**ANÁLISE DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA P53 EM PACIENTES COM CÂNCER DE PÊNIS**

Thalita Moura Silva Rocha 1

Antonio Augusto Lima Teixeira Júnior  1

Antonio Lima da Silva Neto 1

Denner Rodrigo Diniz Duarte  1

Juliana Martins da Guia Ribeiro do Carmo  1

Thais Bastos Moraes Sobrinho 1

Gyl Eanes Barros Silva  1

1 Grupo de Estudos em Patologia Molecular, Laboratório de Imunofluorescência e Microscopia Eletrônica, Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (GEPAM/LIME/HUUFMA), São Luís, Brasil.

**Eixo temático:** Oncogenética

**RESUMO**

O estado do Maranhão possui a maior incidência de câncer de pênis no Brasil e no mundo. Estudos prévios descrevem alta prevalência de tumores infectados pelo papilomavírus humano (HPV) na região, um importante fator de risco para a doença. O potencial oncogênico do HPV é atribuído principalmente à ação das oncoproteínas E7 e E6, esta última atuando na desregulação da proteína supressora tumoral p53. Diante disso, o objetivo deste estudo foi caracterizar o perfil de expressão proteica de p53 em tumores de pênis. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUUFMA, parecer nº 3.122.045. Foi realizado levantamento de casos diagnosticados com câncer de pênis em dois hospitais no Maranhão (HUUFMA e HCAB). Foi realizada a extração de DNA tumoral por meio do kit QIAmp DNA FFPE Tissue (Qiagen) a partir de tecido parafinado. Em seguida, o DNA extraído foi utilizado para detecção molecular do HPV por PCR qualitativa tipo nested, utilizando os primers PGMY09/11 e GP5+/GP6+ e β-globina como controle de viabilidade. Os amplicons foram avaliados em gel de agarose a 1,5% e considerados positivos aqueles que apresentaram positividade para β-globina, PGMY e/ou GP. A expressão de p53 foi realizada por imuno-histoquímica, utilizando anticorpo anti-p53 (clone DO-7) e kit específico EnVision™ (Dako). A maioria dos pacientes tinham idade >60 anos, baixa escolaridade (37%), tabagistas (38,5%), etilistas (24%) e com fimose (39,5%). Todos os casos realizaram procedimento cirúrgico, sendo a penectomia parcial a mais adotada (75,5%). A presença de DNA de HPV foi observada em 80,5% dos casos avaliados. Houve ausência de expressão de p53 em 47,5% de acordo com os critérios de Lopes e colaboradores (2002). Os resultados desta pesquisa ratificam um perfil sociodemográfico desfavorável observado em câncer de pênis, especialmente no Maranhão, com a alta prevalência de infecção por HPV e descreve o perfil de expressão de p53 na casuística local, revelando potencial uso no diagnóstico e prognóstico da doença.

**Palavras-chaves**: câncer de pênis; HPV; p53.

**1 INTRODUÇÃO**

Dentro da categoria de neoplasias que atingem os homens, o câncer de pênis (CaPe) é responsável por cerca de 10% das neoplasias que afetam homens em países em desenvolvimento, como os da África, Ásia e América do Sul. Essa neoplasia se apresenta como de alta morbimortalidade e está enquadrada como responsável por até 17% de todas as neoplasias malignas masculinas em algumas regiões (KOIFMAN, 2011), especialmente em regiões de maior vulnerabilidade social e econômica (HERNANDEZ, et al. 2008).

Na América do Sul, o Brasil apresenta um dos maiores índices registrados de CaPe, com índices oscilando entre 2,9 e 6,8 afetados por 100.000, ranqueando a doença na quarta posição de tumores mais recorrentes em homens (FAVORITO, et al. 2008; POW-SANG et al., 2010). Os dados epidemiológicos apontam estados da região Norte e Nordeste, regiões com menores índices socioeconômicos, somando cerca de 53,2% dos casos registrados no país e segundo dados da Sociedade Brasileira de Urologia (SBU), 10,6% dos casos registrados do país se concentram no Maranhão (FAVORITO et al., 2008). Essa incidência de CaPe no maranhão foi reafirmada em trabalhos de Coelho e colaboradores (2018), e considerada a maior incidência da doença a nível mundial.

O CaPe é descrito como doença heterogênea e de etiologia multifatorial. Os fatores socioeconômicos estão intrinsecamente ligados ao aumento do risco de câncer e esse efeito é ampliado com pouca conscientização da população e retardo na procura por auxílio médico (SKEPPNER, et al. 2012). Aliados a esses fatores socioeconômicos, a falta de higiene, fimose, histórico de ist’s, tabagismo, etilismo e infecção pelo papilomavírus humano (HPV) (DOUGLAWI, et al. 2019).

Dentre estes fatores, a infecção por HPV vem sendo bastante evidenciada na literatura em função dos altos índices de positividade para o vírus em CaPe, observado em cerca de 48% dos casos (BACKES, et al. 2009). De acordo com o método de detecção, alguns estudos descrevem até 90% CaPe positivos, especialmente para os tipos 16, 18, 31 e 33, de alto risco oncogênico (LEBELO et al., 2014; ALEMANY et al, 2016).

Dos mecanismos utilizados pelo papilomavírus humano (HPV), uma das propriedades mais conhecida é da oncoproteína E6, expressa durante a infecção viral e que tem a capacidade de se ligar ao E6-AP (E6 – associated protein) um componente da família E3 ubiquitina ligase. 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).

Em cerca de 50% de cânceres humanos, o p53 é inativado 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). 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 resumo, a degradação de p53 acaba por privar a célula de sua estabilidade e segurança. 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 notar que a indução da degradação de p53 parece ser uma propriedade exclusiva da E6 de genótipos de alto risco (GHITTONI et al., 2015)

**2 OBJETIVO**

O presente estudo visa caracterizar o perfil de expressão da proteína p53 em tumores de pênis

**3 MÉTODOS**

**3.1 Caracterização do estudo**

Esta pesquisa foi conduzida seguindo as regulamentações previstas na Resolução CNS/MS n.º 466/2012 para pesquisa com seres humanos, e possui aprovação pela Comissão Científica do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (COMIC-HUUFMA), parecer nº 127/2018, e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário da UFMA, parecer nº 3.122.045 e CAAE nº 05918918.9.0000.5086.Os pacientes incluídos nesta pesquisa foram diagnosticados no Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (HU-UFMA) e no Hospital do Câncer Aldenora Bello (HCAB). As amostras tumorais utilizadas nas etapas experimentais deste trabalho foram provenientes do arquivo de peças cirúrgicas incluídas em parafina (FFPE) do setor de Patologia do HU-UFMA e HCAB. Foram selecionados 200 casos para análise com base na disponibilidade de material biológico para detecção de HPV e expressão proteica por imuno-histoquímica.

**3.2 Detecção do papilomavírus humano (HPV)**

Para obtenção de material genético tumoral (DNA) de tecido FFPE, foram realizados três cortes de 10 μm de cada material parafinado e transferidos para um microtubo de 2,0 mL. O material foi então submetido a desparafinização através de banhos de xilol e alcool etílico. Em seguida foram submetidas às etapas de isolamento de DNA por meio do kit QIAamp DNA FFPE Tissue (Qiagen Cat No/ ID 56404), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. As amostras foram avaliadas quanto à qualidade de extração através de quantificação em espectrofotômetro NanoDrop®, com concentrações expressas em ng/μL, e avaliação de pureza com medidas 260/280 (entre 1,8 e 2,0) e 260/230 (acima de um).

As amostras de DNA tumorais de cada paciente foram submetidas a um controle de qualidade de amplificação, sendo inicialmente submetidas à PCR (Polymerase Chain Reaction) qualitativa para o gene da β-globina (fragmento de 268 pb). As amostras positivas para β-globina foram submetidas à detecção do HPV por PCR em duas etapas (PCR nested). Na primeira PCR foi utilizado um conjunto de primers genéricos denominados PGMY09/11, descrito por GRAVITT et al. (2002), que produzem um fragmento de 450 pb da região L1 do capsídeo do HPV. Na segunda PCR foram utilizados os primers GP5+/6+ (JACOBS et al., 1997), que geram um amplicon de 170 pb, também correspondente a região L1 do capsídeo viral, estando contido no fragmento de 450 pb amplificado na primeira rodada de PCR. Os amplicons foram separados em gel de agarose a 1,5%, submetidos a uma tensão constante de 90V por 40 min, corados em SYBR™ Safe DNA Gel Stain e visualizados em transluminador UV. Foram considerados positivos aqueles que possuíam amplificação para β-globina e PGMY09/11 e/ou GP5+/6+.

**3.3 Expressão proteica de p53 por imuno-histoquímica**

Para análise de expressão proteica por imuno-histoquímica foi utilizado o kit Dako EnVision™ e processamento em equipamento PT Link (DAKO) seguindo protocolo de recuperação do fabricante. A análise de expressão proteica foi realizada de forma semiquantitativa por dois patologistas, seguindo as metodologias propostas por Lopes e colaboradores (2002), para análise de p53. As especificações do anticorpo monoclonal utilizado estão dispostas na tabela 1.

**Tabela 1.** Especificações do anticorpo utilizado no ensaio de imuno-histoquímica.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Anticorpo** | **Clone** | **Espécie** | **Marca** | **Diluição** | **Marcação** |
| Anti-p53 | *DO-7* | Camundongo | *Dako* | Pronto para uso | Nuclear |

**4. RESULTADOS**

**4.1 Perfil clínico e histopatológico**

Foram avaliados 200 pacientes com diagnóstico clínico-histopatológico de câncer de pênis. As frequências absolutas e relativas de cada variável dos casos analisados estão dispostas no quadro 1. A maioria dos pacientes tinham idade média acima de 60 anos, variando de 23 a 95 anos. Quando analisados os fatores de risco, 38,5% dos pacientes eram tabagistas, 24% etilistas e 39,5% possuíam prepúcio não retrátil (fimose). Cerca de 22% dos casos demoraram ≥ 1 ano para buscar atendimento hospitalar desde os primeiros sintomas da doença.

Todos os casos realizaram procedimento cirúrgico como principal método terapêutico. O tipo de cirurgia mais frequente foi a penectomia parcial, adotada em 75,5% dos casos, seguido da penectomia total (21%) e exérese (3,5%). Na análise microscópica, todos os tumores foram classificados como carcinoma de células escamosas (CEC) do pênis (carcinoma epidermóide), os quais se enquadraram nos seguintes subtipos histológicos: usual (39,5%), condilomatoso (29%), basalóide (4%), tumores com padrão histológico misto (16%) e outros (3%). Quanto ao grau de diferenciação tumoral, a maioria dos casos eram tumores pouco diferenciados (G3-49%), seguido de tumores moderadamente diferenciados (G2-38,5%), com ausência de invasão angiolinfática (64,5%) e ausência de comprometimento perineural (63,5%).

Na classificação do tumor primário (T), linfonodos inguinais (N) e metástase à distância pelo sistema TNM (8ª Edição), a maioria dos tumores eram pT3-pT4 (51%). Cerca de 63% dos casos foram pNx, pois não realizaram linfadenectomia no momento da amputação. Na análise histológica, 23,5% apresentaram metástase linfonodal, dos quais em 18,5% havia extensão extranodal do tumor. Durante a avaliação clínica, 30,5% dos casos apresentaram linfonodomegalias inguinais.

**4.2 Infecção por HPV**

Somente 113 amostras de DNA extraídas preencheram os critérios de qualidade (amplificação para o gene da B-globina) e foram submetidas à detecção de HPV. De todos os casos avaliados (n=113), cerca de 91 casos foram positivos para o vírus, representando 80,5% da casuística avaliada.

**4.3 Expressão proteica de p53**

A análise de expressão proteica de p53 por imuno-histoquímica foi conduzida de acordo com os critérios propostos por Lopes et al. (2002), onde foram considerados negativos os casos com < 20% de imuno-marcação, os casos com > 20% foram classificados em: positivo (+), com positividade entre 20-50%, e positivo (++), com positividade >50% (Figura 1). De acordo com esses critérios, 95 casos (47,5%) foram considerados negativos e 78 (39%) foram positivos. Dentre os casos positivos, 44 (22%) foram positivos (+) e 34 (17%) foram positivos (++) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Distribuição de expressão proteica de p53 nos tumores avaliados (n=200).

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Marcador** | **Padrão de expressão** | **N** | **%** |
| P53 | Negativo (<20%) | 95 | 47,5 |
| Positivo + (20-50%) | 44 | 22 |
| Positivo ++ (>50%) | 34 | 17 |

(N) Frequência absoluta; (%) Frequência relativa

****

**Figura 1.** Expressão da proteína supressora tumoral p53 por imuno-histoquímica em cortes histológicos. (A) Carcinoma epidermóide peniano negativo para p53 (< 20%); (B) Carcinoma epidermóide peniano exibindo positividade (+) para p53 (20-50%); (C) Carcinoma epidermóide peniano exibindo marcação positiva (++) para p53 (>50%).

**5 DISCUSSÃO**

Foram avaliados 200 casos de tumores de pênis quanto às suas características clínico-histopatológicas, perfil de infecção pelo papilomavírus humano (HPV), expressão proteica de p53. Em relação a presença de infecção pelo papilomavírus humano (HPV), neste trabalho a detecção molecular do vírus por PCR revelou que 80,5% dos tumores possuíam a infecção. No estado do Maranhão, a maior prevalência de HPV em tumores penianos já descrita foi de 89,1% de positividade em trabalho realizado Martins et al., (2018). Essa diferença na prevalência encontrada, apesar se sútil, pode estar associada ao viés amostral dos estudos, onde no trabalho de Martins et al. (2018) foram utilizadas amostras de tecido fresco, enquanto no presente estudo, foram utilizadas amostras obtidas a partir de tecido fixado em parafina, sabidamente de menor qualidade para ensaios moleculares (WATANABE et al., 2017; MCDONOUGH et al., 2019).

Quando avaliamos o perfil de expressão de p53, observamos que 95 casos foram negativos e 78 positivos (44 + / 34 ++). A presença de coilocitose esteve associada a negatividade para p53 no presente estudo (p=0,001), estes dados corroboram com a principal via descrita para ação do HPV sob a proteína p53 (AKAGI et al., 2017). O câncer de pênis é uma doença negligenciada, multifatorial, agressiva e mortal quando diagnosticada tardiamente. Há alta incidência desse tipo de câncer no estado do Maranhão e pouco se conhece sobre o perfil etiológico local desses tumores. Os poucos trabalhos já realizados apresentam certa discordância no que se observa em pacientes de outras localidades, com alta prevalência de tumores infectados pelo HPV e de padrões histológicos que sustentam os achados de detecção viral.

A maioria dos pacientes atendidos no Maranhão encontram-se em situação de vulnerabilidade socioeconômica, e grande parte são oriundos do interior do estado. Há somente dois centros de referência no tratamento da doença, ambos localizados na capital São Luís, o que dificulta o diagnóstico precoce e o monitoramento desses pacientes. Além disso, a ausência de protocolos clínicos específicos e efetivos para manejo desses pacientes torna o diagnóstico precoce decisivo na avaliação prognóstica, o que geralmente não ocorre. Frente a estes fatores, pesquisas que visem compreender os aspectos etiológicos, evolução e progressão desses tumores são de suma importância para o estado.

**6 CONCLUSÃO**

O presente estudo revela dados importantes para caracterização do perfil de pacientes diagnosticados com câncer de pênis no Maranhão. A alta prevalência da infecção pelo Papilomavírus humano (HPV) foi reafirmada em tumores de pênis e foi descrito o perfil imuno-histoquímico de p53 dessas lesões, o qual demonstrou potencial para avaliação diagnóstica e prognóstica da doença.

**7 REFERÊNCIAS**

[1] ALEMANY, L. et al. Role of human papillomavirus in penile carcinomas worldwide. **European urology**, v. 69, n. 5, p. 953-961, 2016.

[2] BACKES, D. M. et al. Systematic review of human papillomavirus prevalence in invasive penile cancer. **Cancer Causes and Control**, v. 20, n. 4, p. 449–457, 2009.

[3] BARBOSA, R.N.F. Análise molecular dos éxons 8 a 11 do gene da p53 em amostra de câncer de colo do útero no Rio Grande do Norte [dissertação]. Natal – RN: Departamento de Biologia Celular e Genética. Centro de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2007.

[4] CHANG, F.; SYRJANE, S.; KELLOKOSKI, J.; SYRJANE, K. Human papillomavirus (HPV) infections and their associations with oral disease. J**. Oral Pathol. Med**., v. 20, n. 7, p. 305-17, Aug. 1991.

[5] COELHO, Ronald Wagner Pereira et al. Penile cancer in Maranhão, Northeast Brazil: the highest incidence globally? **BMC urology**, v. 18, n. 1, p. 1-7, 2018.

[6] DOUGLAWI, Antoin; MASTERSON, Timothy A. Penile cancer epidemiology and risk factors: a contemporary review. **Current opinion in urology**, v. 29, n. 2, p. 145-149, 2019.

[7] DUESING, S.; MUNGER, K. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. **Int. J. Cancer**, n. 109, n. 2, p. 157-62, Mar. 2004.

[8] FAVORITO, Luciano A. et al. Epidemiologic study on penile cancer in Brazil. **International braz j urol**, v. 34, p. 587-593, 2008.

[9] GHITTONI, R.; ACCARDI, R.; HASAN, U.; GHEIT, T.; SYLLA, B.;TOMMASINO, M. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human Papillomaviruses. **Virus Genes**. 2010; 40(1):1-13, 2009.

[10] HERNANDEZ, B. Y. et al. Burden of invasive squamous cell carcinoma of the penis in the United States, 1998-2003. **Cancer**, v. 113, n. 10 SUPPL., p. 2883–2891, 2008.

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

[12] LEBELO, R. L. et al. Diversity of HPV types in cancerous and pre‐cancerous penile lesions of South African men: Implications for future HPV vaccination strategies. **Journal of medical virology**, v. 86, n. 2, p. 257-25, 2014.

[13] LIMA, M.A.P.; SILVA, C.G.L.; RABENHORST, S.H.B. Papel das Proteínas Precoces do Papilomavírus Humano na Carcinogênese. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 59(4), p. 565-573, 2013.

[14] MARTINS, V. A. et al. P16INK4a expression in patients with penile cancer. **PlosOne**, v. 13, n. 10, p. 1-13, 2018.

[15] MCDONOUGH, S.L. et al. Use of FFPE-derived DNA in next generation sequencing: DNA extraction methods. **Plos One**, n.4, v. 14, 2019.

[16] NAM, Jong Kil 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.

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

[18] SKEPPNER, E. et al. Initial symptoms and delay in patients with penile carcinoma. **Scandinavian Journal of Urology and Nephrology**, v. 46, n. 5, p. 319–325, 2012.

[19] VOGELSTEIN, B.; SUR, S.; PRIVES, C. (2010). p53: the most frequently altered gene in human cancers. **Nature Education**, 3. Disponível em: http://www.nature.com/scitable/topicpage/p53-the-most-frequently-altered-gene-in-14192717.

[20] WATANABE, M. et al. Estimation of age-related DNA degradation from formalin-fixed and paraffin-embedded tissue according to the extraction methods. **Exp Ther Med**, n. 3, v. 14, p.2683-88, 2017.