores de transcrição, etc. A via mais bem estudada descreve o papel de regulação de E6 sob p53, uma importante proteína supressora tumoral, que neste complexo é induzida à degradação (GILL et al., 2014).

A relação do HPV com neoplasias de células escamosas já é bem estabelecida, como em trabalhos com câncer de colo do útero e câncer de cabeça e pescoço. A associação com câncer de pênis ainda não é bem compreendida, contudo, tem sido cada vez mais evidenciada frente aos altos índices de positividade para o vírus nestes tumores (AFONSO et al., 2017). Estudos que avaliam a prevalência do DNA do HPV em lesões de pênis demonstraram que 42-60% testam positivo, embora, como citado anteriormente, alguns subtipos histológicos estão mais associados ao vírus que outros (MCMURRAY et al., 2001). De acordo com Backes et al. (2009), a prevalência do HPV diferiu de acordo subtipo histológico de células escamosas do pênis, variando de 22,4% no carcinoma verrucoso a 66,3% para o subtipo basalóide e

condilomatoso. O tipo viral HPV-16, considerado de alto risco oncogênico, é o mais comum identificado em CaPe (60% dos casos HPV positivos), sendo detectado em 29 tumores como um único tipo de HPV (48,3%) e como infecção de múltiplos tipos virais em 7 tumores (11,6%) de acordo com Rubin e colaboradores (2001).

A infecção pelo papilomavírus humano geralmente é eliminada pelo sistema imunológico do hospedeiro e apenas quando essa eliminação não ocorre, a infecção passa a ser persistente, tendo como característica o desenvolvimento de quadro de inflamação crônica em decorrência do estímulo do vírus no local e às lesões. Em CaPe, a infecção por HPV reforça a importância da imunização em homens, tanto para a prevenção do carcinoma de pênis, quanto de outras neoplasias relacionadas ao vírus (FLAHERTY et al., 2014). Em estudos realizados no Brasil, a positividade para o HPV em CaPe varia de acordo com a região estudada. No estado do Maranhão, o primeiro estudo com tumores de pênis e HPV foi conduzido por De-Sousa e colaboradores (2015), onde foi possível identificar a presença do vírus em 63% dos tumores avaliados, sendo mais frequentes os subtipos 16, 18, 45 e 69. Posteriormente, Martins et al (2018) detectaram o vírus em 89,1% dos tumores avaliados no Maranhão, dos quais os subtipos virais mais frequentes encontrados foram o 16 e 18.

## **2.5. O polimorfismo no códon 72 do gene *TP53***

Nos últimos anos, inúmeras evidências de que alguns polimorfismos genéticos estão relacionados a uma maior suscetibilidade ao câncer surgiram (LIMA et al., 2006). Os polimorfismos de nucleotídeo único, ou polimorfismos de nucleotídeo simples, do inglês *Single nucleotide polymorphism* (SNPs), têm por definição a substituição de um único nucleotídeo por outro em uma sequência de DNA (HUSZNO; GRZYBOWSKA, 2018). São um dos tipos mais comuns de alterações no material genético, ocorrendo em >1% da população (BROOKS, 1999).

Polimorfismos de proteínas celulares têm sido associados à maior suscetibilidade à infecção pelo HPV e pela persistência das infecções, visto que as manifestações de carcinomas por indivíduos infectados por HPV começaram a gerar lacunas no entendimento da etiologia desses tumores, indicando que apesar do vírus ser importante, o mesmo não seria suficiente para explicar as transformações celulares na oncogênese do tumor (PILLAI et al., 2002).

Sabe-se que a proliferação celular está diretamente ligada à reguladores negativos do ciclo celular, como os genes supressores de tumor, através de sua perda ou inativação ao longo do ciclo. Um dos mais bem estudados, dentro da categoria de cânceres humanos, é o gene supressor tumoral *TP53*, que atua em diversas funções celulares, como no crescimento celular e regulação do desenvolvimento (LATTUADA et al., 2004; GALLO et al., 2005; HAMÚ et al., 2007). Trata-se de um gene localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1), medindo 20kb e contendo 11 éxons, sendo o seu primeiro, não codificante e altamente conservado (FURUWATARI et al., 1998; GALLO et al., 2005; KASTENHUBER; LOWE, 2017).

O gene *TP53* trata-se de um dos principais genes envolvidos na carcinogênese humana e sua via metabólica aparece alterada na maioria dos tumores invasivos, sendo considerado um gene altamente polimórfico, apresentando mais de 14 polimorfismos diferentes (Oliveira et al., 2005). A regulação que envolve a proteína p53 (codificada pelo gene *TP53*) está associada a genes relacionados: ao bloqueio do ciclo celular (b99), apoptose (BAX), angiogênese (TSAP-6), no reparo do DNA (MSH2) e na evolução para metástases (KAI). Na ocorrência de regulação coordenada mediada por p53, a integridade genômica é preservada através de seus efeitos anti-proliferativos (GALLO et al., 2005; LEVINE et al., 2006; KASTENHUBER; LOWE, 2017).

O polimorfismo mais estudado no gene *TP53* está localizado no códon 72 (éxon 4) e se encontra no segmento do domínio SH3 (domínio funcional de ligação). Sua apresentação é composta por três variantes: arginina (Arg, CGC), prolina (Pro, CCC) e cisteína (Cys, TGC), sendo o SNP que leva a incorporação da cisteína de frequência muito baixa (SIDDIQUE et al., 2005; LIMA et al., 2006). A substituição de uma base no códon resulta na alteração estrutural da proteína p53, resultando na presença de duas variantes para o resíduo 72 (Figura 4). A simples substituição de uma base no códon gera uma alteração estrutural da proteína p53 (GALIOTTO, 2011). O papel deste polimorfismo na atividade da proteína p53 vêm sendo avaliado nos últimos anos, visto que, a troca dos aminoácidos ocorre em um domínio rico em resíduos de prolina, e se caracteriza por ser uma região necessária para a realização de atividade de supressão do crescimento celular com papel importante na ação apoptótica mediada por p53 (LIMA et al., 2006; DAS et al., 2007; WHIBLEY et al., 2009).

Essa associação tem sido documentada como fator de risco para muitos tipos de cânceres e como fator prognóstico da doença (LIMA J et al., 2006; TOYAMA et al., 2007; BAKHOUM et al., 2018). Este polimorfismo em homozigose foi associado a um risco 7x maior

de desenvolvimento de tumores associados ao HPV quando comparado aos polimorfismos Arg/Pro e Pro/Pro (LIN et al., 2008). Diversos estudos têm relatado que a variante em questão afeta a função da proteína p53 (KATO et al., 2003; BERGE et al., 2013; BALLY et al., 2015; GIACOMELLI et al., 2018; KOTLER et al., 2018). Em um estudo visando determinar a variante de p53 em tumores de cólon do útero de mulheres brasileiras, foi observado que cerca de 67% destas possuíam homozigose para este polimorfismo e 33% eram heterozigotas (Arg/Pro) (BAKHOUM et al., 2018). Além disso, tumores infectados com diferentes variantes do subtipo viral 16 possuem comportamento clínico variável (CHEN et al., 2015).

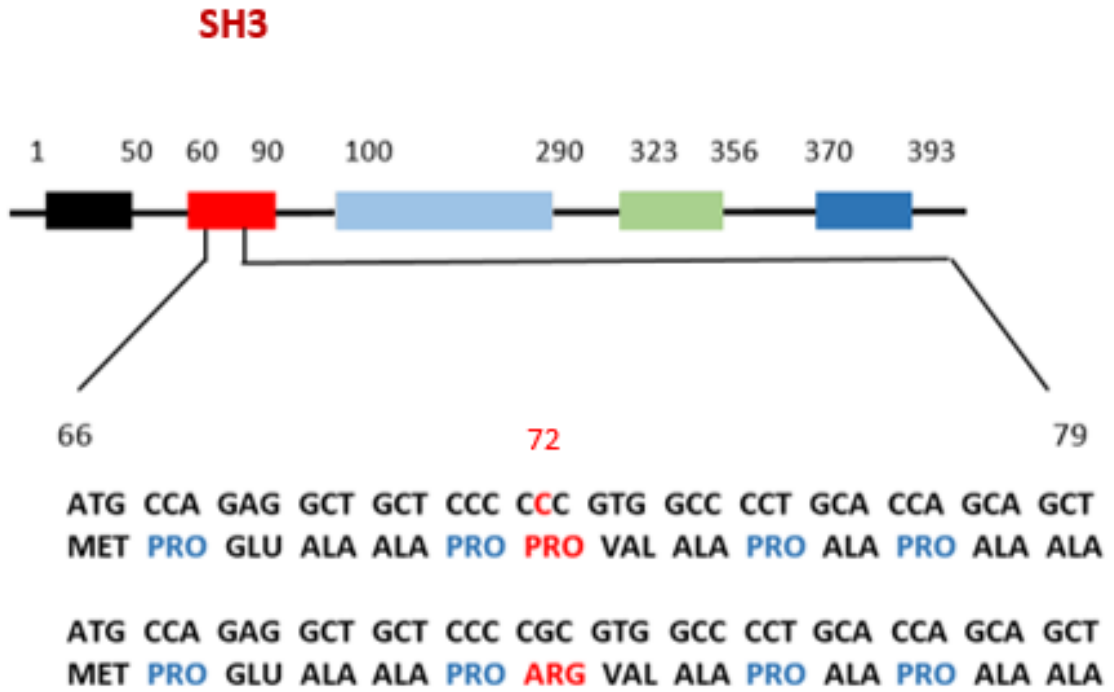
De modo geral, o gene *TP53* é frequentemente alterado no câncer, podendo ocorrer mutações de ganho/perda de função ou que comprometam a atividade proteica. Trabalhos como os de Hollstein e colaboradores (1994) demonstraram que essas alterações na proteína p53 podem ser encontradas em mais de 50 tipos de células e em mais de 50% de todos os tumores humanos. O que é reafirmado por Grzybowska (2018), que relata que as alterações de função dessa proteína podem ser responsáveis por afetar progressão e resposta ao tratamento do câncer.

Dos mecanismos utilizados pelo papilomavírus humano (HPV), uma das propriedades mais conhecidas é da oncoproteína E6, expressa durante a fase precoce de infecção viral. Para que seja funcional, a proteína E6 se liga à proteína E6-AP, (E6 – associated protein), uma importante integrante da família E3 de ubiquitinas ligases. Essa associação induz a formação de um complexo com a p53, promovendo a degradação proteolítica da mesma através da via da ubiquitina-proteassoma (LIMA et al., 2013).

Na maioria dos tecidos, a p53 é expressa como uma proteína de função reguladora, podendo mediar efeitos antiproliferativos, isso inclui a regulação transcricional, o reparo da molécula de DNA, a apoptose (morte celular programada), e a angiogênese. Em média, 200 genes no genoma humano provavelmente são regulados pela proteína p53 (BARBOSA, 2007). Em cerca de 50% de cânceres humanos, a p53 é inativada diretamente por mutação, enquanto no restante, a atividade de p53 é suprimida devido à perturbação de suas vias associadas (VOGELSTEIN, B.; SUR, S.; PRIVES, C. 2010).

Em resumo, a degradação de p53 impacta diretamente diversas funções consideradas críticas para homeostasia celular. Dessa forma, o HPV age bloqueando os genes associados ao fenômeno apoptótico, contribuindo para a instabilidade genômica (DUESING et al., 2004). Para o agente infeccioso, esse efeito pode aliviar as restrições na síntese de DNA, permitindo

sua replicação. Vale destacar que a indução da degradação de p53 parece ser uma propriedade exclusiva da E6 de genótipos de alto risco (GHITTONI et al., 2015).



**Figura 4.** Localização esquemática do polimorfismo do códon 72 do exon 4 do gene *TP53*.



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Geral**

Identificar a frequência do polimorfismo no códon 72 do gene *TP53* e sua relação com a infecção pelo papilomavírus humano em tumores de pênis.

#### **3.2. Específicos**

**3.2.1** Caracterizar o perfil clínico e histopatológico de pacientes com câncer de pênis em uma coorte do estado do Maranhão, Brasil;

**3.2.2** Identificar a frequência do polimorfismo no códon 72 do gene *TP53* (arginina/prolina) em tumores de pênis;

**3.2.3** Detectar a presença do papilomavírus humano (HPV) em tumores de pênis e genotipar os principais tipos virais;

**3.2.4** Investigar a relação entre o polimorfismo no códon 72 (arginina/prolina) do gene *TP53* e a infecção por HPV em tumores de pênis;

**3.2.5** Avaliar a expressão da proteína p53 em tumores de pênis;

**3.2.6** Correlacionar os achados de polimorfismo no códon 72 do gene *TP53* com perfil de infecção por HPV, perfil de expressão proteica de p53 e os aspectos clínicos e histopatológicos de pacientes com câncer de pênis.

## 4. ARTIGO

Manuscrito submetido a revista *Frontiers in Oncology* - Webqualis A2

### ***TP53* codon 72 Arg/Arg polymorphism reveals association with human papillomavirus in penile cancer**

**Thalita Moura Silva Rocha<sup>\*1,2</sup>; Antonio Augusto Lima Teixeira-Júnior<sup>2,3</sup>; Thaís Bastos Moraes Sobrinho<sup>2</sup>; Denner Rodrigo Diniz Duarte<sup>2</sup>; Juliana Martins da Guia Ribeiro do Carmo<sup>2</sup>; Syomara Pereira da Costa Melo<sup>1,4</sup>; Rita da Graça Carvalhal Frazão Corrêa<sup>4</sup>; Liseana de Oliveira Barbosa<sup>4</sup>; José de Ribamar Rodrigues Calixto<sup>4</sup>; Marta Regina de Castro Belfort<sup>2,4</sup>, Gyl Eanes Barros Silva<sup>\*1,2,4,5</sup>.**

<sup>1</sup> Postgraduate Program in Health Science, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil

<sup>2</sup> Laboratory of Immunofluorescence and Electron Microscopy, University Hospital of the Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil.

<sup>3</sup> Department of Genetics and Postgraduate Program in Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

<sup>4</sup> University Hospital of the Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil.

<sup>5</sup> Department of Pathology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

**\*Correspondence: Thalita Moura Silva Rocha, University Hospital of Federal University of Maranhão (HUUFMA), Rua Barão de Itapari, 227, Centro, CEP: 65020-070, São Luís, Maranhão, Brazil. E-mail: thalita.moura@discente.ufma.br**

**\*Correspondence: Gyl Eanes Barros Silva, University Hospital of Federal University of Maranhão (HUUFMA), Rua Barão de Itapari, 227, Centro, CEP: 65020-070, São Luís, Maranhão, Brazil. E-mail: gyl.silva@ufma.br**

## Abstract

Penile cancer is a poorly studied neoplasm and the number of studies aiming to evaluate genomic aspects and potential therapeutic targets are scarce. Thus, this study aimed to investigate the role of codon 72 polymorphism of the *TP53* gene in penile tumors and its relationship with the profile of HPV infection and p53 protein expression. For this purpose, we conducted a prospective study that recruited 53 patients with penile cancer from three oncology referral hospitals in the state of Maranhão, Brazil, a location with the highest incidence worldwide. For allelic determination of codon 72 of the *TP53* gene, peripheral blood samples were collected from each patient for extraction of DNA from healthy cells. For HPV detection, fresh tumor tissue fragments were collected from each patient. HPV positive cases were sequenced by capillary electrophoresis for viral genotype determination and p53 protein expression analysis was conducted by immunohistochemistry. The results revealed a high frequency of the arginine allele in homozygosity, detected in 84.7% of cases, with all other cases heterozygous. About 66.7% of cases were positive for HPV, with the high oncogenic risk subtype 16 being most frequent. Analysis of p53 protein expression revealed positivity in 59.6% of cases. When the data were associated with each other and with the clinical and histopathological aspects of the cases, there was an association between positivity for HPV and the presence of koilocytosis ( $p=0.001$ ). The absence of perineural invasion ( $p=0.002$ ) and classification of the primary tumor as pT2 ( $p=0.016$ ) were associated with cases without HPV-16 infection. Moreover, an association was observed between HPV positivity and cases with homozygous genotype ( $p=0.004$ ), and the absence of p53 protein expression was associated with tumors without sarcomatoid transformation ( $p=0.012$ ), with stage II ( $p=0.019$ ) and absence of koilocytosis ( $p=0.043$ ). The findings of this research support the role of HPV infection in penile tumors and describe important aspects of the relationship between *TP53* codon 72 polymorphism and virus infection, as has been reported in other HPV-associated cancers.

**Keywords:** penile cancer; HPV; polymorphism *TP53*; p53 protein.

## 1 BACKGROUND

Among the tumors that affect men, penile cancer (PC) represents about 10% of neoplasms affecting this gender in developing countries, such as those in Africa, Asia and South America (1). Among the South American countries, Brazil stands out, with the highest recorded rates of the disease in the world (2,3). Current data generated by Coelho and collaborators in 2018 (4) show a serious public health problem in Maranhão, ranking the state as the location with the highest overall incidence of PC ever recorded in the scientific literature.

Among the risk factors commonly associated with the onset of the neoplasm (lack of hygiene, phimosis, alcoholism, smoking, and human papillomavirus (HPV) infection), the virus' potential to induce genetic instability and deregulate the expression and function of proteins important for maintaining cellular homeostasis stands out (5-7).

The molecular mechanisms involved in the process of HPV-induced tumorigenesis include the oncoproteins E6 and E7 that together act directly in uncontrolling cellular homeostasis, promoting exacerbated proliferation and malignant transformation (8). These oncoproteins can interact, for example, with cellular proteins, miRNAs, mRNAs, transcription factors. The best-

studied pathway describes the regulatory role of E6 under p53, an important tumor suppressor protein, which in this complex is induced to degradation (9).

Alterations in the *TP53* gene have been associated with increased risk and aggressiveness of several types of neoplasms, including PC (10). Despite being a highly conserved gene, polymorphisms (SNPs) are documented in coding and intronic regions of this gene (11, 12). The best studied polymorphism of *TP53* is located at codon 72, exon 4 and is a genetic variation that results in the substitution of a proline base (wild-type, Pro/Pro), by one or two arginine (Arg) residues, at position 72 in a proline-rich domain, essential for efficient suppression of cell growth and p53-mediated apoptosis, resulting in structural change (13-15)..

This polymorphism in homozygosity was associated with a 7x higher risk of developing HPV-associated tumors when compared to the Arg/Pro and Pro/Pro polymorphisms (16). In a study aiming to determine the variant of p53 in colon of uterus tumors from Brazilian women, it was observed that about 67% of them had homozygosity for this polymorphism and 33% were heterozygous (Arg/Pro) (17). Furthermore, tumors infected with different variants of viral subtype 16 have variable clinical behavior (18).

Thus, the present study proposes a compilation of data that incorporate cross-sectional, sociodemographic, and genetic and molecular aspects in men from Maranhão affected by PC and the impacts of importance in the diagnosis and prognosis of these patients.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### Research characterization

This is a prospective research with non-probability sampling. The study involved patients diagnosed with malignant neoplasm of the penis seen at three reference hospitals in oncologic treatment in the state of Maranhão, namely: Hospital do Câncer Aldenora Bello (HCAB), Hospital Geral Tarquínio Lopes Filho (HGTLF) and Hospital Universitário Presidente Dutra (HUUFMA). The study included men over 18 years of age, with clinical and pathological diagnosis of penile cancer, who had indication for amputation as the first therapeutic option and who agreed to participate in the study by signing the Informed Consent Form (ICF), approved by the Research Ethics Committee (REC) of the University Hospital of UFMA, opinion number 4.020.264 and CAAE number 30760420.3.0000.5086. Patients who did not answer the questionnaire or whose collection of biological material was not feasible were excluded from the study.

In all, 73 cases were identified, but only 53 met the inclusion criteria.

### Patient profiles and sample collection

The patients were characterized according to demographic variables, socioeconomic conditions, and clinical and histopathological parameters of the tumors. This characterization was performed through the application of questionnaires.

The demographic variables for the evaluation of this study were the patient's race and age. By reviewing the patients' questionnaires, we collected information such as: personal and family history of cancer, smoking, alcohol consumption, hygiene habits, presence or absence of phimosis, family income, education, region and city of origin, number of sexual partners, chief complaint, and associated symptoms.

The collection of biological samples occurred at three moments: before, during and after the surgical procedure to remove the tumor. During the first moment (before surgery), peripheral blood was collected in tubes containing anticoagulant (EDTA) that was later centrifuged to separate the buffy coat used during DNA extraction from normal cells (leukocytes) for allelic determination in the subsequent steps.

During collection during surgery, small fragments of penile tumor tissue were removed and immersed in RNAlater solution (Thermo Fisher) and later used for tumor DNA extraction. After the surgical procedure and histopathological processing, the paraffin blocks were used for hematoxylin-eosin slides and p53 protein expression analysis.

Histological diagnosis and classification of the tumors was performed according to criteria of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) classification of malignant tumors (TNM), 8th edition, and was independently evaluated by three pathologists (SPCM, LOB, and GEBS).

### **Extraction of DNA**

To obtain genetic material (DNA) from healthy cells of the patients, the buffy coat samples were thawed and 200  $\mu$ L of the cell suspension was removed for extraction, the remaining volume was frozen again at  $-80^{\circ}\text{C}$  (reserve). DNA extraction from buffy coat was performed using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Cat. No. 51104), following protocol provided by the manufacturer. Samples were eluted in 70  $\mu$ L of elution buffer from the kit.

To obtain tumor DNA, the AllPrep<sup>®</sup> DNA/RNA/miRNA Universal kit (Qiagen, Cat. No. 80224), which simultaneously extracts DNA and RNA, was used. Initially, tissue samples collected in RNAlater were thawed and weighed to separate 10-15mg of tumor. After weighing, tumor tissue from each patient was transferred to a 2.0 mL microtube (individually) containing 600  $\mu$ L of lysis buffer (RLT plus) and 6.0  $\mu$ L of  $\beta$ -mercaptoethanol (Millipore, Cat. No. 444203). Subsequently, the samples were macerated using a tissue grinder (POLYTRON<sup>®</sup> Dispersing Aggregates), following the steps described in the manufacturer's protocol. Tumor DNA samples were eluted in 70  $\mu$ L of elution buffer from the kit. Only tumor DNA was used in the analyses of this study, and the extracted RNA was stored at  $-80^{\circ}$  for further work.

After the extractions, both buffy coat and tumor DNA samples were quantified in a NanoDrop<sup>®</sup> (Thermo Fisher) spectrophotometer, with concentrations expressed in ng/ $\mu$ L. The purity was determined by evaluating the ratios between the measurements of 230 nm, 260 nm and 280 nm, being considered pure samples those with 260/280 ratio between 1.8 and 1.9 and 260/230 between 2.0 and 2.2. The integrity of the extracted DNA was evaluated in agarose gel (1.0%).

### **HPV detection and genotyping**

Tumor DNA samples from each patient were submitted to amplification quality control, being initially submitted to qualitative PCR (Polymerase Chain Reaction) for the  $\beta$ -globin gene (268 bp). Samples positive for  $\beta$ -globin were submitted to HPV detection by two-step PCR (PCR-nested). In the first PCR, a set of generic primers named PGMY09/11, described by Gravitt and collaborators in 2000 (19), which produce a 450 bp fragment of the L1 region of the HPV capsid, was used. In the second PCR, the primers GP5+/6+ (20) were used, which generate a 170 bp amplicon also corresponding to the L1 region of the viral capsid, being contained in the 450 bp fragment amplified in the first PCR round. All primer sequences and thermocycling conditions are described in the supplementary material (S1).

The amplicons were separated on a 1.5% agarose gel, submitted to a constant voltage of 230V for 20 min, stained in SYBR™ Safe DNA Gel Stain and visualized in a UV transilluminator. Those with amplification for  $\beta$ -globin and PGMY09/11 and/or GP5+/6+ were considered positive. PCR products positive for PGMY09/11 and/or GP5+/6+ were submitted to direct sequencing reaction by capillary electrophoresis in the ABI3500 equipment from Applied Biosystems. For viral genotyping, the sequences obtained were compared with sequences available in genetic databases through BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

### ***TP53* codon 72 polymorphism analysis**

Similar to what was done with the tumor samples, the buffy coat DNA samples were submitted to qualitative PCR (Polymerase Chain Reaction) for the  $\beta$ -globin gene (268 bp), and only those that presented amplification were considered for analysis. The samples considered for analysis were submitted to *TP53* genotyping in exon 4 and codon 72 by allelic discrimination using the conventional technique PCR (Polymerase Chain Reaction). Separately, the samples were subjected to a specific PCR reaction for the Arginine allele (141 bp) and another for the Proline allele (177 bp) (S1), as proposed by Lima and collaborators in 2006 (11).

Then, 2.0  $\mu$ l of DNA from each tumor sample was used in a 25  $\mu$ l final product reaction using the GoTaq® Colorless Master Mix kit (Promega), with the final mix consisting of: 12.5  $\mu$ l of GoTaq®, 0.6  $\mu$ l of primer F, 0.6  $\mu$ l of primer R, 9.3  $\mu$ l of water and 2  $\mu$ l of DNA, following the thermocycling conditions specified by Lima and collaborators in 2006 (11) as described in supplementary material (S1). Amplicons were separated on a 1.5% agarose gel, subjected to a constant voltage of 90V for 40 min. In the agarose gel analysis, those that had application only for the ArgF/R primer or only for the ProF/R primer were considered homozygous (Arg/Arg or Pro/Pro) and those that had amplification for both ArgF/R and ProF/R were considered heterozygous (Arg/Pro).

### **Immunohistochemistry**

The p53 IHC analysis was performed on 3-5 $\mu$ m thick sections of paraffin-embedded tumor tissue, arranged on silanized slides, from 53 patients using the Dako EnVision™ kit (Dako, Agilent Technologies) and processing in PT Link equipment (Dako, Agilent Technologies). The slides were incubated in an oven at 60°C for 30 minutes to remove excess paraffin (deparaffinization). After this step, the slides were immersed in a recovery solution containing Dako Target Retrieval Solution (50x) diluted in a 1:50 ratio in distilled water. In PT Link, slides were temperature cycled according to standard protocol provided by the manufacturer (preheating to 65°C; antigen retrieval to 97°C for 20 minutes; cooling to 65°C).

Then, the slides were washed in Dako Wash Buffer (20x) for five minutes. Subsequently, the following steps were performed: blockage of endogenous peroxidase (5 min), application of primary anti-p53 monoclonal antibody (clone DO-7) (20 min); application of polymer (20 min); chromogen 3,3' Diaminobenzidine (DAB) development (5 min), counterstaining in Harris hematoxylin (5 min) and mounting of the slides for analysis under a light microscope.

The analysis of p53 protein expression was performed semi-quantitatively by three pathologists, following the methodology proposed by Lopes and collaborators in 2002 (21). Cases with a percentage of immunolabeling <20% were considered negative, positive (+) those with a percentage between 20-50%, and also positive (++) those with a percentage >50%.

## Statistical Analyses

Data were tabulated in excel (Microsoft Office 2019) and statistically analyzed in SPSS v. 26 software (IBM Corp., Armonk, NY, USA). The association analysis between the clinical-histopathological variables, HPV infection, p53 protein expression and *TP53* polymorphism was performed using bivariate tests, such as the Chi-square test and Fisher's exact test. Statistically significant results were considered those with  $p \leq 0.05$ .

## 3 RESULTS

### Clinical and sociodemographic data

Between 2020 and 2022, seventy-three patients with clinical and pathological diagnosis of penile cancer were recruited from three referral hospitals in the state of Maranhão. After applying the exclusion criteria, only 53 cases met the requirements for participation in the present study. The mean age of the patients was  $\pm 60$  years (ranging from 30 to 53 years), with the majority being less than or equal to 60 years (52.8%). These men generally had little or no education, were smokers, and consumed alcohol. Figure 1 shows the main socio-behavioral characteristics of these patients.

Almost 54.7% reported inefficient genital hygiene habits. When the sexual behavior of these patients was analyzed, 54.7% reported having more than 10 sexual partners throughout their lives, 34.0% had a history of sexually transmitted infection, and 35.8% said they had already practiced zoophilia.

### Clinical and histopathological profile

All patients (100%) underwent surgery as the main therapeutic method. The most frequent type of surgery was partial and total penectomy (94.3%). Macroscopically, the lesions affect mainly the glans (75.5%), sometimes with extension to the coronal groove and/or foreskin. A total of 71.7% of patients reported phimosis, with few having performed circumcision in adulthood.

In the microscopic analysis, 96.2% of cases were classified as invasive squamous cell carcinoma (SCC). When classified according to the association with HPV, about 66.7% of cases had HPV-associated histological subtype. Regardless of the histological subtype, about 56.6% of cases had histological changes suggestive of HPV infection (koilocytosis).

As for the tumor differentiation grade, most were poorly differentiated (G3, 69.8%), with absence of angiolymphatic (69.8%) and perineural (54.7%) invasion. Following the TNM system classification (8th edition), most tumors were classified as pT3 (47.2%). As for the level of infiltration, 37.7% of the lesions compromised the corpus cavernosum, 71.1% the corpus spongiosum, 52.8% compromised the urethra, and 47.2% the tunica albuginea. Only 19 patients underwent lymphadenectomy, of which 14 (73.6%) had lymph node metastasis. Of the metastatic cases, 57.9% had extranodal involvement of the tumor.

The complete characterization of histopathological and molecular parameters is described in Table 1.

### Human papillomavirus (HPV) detection and genotyping

The molecular detection (PCR) of HPV was performed in 51 cases, of these, 34 (66.7%) showed positivity for the viral genome. Among the 34 HPV-positive cases, the viral subtype

determination by sequencing was performed in 28 cases. Among the genotyped cases, the high-risk genotypes 16, 18 and 33 were identified, which account for 96.4% of HPV-positive cases. The low-risk oncogenic genotypes were observed in only 3.6% of the positive samples, represented only by HPV-11 detected in a single sample. When evaluated individually, the most prevalent genotype among cases was HPV-16 (67.9%), followed by HPV-18 (24.9%), HPV-33 (3.6%) and HPV-11 (3.6%).

Positivity for HPV was associated with the presence of koilocytosis, with 80% with koilocytosis showing positivity for the virus ( $p=0.016$ ).

Given the high prevalence of positive samples for HPV-16, the characterization of cases was performed according to this viral subtype. Microscopically, these cases were generally poorly differentiated (73.7%), with absence of angiolymphatic invasion (68.4%) and presence of perineural invasion (63.1%), the latter being statistically significant ( $p=0.022$ ). There was also an association between pT3 tumors and HPV-16 positivity ( $p=0.016$ ).

### ***TP53* codon 72 polymorphism analysis**

Allelic discrimination of *TP53* as to the polymorphism at codon 72 was performed in 46 of the 53 cases included in the present study. Of these, 15.2% were heterozygous (Arg/Pro), 84.7% were homozygous Arg/Arg, and no homozygous Pro/Pro cases were identified. Figure 1 demonstrates how the analysis of the PCR result for Arginine and Proline was performed after running the amplified product on agarose gel electrophoresis.

When comparing the polymorphism data with the HPV infection profile, it was observed that 81.1% of homozygous cases (Arg/Arg) were HPV-positive, with a statistically significant difference between the groups ( $p=0.004$ ).

The allele frequencies observed in our population were 0.9239 for the Arg allele and 0.0761 for the Pro allele. Regarding genotype frequencies, for the Arg/Arg genotype, we had 39.3; for the Arg/Pro genotype, 6.5 and for the Pro/Pro genotype, which we had no representation, 0.2. The estimation of allelic and genotypic frequencies calculated by the chi-square test performed in probabilistic terms resulted in a population that is in Hardy-Weinberg equilibrium (chi-square = 0.3120,  $p$ -value = 0.5765), degree of freedom equal to 1.

The genotypic and allelic frequencies of the cases studied are described in table 2.

### **Immunohistochemistry**

Based on the analysis criteria proposed by Lopes et al. (2002), about 40.4% were considered negative and 59.6% were considered positive (+ or ++). When stratifying the positive cases, 30.7% were positive (+) and 28.9% were positive (++) (Figure 2). About 90.5% of the tumors negative for p53 expression had associated carcinoma in situ and 85.7% had no sarcomatoid transformation, in the latter with a statistically significant difference between the groups ( $p=0.043$ ).

Moreover, it was observed in the p53 negative group that 80.9% presented staging II, demonstrating statistical significance ( $p=0.019$ ). When comparing the expression of p53 with the presence of koilocytes, it was observed that tumors without koilocytosis mostly exhibited positivity (++) for p53 ( $p=0.027$ ).



When we compared the protein expression profile of p53 with the data of HPV infection and *TP53* codon 72 polymorphism, we observed no statistically significant difference between the groups.

The full description of the statistical analyses for p53 expression and *TP53* gene polymorphism are described in the supplementary material (S2).

## 4 DISCUSSION

### **Sociodemographic profile of patients**

Penile cancer (PC) is a rare neoplasm in developed countries and more common in developing countries, such as Brazil (22). Work conducted by our study group in Maranhão has recently revealed the highest incidence of the disease worldwide (4).

In this study, 53 cases of PC were evaluated aiming at an integrative profile of patients regarding their clinical-histopathological, molecular and immunohistochemical characteristics. Similar to other studies conducted with this type of cancer (22-24), we also reported a high incidence of the disease starting in the sixth decade of life, with individuals presenting a mean age of 60 years and with a lower representativeness of the age group equal to or below 40 years.

The evaluated patients had a low level of education and poor genital hygiene habits. This profile is in line with other studies in the area, such as Pow-Sang and collaborators in 2010 (2), which show a higher prevalence of PC in men in a situation of socioeconomic vulnerability. It is known that genital hygiene is characterized as the main prophylactic measure in PC and its inadequate performance is responsible for favoring the proliferation of microorganisms, including HPV (25). These factors contribute to the delay in seeking medical help (26), especially in poorer regions such as in the state of Maranhão.

Regarding the delay in seeking medical care for these men, in the study reported here, most patients take about 12 months until the first contact for diagnosis, which is already established in the literature as a critical factor for its management and being responsible for making the disease a major public health problem (27,28).

Despite the little robustness of studies that directly link smoking and drinking practices with the development of PC, they are factors that seem to play independent roles in the outcome of the neoplasm (23,29). In this research, more than half of the patients made or had made continuous use of tobacco and continuous alcoholic beverage use. Approximating our results with works that report frequencies close to those found (26,30) DALING et al., 2005; GAO et al., 2016). Our data contrasts with works such as that of Vieira and collaborators in 2020 (3), which report a minority of smoking patients in Maranhão. The use of substances such as tobacco is already established as a risk factor for some neoplasms, including PC (31,32).

### **Clinical Features**

Although it is considered a social factor related to the disease, and well described in the literature, the presence of phimosis is a clinical condition that prevents the total retraction of the foreskin, prevents the proper hygiene of the glans and can cause complications that contribute effectively to the etiology of the disease (33). In our study, the frequency of patients who reported this condition (71.7%) approximates data from the literature which, overall, in PC, is about 25% to 75% (34). Circumcision in the neonatal period seems to be a good

preventive measure for PC, since in countries that practice it, such as the United States and Israel, PC accounts for less than 1% of neoplasms that affect men (35).

The most commonly adopted surgical treatment among patients in the present study was partial penectomy (81.1%), a type of amputation often chosen for patients with PC (36). In part, the high rate of amputations is a reflection of advanced lesions at diagnosis, where in the present study 47.2% of cases were pT3-pT4 and 66% were stage II. Moreover, there was a high prevalence of poorly differentiated tumors (69.8%), histological grade associated with greater aggressiveness and worse prognosis. These aspects, whether clinical or histopathological, are the main predictive parameters for management and prognosis of PC (37).

In patients with PC, the presence and extent of metastasis involving the inguinal lymph nodes are the most important predictors of survival, since they are generally associated with an unfavorable prognosis. Of the patients who underwent prophylactic or therapeutic inguinal lymphadenectomy (35.8%), a high percentage presented lymph node metastasis in the histological analysis (73.7%), with extranodal involvement in 71.4% of the metastatic cases. Lymph node involvement and extranodal extension are parameters well described in the literature associated with a worse prognosis and reduced survival of patients (38,39).

The vast majority of patients with lymph node involvement have in common the fact that they present late diagnosis (40). Corroborating data from Hospital A.C Camargo (2015), in Brazil, about 90% of patients only seek medical care when they present more advanced stages of the disease (41).

### **The role of human papillomavirus in the development of neoplasia**

In this study, the molecular detection of HPV revealed a high prevalence of tumors infected by the virus (66.7%). The same had been previously observed in the region by De-Sousa and collaborators in 2015 (42), who reported a prevalence of HPV in 63.1% of cases of PC evaluated. In a recent study conducted by Macedo and collaborators in 2020 (43) in Maranhão, the presence of HPV infection in PC was 96.4%, considered the highest ever described for the region and among studies in the area, placing the region in a status above the highest global averages that range between 46-51% (44).

When the clinical and histopathological data were related to HPV detection, a statistically significant association was observed between virus detection by PCR and the presence of koilocytosis ( $p=0.001$ ). The presence of koilocytes in layers of squamous epithelium is a feature commonly found in tumors with HPV-related etiology, having been observed in 56.6% of cases in this study (45). In work with PC, koilocytosis (cytoarchitectural change suggestive of HPV infection) has often been found in tumors of low/moderate staging and better disease-free survival (46).

In contrast, studies such as those by Gregoire and collaborators in 1995 (47) and Bezerra and collaborators in 2001 (48) propose the presence of koilocytosis as a worse prognostic factor for PC, although there is not enough evidence to support this hypothesis.

According to Flaherty and collaborators in 2014 (49), a greater contribution of high-risk viral subtypes (16 and 18) was observed in global prevalence data of HPV infection in PC. In studies conducted in Rio de Janeiro, the positivity for HPV in these tumors ranged from 60.7% to 75%, with the subtype 16 being more frequent (40.5%) (50). In turn, in the state of Maranhão, de De-

Sousa and collaborators in 2015 (42) identified a higher frequency of subtypes 16, 18, 45 and 69 in PC. In the present study, among the HPV subtypes detected, there was a higher prevalence of HPV-16, found in 67.9% of cases. These data are in line with what has been observed in other studies of PC, which also show the greater participation of HPV-16 in the etiology of these tumors.

In the present study, there was a statistically significant association between the absence of HPV-16 infection and tumors located in the glans and coronal sulcus ( $p=0.007$ ). Regarding the parameters of prognostic value in PC, the statistical association between absence of perineural invasion and HPV-16 negative cases ( $p=0.022$ ) was highlighted in this study. In PC, papers such as Zhou and collaborators in 2018 (51) describe perineural invasion as an important predictive factor of lymph node metastasis. The presence of perineural invasion is commonly associated with malignancy in tumors (52). Papers such as that of Zareba and collaborators in 2017 (53) with prostate cancer present evidence that this histopathological feature is a strong predictor of lethal prostate cancer and describes an association between perineural invasion and greater tumor aggressiveness. Given this, the relationship found in this study between the absence of the high-risk subtype (HPV-16) and the absence of perineural invasion seems to play a good parameter of better patient prognosis, since both features are associated with worse prognosis.

In this study, the presence of HPV-16 infection was associated with tumors staged pT3 ( $p=0.016$ ). Lesions with this classification showed a high level of tissue infiltration in the corpus cavernosum and/or tunica albuginea, which gives the tumor greater access to blood vessels and consequently a greater chance of metastasizing (37,54). Data from Figliuolo and collaborators in 2015 (55) reported the association of this tumor staging with locally advanced disease in a range of 60-75% of cases of PC.

### **The presence of the Arg/Arg allele associated with HPV infection**

We report here a high frequency of the Arg/Arg genotype in the evaluated patients (84.7%). When comparing polymorphism data with the HPV infection profile, an association was observed between the presence of the Arg/Arg allele and positivity for the virus ( $p=0.004$ ). Homozygosity of p53 Arg/Arg was first reported in association with increased risk of developing HPV-associated infections in cervical cancer by Storey and collaborators in 1998 (56), and after this pioneering work, successive studies were conducted in an attempt to associate the codon 72 polymorphism with risk and predictive factors in various malignancies. Examples are the work of Chuery and collaborators in 2016 (57) with cervical cancer, Stoehr and colleagues in 2018 (10) with penile cancer, and Hebert-Magee and colleagues in 2019 (58) with breast cancer, where both found high frequencies of the Arg/Arg genotype.

In contrast to the results of this research, Humbey and collaborators in 2003 (59) found no correlation between the Arg/Arg genotype and the presence of HPV in penile tumors, as did Tornesello and collaborators in 2008 (60). In a systematic study aiming to clarify the influence of this polymorphism on the risk of PC and its associations with HPV, Stoehr and collaborators in 2018 (10) demonstrate that this SNP does not seem to play an influence nor to be considered a risk factor for the disease, as previously described in 66 other HPV-related papers. It is worth noting that the frequencies of homozygous arginine genotypes demonstrated in the present study (88.6%) are higher than the previously cited works (61% and 52%, respectively), and obeying the principles of the Hardy-Weinberg Law, the allele frequencies remain constant, with

the population studied here showing equilibrium (Chi-square = 0.3120, with p-value = 0.5765), meaning that allele frequencies do not change over generations.

Work such as that of Beckman and collaborators in 1994 (61) has proposed that geographic location and ethnicity play an important role in p53 allele frequencies. Populations around the world exhibit significant differences in the frequency of the codon 72 polymorphism, most likely due to adaptive issues and natural selection as well as distinct biological and biochemical characteristics (56, 62, 63).

### **p53 expression**

When the p53 expression profile was evaluated, it was observed that 33.3% of the tumors negative for the protein were HPV-related. The absence of p53 expression was associated with factors such as: absence of sarcomatoid transformation (p=0.012), stage II (p=0.019) and absence of koilocytosis (p=0.027). Analysis of p53 protein expression by immunohistochemistry provides useful information in the diagnostic investigation of PC, especially in the early stages (64). Moreover, abnormal p53 expression has been described as an independent factor for lymph node metastasis and this expression associated with HPV positivity appears to be associated with worse prognosis (21).

Initially, studies such as Oda, Nakatsuru, and Ishikawa in 1995 (65) have already reported that mutations in *TP53*, for example, can cause overexpression of the protein, and this overexpression is associated with sarcomatoid transformation in renal SCC, an important predictive factor of lymph node metastasis. More recent work such as those by Pamela and collaborators in 2014 (66) and Yu and collaborators in 2017 (67) point to the association that patients with tumors containing sarcomatoid components have more aggressive prognoses and decreased disease-free survival. When compared with the data presented in this study, we observe conformity with results of studies such as those of Lopes and collaborators in 2002 (21) and studies performed in other types of carcinoma, such as those of Hashimoto and collaborators in 1999 (68), Maeda and collaborators in 2008 (69) and Inada and collaborators in 1999 (70), whose negativity for p53 was related to the histopathological characteristics pointed out, is associated with better prognostic factors.

The positivity rates for p53 (summing the frequencies of the two expression patterns used in the analyses of this study) were higher than those detected in other studies, such as those of Gunia and collaborators in 2012 (71). No statistically significant associations were observed between clinical-histopathological data, HPV infection, frequency of *TP53* polymorphisms, and p53 protein expression data.

PC is a heterogeneous, aggressive, neglected disease with high incidence in the state of Maranhão, where patients are in a situation of socioeconomic vulnerability. The reduced number of reference centers for the treatment of the disease in the state hinders the access of patients from the countryside, since the largest treatment centers are in the capital, delaying the early diagnosis and monitoring of the neoplasm. Moreover, the prognostic evaluation for the management of patients is hampered by the absence of clinical protocols directed to these patients.

The genetic and molecular basis of PC is still poorly understood, and these aspects are important for improving diagnosis, prognosis, and therapy. In Maranhão, the cases of PC seem to present characteristics distinct from those observed in other locations, which reinforces initiatives like

this one for understanding the biology of these tumors, especially from the genomic point of view.

## 5 CONCLUSION

The data obtained in this study support the role of HPV in the high rates of PC found in Maranhão. Moreover, this work is one of the few initiatives that evaluated the role of polymorphism in codon 72 of the *TP53* gene and its relationship with HPV infection in PC. The high frequency of the allelic variant of risk for HPV infections (Arg/Arg homozygotes) in men from Maranhão with PC was evidenced, suggesting that the genetic background of the local population may be contributing to the high rate of HPV observed in the region. It is hoped that this research will serve as a basis for further studies aimed at better understanding the genetic/molecular aspects of PC and its impacts on the disease, and attention is drawn to the importance of conducting population-based studies to elucidate the role of this polymorphism in the development of PC.

## 6 CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## 7 AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors participated in data interpretation, read and agreed to the published version of the manuscript.

## 8 FUNDING

The study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPEMA) and Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares (EBSERH).

## 9 ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the collaboration of Hospital do Câncer Aldenora Bello (HCAB), Hospital Geral Tarquínio Lopes Filho (HGTLF), Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (HUUFMA), and the Rede Brasileira de Serviços Hospitalares (EBSERH) for the authorization to carry out this research. We also thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) and the Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) for the support to the training and funding of the research.

## REFERÊNCIAS

1. OLESEN, T. B. et al. Human papillomavirus prevalence among men in sub-Saharan Africa: a systematic review and meta-analysis. *Sexually transmitted infections* (2014) v. 90, n. 6, p. 455-462.
2. POW-SANG, M. R. et al. Epidemiology and natural history of penile cancer. *Urology* (2010) v. 76, n. 2, p. S2-S6. doi: 10.1016/j.urology.2010.03.003
3. VIEIRA CB, Feitoza L, Pinho J, Teixeira-Júnior A, Lages J, Calixto J, Coelho R, Nogueira L, Cunha I, Soares F, Silva GEB. Perfil de pacientes com câncer peniano na região com maior incidência mundial. *Sci Rep.* (2020) Feb 19;10(1):2965. doi: 10.1038/s41598-020-59831-5.

4. COELHO, R. W. P. et al. Penile cancer in Maranhão, Northeast Brazil: the highest incidence globally? *BMC Urology* (2018) v. 18, n. 1, p. 50.
5. COSTA, S. et al. Câncer de pênis: epidemiologia e estratégias de prevenção. *Caderno de Graduação – Ciências Biológicas e da Saúde Facipe* (2013) v. 1, n. 2, p.23-33.
6. RODNEY, S. HPV and penile cancer: perspectives on the future management of HPV-Positive disease. *Cancer network – home of the journal oncology* (2016) v. 30, n. 3, p. 250-252.
7. MOCH, H. et al. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol* (2016) 70(1):93–105. Doi: 10.1016/j.eururo.2016.02.029
8. ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in human cancers. *Proceedings of the Association of American Physicians* (2000) v. 111, n. 6, p. 581-587. doi: 10.1046/j.1525-1381.1999.99723.x.
9. GILL S. S. et al. The carcinogenic potential of E6 & E7 genes of high-risk hpv compared with E6, E7 genes of low-risk hpv in human cervical cancer: a review. *IJPSR* (2014) 5:703. doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.5(3).703-12
10. STOEHR R, WEISSER R, WENDLER O et al. P53 Codon 72 Polymorphism and Risk for Squamous Cell Carcinoma of the Penis: A Caucasian Case-Control Study. *J Cancer* (2018); 9(22):4234-4241. doi:10.7150/jca.26050. <https://www.jcancer.org/v09p4234.htm>
11. LIMA, J.M. et al. Estudo do polimorfismo genético no gene p53 (códon 72) em câncer colorretal. *Arquivos de Gastroenterologia* (2006) v. 43, p. 8-13. Doi:10.1590/S0004-28032006000100005
12. HAMÚ C. S. et al. Polimorfismo do gene TP53 no códon 72 em pacientes com suspeita de LMC. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter* (2007) 29(4): 346-350. doi 10.1590/S1516-84842007000400006
13. FURUWATARI, C. et al. A comprehensive system to explore p53 mutations. *American journal of clinical pathology* (1998) v. 110, n. 3, p. 368-373. doi: 10.1093/ajcp/110.3.368.
14. GALLO, C.V.M. et al. TP53 mutations as biomarkers for cancer epidemiology in Latin América: Current knowledge and perspectives. *Mutat Res* (2005) 589(3): 192-207. doi: 10.1016/j.mrrev.2005.01.002.
15. KASTENHUBER E.R, Lowe, S.W. Putting p53 in Context. *Cell* (2017) Sep 7;170(6):1062-1078. doi: 10.1016/j.cell.2017.08.028
16. LIN HY, HUANG CH, WU WJ et al. TP53 codon 72 Gene Polymorphism Paradox in Associated with Various Carcinoma Incidences, Invasiveness and Chemotherapy Responses. *Int J Biomed Sci.* (2008) Dec;4(4):248-54. PMID: 23675098; PMCID: PMC3614723.
17. BAKHOUM S. F, CANTLEY L. C. The Multifaceted Role of Chromosomal Instability in Cancer and Its Microenvironment. *Cell.* (2018) Sep 6;174(6):1347-1360. doi: 10.1016/j.cell.2018.08.027.
18. CHEN, A. A. et al. Human Papillomavirus 18 Genetic Variation and Cervical Cancer Risk Worldwide. *Journal of Virology* (2015) v. 89, n. 20, p. 10680–10687. doi: 10.1128/JVI.01747-15.

19. GRAVITT PE, PEYTON CL, ALESSI TQ et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol.* (2000) Jan;38(1):357-61. doi: 10.1128/JCM.38.1.357-361.2000. PMID: 10618116.
20. JACOBS, M. V. et al. A general primer GP5+/GP6(+)-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *J Clin Microbiol* (1997) n. 35, v. 3, p. 791-5. doi: 10.1128/jcm.35.3.791-795.1997
21. LOPES A, et al. p53 as a new prognostic factor for lymph node metastasis in penile carcinoma: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy. *J Urol* (2002) 168:81-6. PMID: 12050497
22. FAVORITO, L.A.; NARDI, A.C. et al. Epidemiologic Study on Penile Cancer in Brazil. *Brazilian Society of Urology* (2008) v. 34, n. 5, p. 587-593. doi: 10.1590/s1677-55382008000500007
23. COUTO, T. C. et al. Epidemiological study of penile cancer in Pernambuco: experience of two reference centers. *International braz j urol* (2014) v. 40, n. 6, p. 738-744.
24. TORBRAND, C. et al. Socioeconomic factors and penile cancer risk and mortality: a population-based study. *BJUI Internatinal* (2016) p. 2-7. doi: 10.1111/bju.13534.
25. NASCA MR, INNOCENZI D, MICALI G. Penile cancer among patients with genital lichen sclerosus. *J Am Acad Dermatol.* (1999);41:911-4. Doi:10.1016/S0190-9622(99)70245-8.
26. GAO, W., et al. Risk factors and negative consequences of patient's delay for penile carcinoma. *World J Surg Onc* (2016) 14, 124. doi.org/10.1186/s12957-016-0863-z
27. REIS, A. A. S. et al. Aspectos clínico-epidemiológicos associados ao câncer de pênis. *Ciência & Saúde Coletiva* (2010) v.15, p. 1105-1111. Doi:10.1590/S1413-81232010000700018
28. CALMON, M. F. et al. Penile carcinoma: Risk factors and molecular alterations. *The Scientific World Journal*, 2011. doi: 10.1100/tsw.2011.24
29. SANTOS, K. M. dos. et al. Penile cancer and factors associated with metastases in inguinal lymph nodes. *Research, Society and Development* (2021) [S. l.], v. 10, n. 2, p. e55810212854. DOI: 10.33448/rsd-v10i2.12854
30. DALING, JR, MADELEINE, MM, JOHNSON, LG et al. Penile cancer: importance of circumcision, human papillomavirus and smoking in in situ and invasive disease. *Int J Cancer* (2005) 116:606-16. <https://doi.org/10.1002/ijc.21009>.
31. SOLSONA, E; ALGABA, F; HORENBLAS, S et al. European Association of Urology. EUA guidelines on penile cancer. *Eur. Urol* (2004) v. 46, n.1, jul, p. 46: 1-8. doi: 10.1016/j.eururo.2004.03.007
32. BARROS, E. N.; MELO, M. C. B. Câncer de pênis: perfil sócio-demográfico e respostas emocionais à penectomia em pacientes atendidos no Serviço de psicologia do Hospital de Câncer de Pernambuco. *Rev. SBPH* (2009) v. 12, n. 1. Rio de Janeiro.
33. CHRISTOULIDOU, M. et al. Epidemiology of penile cancer. *Current Problem Cancer* (2015) v.39, n. 3, p.129-136.
34. HELLER DS. Lesions and Neoplasms of the Penis: A Review. *J Low Genit Tract Dis.* (2016) ;20:107-11. Doi: 10.1097/LGT.0000000000000159.

35. BUSSO-LOPES A.F. et al. Genomic profiling of human penile carcinoma predicts worse prognosis and survival. *Cancer Prev Res (Phila)* (2015) Feb;8(2):149-56. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-14-0284
36. ESCANDE A, HAIE-MEDER C, MAZERON R et al. Brachytherapy for Conservative Treatment of Invasive Penile Carcinoma: Prognostic Factors and Long-Term Analysis of Outcome. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* (2017) Nov 1;99(3):563-570. doi: 10.1016/j.ijrobp.2017.02.090. PMID: 28501419.
37. AITA, G. A. et al. Tumor histologic grade is the most important prognostic factor in patients with penile cancer and clinically negative lymph nodes not submitted to regional lymphadenectomy. *International braz j urol* (2016) v. 42, n. 6, p. 1136-1143. Doi: 10.1590/S1677-5538.
38. CHIPOLLINI, J. et al. Patterns of Regional Lymphadenectomy for Clinically Nodenegative Patients With Penile Carcinoma: Analysis From the National Cancer Database From 1998 to 2012. *Clinical Genitourinary Cancer* (2017) p. 1. <https://doi.org/10.1016/j.clgc.2017.04.019>.
39. LEONE A, DIORIO GJ, PETTAWAY C et al. Contemporary management of patients with penile cancer and lymph node metastasis. *Nat Rev Urol.* (2017) Jun;14(6):335-347. doi: 10.1038/nrurol.2017.47. PMID: 28401957.
40. SOUSA, J. E. R. B, et al. Man's knowledge about prevention of penile cancer. *Rev de Enfermagem da UFPI* (2014) 3(1):79-84.
41. WANICK, Fabiana Braga França et al. Carcinoma epidermoide do pênis: estudo clínico-patológico de 34 casos. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 86, p. 1082-1091, 2011. Doi: 10.1590/S0365-05962011000600004
42. DE SOUSA, I. D. B. et al. Prevalence of human papillomavirus in penile malignant tumors: viral genotyping and clinical aspects. *BMC urology* (2015) v. 15, n. 1, p. 13. doi: 10.1186/s12894-015-0007-8
43. MACEDO J, SILVA E, NOGUEIRA L et al. Genomic profiling reveals the pivotal role of hrHPV driving copy number and gene expression alterations, including mRNA downregulation of *TP53* and *RB1* in penile cancer. *Mol Carcinog.* (2020) ;59:604–17. Doi: 10.1002/mc.23185.
44. BACKES DM, KURMAN RJ, PIMENTA JM et al. Systematic review of human papillomavirus prevalence in invasive penile cancer. *Cancer Causes Control.* (2009);20:449–57. Doi:10.1007/s10552-008-9276-9.
45. KRAWCZYK E, SUPRYNOWICZ FA, LIU X et al. Koilocytosis: a cooperative interaction between the human papillomavirus E5 and E6 oncoproteins. *Am J Pathol.* (2008) Sep;173(3):682-8. doi: 10.2353/ajpath.2008.080280. PMID: 18688031.
46. DE PAULA, S. H. B. et al. Penile cancer, epidemiologic aspects and risk factors: making considerations about the promotion and prevention in the Primary Attention. *BIS. Boletim do Instituto de Saúde* (2012) v. 14, n. 1, p. 111-118. doi.org/10.52753/bis.2012.v14.33726
47. GREGOIRE L, CUBILLA AL, REUTER VE et al. Preferential association of human papillomavirus with high-grade histologic variants of penile-invasive squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* (1995); 87:1705-9. doi: 10.1093/jnci/87.22.1705.



48. BEZERRA, Artur LR et al. Human papillomavirus as a prognostic factor in carcinoma of the penis: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy. *Cancer* (2001) v. 91, n. 12, p. 2315-2321. PMID: 11413520
49. FLAHERTY, A, et al. Implications for human papillomavirus in penile cancer. In: *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations. Elsevier*, (2014) v.32(1), p. 53-58. doi: 10.1016/j.urolonc.2013.08.010
50. AFONSO, L. A. et al. Human papillomavirus, Epstein-Barr virus, and methylation status of p16ink4a in penile cancer. *Journal of Medical Virology* (2017). v. 9999, p. 1-7. Doi: 10.1002/jmv.24833 PMID: 28403538.
51. ZHOU X, QI F, ZHOU R et al. The role of perineural invasion in penile cancer: a meta-analysis and systematic review. *Biosci Rep* (2018); 38:BSR20180333. doi: 10.1042/BSR20180333.
52. DUNN M, et al. Perineural invasion: identification, significance, and a standardized definition. *Dermatol Surg* (2009) Feb;35(2):214-21. doi: 10.1111/j.1524-4725.2008.34412.x
53. ZAREBA P, et al. Perineural Invasion and Risk of Lethal Prostate Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers* (2017) Prev. May;26(5):719-726. doi: 10.1158/1055-9965.
54. HAKENBERG, O. W. et al. The diagnosis and treatment of penile cancer. *Deutsches Ärzteblatt International* (2018) v. 115, n. 39, p. 646. doi: 10.3238/arztebl.2018.0646
55. FIGLIUOLO G, Lima S. et al. Perfil clínico-epidemiológico associado a fatores de risco de pacientes com câncer de pênis atendidos em um Hospital de Referência Oncológica em Manaus. Vol. *Revista brasileira de oncologia clínica* (2015) v. 11, n. 40.
56. STOREY, A. T. M, et al. Role of p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature*, (1998) v. 393, p. 229-34. doi: 10.1038/30400.
57. CHUERY, Ana Carolina Silva et al. Association between the p53 arginine/arginine homozygous genotype at codon 72 and human papillomavirus E6/E7 mRNA expression. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* (2017) v. 21, p. 248-254. DOI:10.1016/j.bjid.2017.03.002
58. HEBERT-MAGEE S, YU H, BEHRING M et al. The combined survival effect of codon 72 polymorphisms and p53 somatic mutations in breast cancer depends on race and molecular subtype. *PLoS One*. (2019) Feb 7;14(2):e0211734. doi: 10.1371/journal.pone.0211734. PMID: 30730944; PMCID: PMC6366783.
59. HUMBEY O, et al. Detection of the human papillomavirus and analysis of the TP53 polymorphism of exon 4 at codon 72 in penile squamous cell carcinomas. *Eur J Cancer* (2003) 39:684–690. doi: 10.1016/s0959-8049(02)00835-3.
60. TORNESELLO M. L, et al. Human papillomavirus genotypes and HPV16 variants in penile carcinoma. *Int J Cancer* (2008) Jan 1;122(1):132-7. doi: 10.1002/ijc.23062.
61. BECKMAN G, BIRGANDER R, SJALANDER A et al. Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Hum Hered* (1994);44:266– 70. doi: 10.1159/000154228.
62. THOMAS M, KALITA A, LABRECQUE S et al. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cell Biol*. (1999);19:1092–100. doi: 10.1128/MCB.19.2.1092.

63. MAKNI H, et al. p53 polymorphism in codon 72 and risk of human papillomavirus-induced cervical cancer: effect of inter-laboratory variation. *Int J Cancer* (2000) 87(4):528-33. PMID: 10918193
64. CHAUX, A. et al. Epidemiologic profile, sexual history, pathologic features, and human papillomavirus status of 103 patients with penile carcinoma. *World Journal of Urology*, 2013. doi: 10.1007/s00345-011-0802-0
65. ODA, H; NAKATSURU, Y; ISHIKAWA, T. Mutations of the p53 gene and p53 protein overexpression are associated with sarcomatoid transformation in renal cell carcinomas. *Cancer research* (1995) v. 55, n. 3, p. 658-662. PMID: 7834636
66. PAMELA, A. et al. Carcinome rénal à contingent sarcomatoïde: suivi d'une série de 23 patients [Sarcomatoid renal cell carcinoma: follow-up of a series of 23 patients]. *Prog Urol* (2014) Apr;24(5):301-6. Doi: 10.1016/j.purol.2013.09.026
67. YU, M. J. Rethinking Human Papillomavirus Vaccine for Oral and Oropharyngeal Cancer Prevention and Global Implementation. *JEMI-PEARLS* (2017) 2: 1-8.
68. HASHIMOTO, N., TACHIBANA, M., DHAR, D.K. *et al.* Expression of p53 and RB Proteins in Squamous Cell Carcinoma of the Esophagus: Their Relationship With Clinicopathologic Characteristics. *Ann Surg Oncol* (1999) 489–49. Doi: 10.1007/s10434-999-0489-2
69. MAEDA K, et al. Expression of p53 and vascular endothelial growth factor associated with tumor angiogenesis and prognosis in gastric cancer. *Oncology* (2008) 55:594. doi: 10.1159/000011918
70. INADA, S et al. Evaluation of malignancy and the prognosis of esophageal cancer based on an immunohistochemical study (p53, E-cadherin, epidermal growth factor receptor). *Surgery today* (1999) v. 29, n. 6, p. 493-503. doi: 10.1007/BF02482343.
71. GUNIA S, KAKIES C, ERBERSDOBLER A et al. Expression of p53, p21 and cyclin D1 in penile cancer: p53 predicts poor prognosis. *J Clin Pathol* (2012) Mar;65(3):232-6. doi: 10.1136/jclinpath-2011-200429. PMID: 22135025.

## TABLES

**Table 1.** Histopathological and molecular parameters according to HPV detection

Variables	CASOS (N=53) N (%)	HPV (N=51)		HPV 16 (N=51) N (%)
		Positivo N (%)	Negativo N (%)	
Prepuce and glans penis	16 (30,2)	13 (40,6)	2 (12,5)	9 (50,1)
Glans, foreskin and body	9 (17)	7 (21,9)	2 (12,5)	5 (27,8)
Penile Body	1 (1,9)	1 (3,1)	0 (0)	1 (5,6)
Glans and coronal groove	24 (45,3)	11 (34,4)	12 (75)	3 (16,7)
Others	3 (5,7)	–	–	–

<b>Surgery Type</b>				
Postectomy	3 (5,7)	3 (8,8)	0 (0)	2 (10,5)
Partial Penectomy	43 (81,1)	26 (76,5)	15 (88,2)	14 (73,7)
Total penectomy	7 (13,2)	5 (14,7)	2 (11,8)	3 (15,8)
<b>Histological Type</b>				
CEC	52 (98,1)	36	16	13
CEC in situ	1 (1,9)	0	1	0
<b>Histological subtype</b>				
Usual	27 (52,9)	17 (50)	9 (52,9)	8 (42,1)
Condylomatous	5 (9,8)	3 (8,8)	2 (11,8)	1 (5,3)
Warty-basalóide	3 (5,9)	3 (8,8)	0 (0)	3 (15,8)
Mixed	6 (11,7)	5 (14,7)	1 (5,9)	3 (15,8)
Sarcomatoid	2 (3,9)	1 (3,0)	1 (5,9)	0 (0)
Others *	8 (15,6)	5 (14,7)	4 (23,5)	4 (21)
<b>Grade (G)</b>				
G1	3 (5,7)	1 (2,9)	0 (0)	1 (5,3)
G2	13 (24,5)	7 (20,6)	6 (35,3)	4 (21)
G3	37 (69,8)	26 (76,5)	11 (64,7)	14 (73,7)
<b>Lesion size</b>				
0,5 – 2,1	5 (9,4)	5 (14,7)	0 (0)	4 (21)
2,1 – 5,0	35 (66)	22 (64,7)	11 (64,7)	11 (57,9)
5,1 – 10	9 (17)	5 (14,7)	4 (23,5)	3 (15,8)
> 10	4 (7,5)	2 (5,9)	2 (11,8)	1 (5,3)
<b>Angiolymphatic invasion</b>				
Absent	37 (69,8)	9 (26,5)	6 (35,3)	13 (68,4)
Present	15 (28,3)	25 (73,5)	11 (64,7)	6 (31,6)
NA	1 (1,9)	--	--	
<b>Perineural invasion</b>				
Absent	29 (54,7)	16 (48,5)	5 (31,2)	7 (36,8)
Present	21 (39,6)	17 (51,5)	11 (68,7)	12 (63,1)
NA	3 (5,7)	--	--	--
<b>Primary tumor</b>				
pT1	13 (24,5)	9 (26,5)	2 (11,8)	7 (41,2)
pT2	13 (24,5)	8 (23,5)	5 (29,4)	1 (5,9)
pT3 – pT4	25 (47,2)	15 (44,1)	10 (58,9)	9 (52,9)
Outro	2 (3,8)	2 (5,9)	0 (0)	0 (0)
<b>Staging</b>				
I	9 (17)	5 (14,7)	2 (11,8)	3 (17,6)
II	35 (66)	22 (64,7)	13 (76,5)	10 (58,8)
III – IV	7 (13,2)	5 (14,7)	2 (11,8)	4 (23,5)
CECis	2 (3,8)	--	--	
<b>Koylocytosis</b>				
Absent	23 (43,4)	10 (47,6)	11 (52,4)	5 (9,8)
Present	30 (56,6)	24 (80)	6 (20)	14 (27,4)
<b>Lymph node metastasis*</b>				
No metastasis	5 (9,4)	5 (38,5)	0 (0)	3 (37,5)

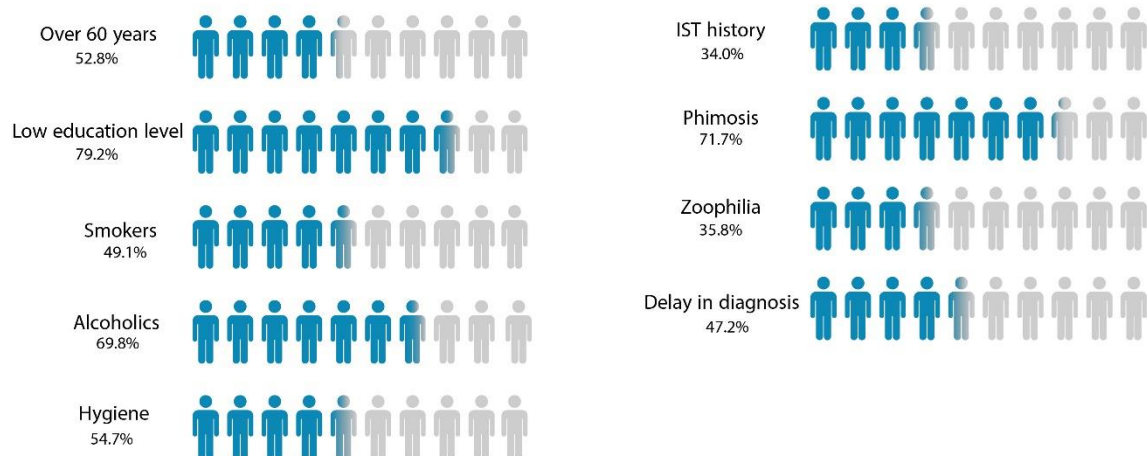
With metastasis	14 (26,4)	8 (61,5)	6 (100)	5 (62,5)
No lymphadenectomy	34 (64,2)	--	--	--

(NA): not available; (\*): verrucous (n=2), pseudohyperplastic (n=3), basaloid (n=2), lymphoepithelioma-like (n=1).  
 \*Statistical analysis was performed on 19/51 of cases, only those who had lymphadenectomy. (Lymph node metastasis: HPV positive = N=13; HPV negative = N= 6 / HPV16 positive = N=8; HPV16 negative = N= 11.

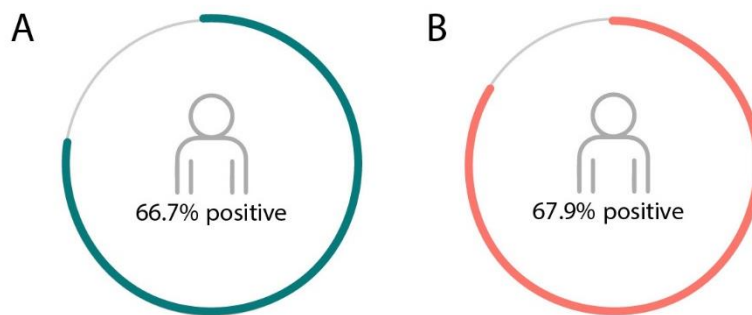
**Table 2.** Genotypic and allelic frequencies of the cases studied

	Cases	Frequency
Genotypes	N (%)	OR (95% CI)
Arg/Arg	39 (84,7)	39,2663
Arg/Pro	7 (15,1%)	6,4674
Pro/Pro	0 (0)	0,2663
Alleles		
Arg	46 (100)	0,9239
Pro	7 (15,2)	0,0761

## FIGURES LEGENDS



**Figure 1.** Clinical and sociobehavioral characteristics of 56 patients with penile cancer in Maranhão, Brazil.



**Figure 2.** Human papillomavirus (HPV) detection and genotyping data. A= Frequency of HPV infection in the cases studied; B= Frequency of infection by HPV-16 subtype in the positive cases

## 5. CONCLUSÃO

Os dados obtidos no presente estudo sustentam o papel do HPV nos altos índices de CaPe encontrados no Maranhão. Ademais, este trabalho é uma das poucas iniciativas que avaliaram o papel do polimorfismo no códon 72 do gene *TP53* e sua relação com a infecção pelo HPV em CaPe. Foi evidenciada a alta frequência da variante alélica de risco para infecções por HPV (homozigotos Arg/Arg) em homens maranhenses com CaPe, sugerindo que o *background* genético da população local pode estar contribuindo para a alta taxa de HPV observada na região. Espera-se que esta pesquisa sirva de base para outros estudos que visem compreender melhor os aspectos genéticos/moleculares do CaPe e seus impactos na doença.

## 8. REFERÊNCIAS

AFONSO, L. A. et al. Prevalence of human papillomavirus and Epstein-Barr virus DNA in penile cancer cases from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 1, p. 18-23, 2012.

ALEMANY, L. et al. Role of Human Papillomavirus in Penile Carcinomas Worldwide. **European Urology**, 2016.

BACKES DM, KURMAN RJ, PIMENTA JM et al. Systematic review of human papillomavirus prevalence in invasive penile cancer. *Cancer Causes Control*. (2009);20:449-57. Doi:10.1007/s10552-008-9276-9.

BAKHOUM S. F, CANTLEY L. C. The Multifaceted Role of Chromosomal Instability in Cancer and Its Microenvironment. **Cell**. Sep 6;174(6):1347-1360, 2018.

BARROS, E. N.; MELO, M. C. B. Câncer de pênis: perfil sócio-demográfico e respostas emocionais à penectomia em pacientes atendidos no Serviço de psicologia do Hospital de Câncer de Pernambuco. **Rev. SBPH**, v. 12, n. 1. rio de janeiro. Jun. 2009.

BATISTA, L. L. et al. Estudo das linfadenectomias inguinais realizadas em pacientes portadores de câncer de pênis em hospital de referência na Amazônia. **Rev. para. med**, 2014.

BENEVOLO M. et al. Anal human papillomavirus infection: prevalence, diagnosis and treatment of related lesions. **Expert Rev Anti Infect Ther**. 14(5):465-77, 2016.

BERNARD H. U. et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology** 25;401(1):70-9, 2010.

BERTINATO, G. P. et al. Linfoma primário do pênis: relato de caso. **Rev. méd. Paraná**, p. 55-58, 2021.

BONFIM, S. B. A situação da mortalidade por câncer de pênis no estado do Maranhão. Monografia (**Graduação**) – Universidade Federal do Maranhão, 2017.

BORDEN E. C. et al. Soft tissue sarcomas of adults: state of the translational science. **Clin**

**Cancer Res.** Jun;9(6):1941-56, 2003.

BOSCH, F. X. et al. Comprehensive Control of Human Papillomavirus Infections and Related Diseases **Vaccine**, 2013.

BROOKES A. J. The essence of SNPs. **Gene**. 234: 177–186, 1999.

CALMON, M. F. et al. Penile carcinoma: Risk factors and molecular alterations. **The Scientific World Journal**, 2011.

CANETE-PORTILLO, S. et al. Report from the International Society of Urological Pathology (ISUP) Consultation Conference on Molecular Pathology of Urogenital Cancers V: Recommendations on the use of immunohistochemical and molecular biomarkers in penile cancer. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 44, n. 7, p. e80-e86, 2020.

CHAUX, A. et al. Epidemiologic profile, sexual history, pathologic features, and human papillomavirus status of 103 patients with penile carcinoma. **World Journal of Urology**, 2013.

CHEN, A. A. et al. Human Papillomavirus 18 Genetic Variation and Cervical Cancer Risk Worldwide. **Journal of Virology**, v. 89, n. 20, p. 10680–10687, 2015.

CHRISTOULIDOU, M. et al. Epidemiology of penile cancer. **Current Problem Cancer**, v.39, n. 3, p.129-136, 2015.

COELHO, R. W. P. et al. Penile cancer in Maranhão, Northeast Brazil: the highest incidence globally? **BMC Urology**, v. 18, n. 1, p. 50, 2018.

COOPER G. M. HAUSMAN, R. E. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): **Sinauer Associates**. 2000.

COSTA, S. et al. Câncer de pênis: epidemiologia e estratégias de prevenção. **Caderno de Graduação – Ciências Biológicas e da Saúde Facipe**, v. 1, n. 2, p.23-33, 2013.

COUTO, T. C. et al. Epidemiological study of penile cancer in Pernambuco: experience of two reference centers. **International braz j urol**, v. 40, n. 6, p. 738-744, 2014.

CUBILLA, A. L. The role of pathologic prognostic factors in squamous cell carcinoma of the penis. **World J Urol** 27, 169, 2009.



- DE SANJOSÉ, S.; BROTONS, M.; PAVÓN, M. A. The natural history of human papillomavirus infection Best Practice and Research. **Clinical Obstetrics and Gynaecology**, 2018.
- DE SOUSA, I. D. B. et al. Prevalence of human papillomavirus in penile malignant tumors: viral genotyping and clinical aspects. **BMC urology**, v. 15, n. 1, p. 13, 2015.
- DI LORENZO, G. et al. Cisplatin and 5-fluorouracil in inoperable, stage IV squamous cell carcinoma of the pênis. **BJU International**, v. 110, n. 11b, p. E661-E666, 2012.
- DE PAULA, S. H. B. et al. Penile cancer, epidemiologic aspects and risk factors: making considerations about the promotion and prevention in the Primary Attention. **BIS. Boletim do Instituto de Saúde** (2012) v. 14, n. 1, p. 111-118. doi.org/10.52753/bis.2012.v14.33726
- DJAJADININGRAT, R. S. et al. Neoadjuvant taxane-based combination chemotherapy in patients with advanced penile cancer. **Clinical Genitourinary Cancer**, v. 13, n. 1, p. 44-49, 2015.
- DOK R, N. S. HPV Positive Head and Neck cancers: Molecular Pathogenesis and Evolving Treatment Strategies. **Cancers** 29;8(4), 2016.
- DOORBAR, J. et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. **Vaccine**, 2012.
- FAVORITO, L.A.; NARDI, A.C. et al. Epidemiologic Study on Penile Cancer in Brazil. **Brazilian Society of Urology**, v. 34, n. 5, p. 587-593, 2008.
- FLAHERTY, A, et al. Implications for human papillomavirus in penile cancer. In: *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. **Elsevier**, v.32(1), p. 53-58, 2014.
- FURUWATARI, C. et al. A comprehensive system to explore p53 mutations. **American journal of clinical pathology**, v. 110, n. 3, p. 368-373, 1998.
- GALIOTTO, D. et al. Frequência de mutações no gene TP53 em tumores de mama em pacientes de Santa Catarina. **Dissertação (mestrado)** - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2011
- GALLO, C.V.M. et al. TP53 mutations as biomarkers for cancer epidemiology in Latin

América: Current knowledge and perspectives. **Mutat Res.** 589(3): 192-207, 2005.

GAO, W., et al. Risk factors and negative consequences of patient's delay for penile carcinoma. **World J Surg Onc** 14, 124, 2016.

GHITTONI, R. et al. Role of human papillomaviruses in carcinogenesis. *E Canc Medic Scienc* 9: 526, 2015.

GIACOMELLI A. O. et al. Mutational processes shape the landscape of TP53 mutations in human cancer. **Nat Genet.** Oct;50(10):1381-1387, 2018.

GILL S. S. et al. The carcinogenic potential of E6 & E7 genes of high-risk hpv compared with E6, E7 genes of low-risk hpv in human cervical cancer: a review. **IJPSR**; 5:703, 2014.

GUIMARÃES, G. C, et al. Penile squamous cell carcinoma clinicopathological features, nodal metastasis and outcome in 333 cases. **J Urol** 182(2):528–34; discussion 534, 2009.

HAKENBERG, O. W. et al. The diagnosis and treatment of penile cancer. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 115, n. 39, p. 646, 2018.

HAMÚ C. S. et al. Polimorfismo do gene TP53 no códon 72 em pacientes com suspeita de LMC. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter** 29(4): 346-350, 2007.

HOLLSTEIN M, R. K. et al. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. **Nucleic Acids Res.** Sep;22(17):3551-5, 1994.

HUSZNO J, G. E. TP53 mutations and SNPs as prognostic and predictive factors in patients with breast cancer. **Oncol Lett.** Jul;16(1):34-40, 2018.

KASTENHUBER E.R, Lowe, S.W. Putting p53 in Context. **Cell.** Sep 7;170(6):1062-1078, 2017.

KAYES, O. et al. Molecular and genetic pathways in penile cancer. **The Lancet. Oncology**, v. 8, n. 5, 2007.

KOIFMAN, L. et al. Epidemiological aspects of penile cancer in Rio de Janeiro: evaluation of 230 cases. **Int braz j urol**, v.37, n.2, p.231-243, 2011.

KORKES, F. et al. Tendências e carga econômica do câncer de pênis no sistema público de

saúde brasileiro. **Einstein** (São Paulo), v. 18, 2020.

KOTLER E, et al. A Systematic p53 Mutation Library Links Differential Functional Impact to Cancer Mutation Pattern and Evolutionary Conservation. *Mol Cell*. Jul 5;71(1):178-190.e8, 2018.

LATTUADA D. et al. ANALYSIS OF THE CODON 72 POLYMORPHISM of the TP53 gene in patients with endometriosis. **Mol Hum Reprod.**;10(9):651-4, 2004.

LEVINE A.J, HU W, FENG Z. The P53 pathway: what questions remain to be explored? **Cell Death Differ**; 13: 1027-1036, 2006.

LIMA, J.M. et al. Estudo do polimorfismo genético no gene p53 (códon 72) em câncer colorretal. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 43, p. 8-13, 2006.

LISBÔA, L. L. C. Mortalidade por câncer de pênis: análise de tendência nos estados brasileiros. Dissertação (**Mestrado**) – Universidade Federal do Maranhão, 2019.

MARTINS, V.A. et al., P16INK4a expression in patients with penile cancer. **Plos One**, v. 13, n. 10, p. 1-13, 2018.

MCMURRAY H. R. et al. Biology of human papillomaviruses. *Int J Exp Pathol*. Feb;82(1):15-33, 2001.

MOCH, H. et al. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. **Eur Urol** 70(1):93–105, 2016.

MORRIS, B.J.; KRIEGER, J.N. Penile Inflammatory skin disorders and the preventive role of circumcision. **International Journal of Preventive Medicine**, v 4(8):32, 2017.

MORRISON, B. F. Risk factors and prevalence of penile câncer. **West Indian Medical Journal**, 2014.

NAM, J. K. et al. Clinicopathologic characteristics and treatment outcomes of penile cancer. **The world journal of men's health**, v. 35, n. 1, p. 28-33, 2017.

OLESEN, T. B. et al. Human papillomavirus prevalence among men in sub-Saharan Africa: a systematic review and meta-analysis. **Sexually transmitted infections**, v. 90, n. 6, p. 455-

462, 2014.

OLIVEIRA M. V. P. Implicações do Polimorfismo do Códon 72 do gene p53 no Carcinoma Laríngeo. [**Dissertação de mestrado**] Universidade Federal de Goiás; 2005.

PAGLIARO, L. C. et al. Neoadjuvant paclitaxel, ifosfamida, and cisplatin chemotherapy for metastatic penile cancer: a phase II study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 24, p. 3851, 2010.

PAIVA, G. R. Carcinoma de pênis: panorama da doença no estado da Bahia: considerações epidemiológicas e histopatológicas. Dissertação (**Mestrado**) – Universidade Federal da Bahia, 2010.

PILLAI, M. R. et al. Polymorphism at codon 72 of p53, human papillomavirus, and cervical cancer in South India. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 128, n. 11, p. 627–631, 2002.

PIZZOCARO, G. et al. EAU penile cancer guidelines 2009. **European urology**, v. 57, n. 6, p. 1002-1012, 2010.

POMPEO, A. C. L. et al. Projeto Diretrizes Carcinoma de Pênis II. **Soc. Brasileira de Urologia**, São Paulo, p. 1-9, 2006.

POW-SANG, M. R. et al. Epidemiology and natural history of penile cancer. **Urology**, v. 76, n. 2, p. S2-S6, 2010.

RAPOSO, M. C. L. et al. A educação em saúde e a prevenção do câncer de pênis. **Ciências Biológicas e Saúde**, n. 3, v. 3, p. 177-188, 2016.

REIS, A. A. S. et al. Aspectos clínico-epidemiológicos associados ao câncer de pênis. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.15, p. 1105-1111, 2010.

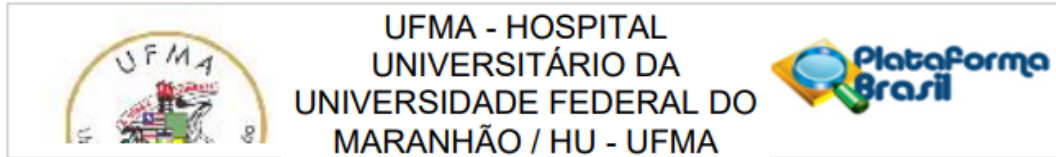
RODNEY, S. HPV and penile cancer: perspectives on the future management of HPV-Positive disease. **Cancer network – home of the journal oncology**, v. 30, n. 3, p. 250-252, 2016. 2016.

SHAVIT O. R. E. et al. Carga da infecção pelo papilomavírus humano e doenças relacionadas em Israel. **Vacina**; 31 Supl 8 :I32-41, 2013.

- SIDDIQUE, M. M. et al. Evidence for selective expression of the p53 codon 72 polymorphs: implications in cancer development. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 14, n. 9, p. 2245-2252, 2005.
- SOARES, G. R. Efeito das oncoproteínas virais E6 e E7 do HPV-16 na resposta de células T de pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. 71 f. **Dissertação (mestrado)** - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, 2014.
- SOUSA, J. E. R. B, et al. Man's knowledge about prevention of penile cancer. **Rev de Enfermagem da UFPI**. Teresina.PI 3(1):79-84, jan-mar, 2014.
- STANKIEWICZ, E. et al. The prognostic value of Ki-67 expression in penile squamous cell carcinoma. **J Clin Pathol**, n. 6, v. 65, p. 534-37, 2012.
- TOYAMA, T; ZHANG, Z; NISHIO, M. HAMAGUCHI, M. Association of TP53 codon 72 polymorphism and the outcome of adjuvant therapy in breast cancer patientes. **Breast Cancer Res**. 2007.
- VIEIRA CB, Feitoza L, Pinho J, Teixeira-Júnior A, Lages J, Calixto J, Coelho R, Nogueira L, Cunha I, Soares F, Silva GEB. Perfil de pacientes com câncer peniano na região com maior incidência mundial. *Sci Rep*. (2020) Feb 19;10(1):2965. doi: 10.1038/s41598-020-59831-5.
- VOGELSTEIN, B; SUR, S; PRIVES, C. p53: the most frequently altered gene in human cancers. **Nature Education**, v. 3, n. 9, p. 6, 2010.
- WHIBLEY C, PHAROAH P.D, HOLLSTEIN M. p53 polymorphisms: cancer implications. **Nat Rev Cancer**. Feb;9(2):95-107, 2009.
- ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in human cancers. **Proceedings of the Association of American Physicians**, v. 111, n. 6, p. 581-587, 2000.

## 9. ANEXOS

### Anexo A – Parecer de aprovação em Comitê de Ética - CEP



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** PERFIL FISIOPATOLÓGICO E MOLECULAR DE TUMORES DE PÊNIS ASSOCIADOS À INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

**Pesquisador:** Gyl Eanes Barros Silva

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 30760420.3.0000.5086

**Instituição Proponente:** Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão/HU/UFMA

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO MARANHÃO - FAPEMA

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.020.264

##### Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1536283.. Datado de 27/04/2020.

##### Introdução

1.1 Aspectos epidemiológicos O câncer de pênis (CaPe) é uma neoplasia rara em países desenvolvidos, principalmente da América do Norte e Europa Ocidental, sendo mais incidente em países em desenvolvimento, principalmente na Ásia, África e América do Sul [14]. Na América do Sul, o Brasil representa a localidade com maior incidência da doença, com índices oscilando entre 2,9 e 6,8 afetados a cada 100.000 homens [21]. Esse tumor representa cerca de 2,1% de todos os cânceres que afetam os homens no país, sendo mais comumente relatado em estados da região Norte e Nordeste (53,2%), regiões com menores índices socioeconômicos [32]. Em um estudo realizado pela Sociedade Brasileira de Urologia (SBU) em 2007, o estado do Maranhão concentrou 10,66% dos casos reportados. Um ano após este levantamento, Favorito e colaboradores (2008) reafirmaram a alta incidência principalmente no estado de São Paulo e Maranhão. No entanto, a posição de São Paulo nesses estudos pode ser justificada pelo grande número de pacientes que se deslocam para o estado em busca de melhores opções terapêuticas, além de ser a região mais

**Endereço:** Rua Barão de Itapary nº 227

**Bairro:** CENTRO

**UF:** MA

**Telefone:** (98)2109-1250

**Município:** SAO LUIS

**CEP:** 65.020-070

**E-mail:** cep@huufma.br



Continuação do Parecer: 3.122.045

Cronograma	_cronograma_.docx	28/12/2018 16:55:18	Gyl Eanes Barros Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	_projeto_.docx	28/12/2018 16:53:44	Gyl Eanes Barros Silva	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO LUIS, 25 de Janeiro de 2019

Assinado por:

Rita da Graça Carvalho Frazão Corrêa  
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

CEP: 65.020-070

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

E-mail: cep@huufma.br

## ANEXO B: COMPROVANTE DE SUBMISSÃO

### Your manuscript submission - 1099615

Frontiers in Oncology Editorial Office <oncolology.editorial.office@frontiersin.org>  
 Responder a: Frontiers in Oncology Editorial Office <oncolology.editorial.office@frontiersin.org>  
 Para: Thalita Rocha <thalita.moura@discente.ufma.br>

15 de novembro de 2022 22:39

Dear Dr Rocha

We are pleased to inform you that we have received the manuscript "TP53 codon 72 Arg/Arg polymorphism reveals association with human papillomavirus in penile cancer" to be considered for publication in Frontiers in Oncology, section Genitourinary Oncology.

You can access the review forum and track the progress of your manuscript using the following link:  
<https://www.frontiersin.org/Journal/MySubmission.aspx?stage=100>

Your manuscript is now in the initial validation stage to determine its suitability for peer review. Should your manuscript be sent out for peer review, you will receive a notification once we receive the reports from reviewers and the interactive review forum is activated. You will then be able to read the review reports and exchange directly with the reviewers in the interactive review forum as well as submit a revised manuscript, if appropriate. If the required number of reviewers endorse your manuscript in the Independent Review stage, their tabs will be closed and the manuscript will be forwarded to the Review Finalized stage, where you will be able to interact with the handling editor via the Editor tab.

With best regards,

Your Frontiers in Oncology team

Frontiers | Editorial Office - Collaborative Peer Review Team  
[www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)  
 12 Moorgate,  
 EC2R 6DA, London, UK  
 Office T 41 215 101 796

REVIEW FORUM Corresponding Author ? Need Help? Contact us

**1. Initial Validation**
2. Editorial Assignment
3. Independent Review
4. Interactive Review
5. Review Finalized
6. Final Validation
7. Final Decision

---

TP53 codon 72 Arg/Arg polymorphism reveals association with human papillomavirus in penile cancer

Thalita Moura Silva Rocha\* , Antonio Augusto Lima Teixeira-Júnior, Thaís Bastos Moraes Sobrinho, Denner Duarte, Juliana Martins da Guia Ribeiro do Carmo, Syomara Melo, Rita da Graça Carvalho Frazão Corrêa, Liseana de Oliveira Barbosa, José de Ribamar Rodrigues Calisto, Marta Regina de Castro Belfort and Gyl Eanes Barros Silva  
**Original Research, Front. Oncol. - Genitourinary Oncology**  
 Received on: 16 Nov 2022, Edited by: No Associate Editor assigned.  
 Manuscript ID: 1099615  
 Keywords: Penile Cancer, HPV, Polymorphism TP53, P53 Protein, Cancer

- Download latest manuscript
- Supplementary materials
- View submitted files history
- View invoice

NO ACTION IS REQUIRED FROM YOU

Your manuscript has been submitted successfully and is being verified by the editorial office as part of the initial manuscript validation.