

Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Mestrado

**SUBEXPRESSÃO DOS GENES *RB*, *P53* E *MYC* MEDIADA POR
HPV E SUPEREXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NO
PROCESSO INFLAMATÓRIO *COX2*, *PGE2* E *EGFR* COM
IMPORTÂNCIA TERAPÊUTICA EM CÂNCER PENIANO**

JULIANA MELO MACEDO MENDES

São Luís

2017

JULIANA MELO MACEDO MENDES

**SUBEXPRESSÃO DOS GENES *RB*, *P53* E *MYC* MEDIADA
POR HPV E SUPEREXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS
NO PROCESSO INFLAMATÓRIO *COX2*, *PGE2* E *EGFR* COM
IMPORTÂNCIA TERAPÊUTICA EM CÂNCER PENIANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof. Dr. Silma Regina Ferreira Pereira

Co-orientador: Prof. Dr. Gyl Eannes Barros Silva

São Luís

2017

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

Melo Macedo Mendes, Juliana.

SUBEXPRESSÃO DOS GENES RB, P53 E MYC MEDIADA POR HPV E
SUPEREXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NO PROCESSO
INFLAMATÓRIO COX2, PGE2 E EGFR COM IMPORTÂNCIA TERAPÊUTICA
EM CÂNCER PENIANO / Juliana Melo Macedo Mendes. - 2017.

65 p.

Coorientador(a): Gyl Eannes Barros Silva.

Orientador(a): Silma Regina Ferreira Pereira.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
Universidade Federal do Maranhão, 2017.

1. Câncer de pênis. 2. HPV. 3. Inflamação crônica.
4. Tumorigênese. I. Eannes Barros Silva, Gyl. II.
Regina Ferreira Pereira, Silma. III. Título.

JULIANA MELO MACEDO MENDES

**SUBEXPRESSÃO DOS GENES *RB*, *P53* E *MYC* MEDIADA
POR HPV E SUPEREXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS
NO PROCESSO INFLAMATÓRIO *COX2*, *PGE2* E *EGFR* COM
IMPORTÂNCIA TERAPÊUTICA EM CÂNCER PENIANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Silma Regina Ferreira Pereira
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. André Salim Khayat
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Rommel Mario Rodríguez Burbano
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento
Universidade Federal do Maranhão

“Ninguém pode voltar atrás e fazer um novo começo, mas é possível começar de novo e fazer um novo fim.”

Chico Xavier

Dedico essa vitória a Deus em primeiro lugar, sem Ele na minha vida eu não seria capaz de dar nenhum passo a frente. Dedico também a toda a minha família, com destaque a Diego (marido), Yumara (mãe) e Luiza (irmã). Dedico também ao meu desencarnado avô prof. Melo, o qual, em espírito, está comigo nas batalhas mais importantes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço por tornar possível a realização desta pesquisa à professora doutora Silma Regina Ferreira Pereira, por ter me dado a chance de inicia-la, que me ajudou a executá-la e me manteve firme para finalizá-la. Gostaria de agradecer por todos os ensinamentos, não só relacionados a genética, mas também relacionados a como ser uma cientista humana e vice-versa. Agradeço também ao meu co-orientador professor doutor Gyl Eannes Barros Silva por me guiar por um caminho antes desconhecido por mim, a histopatologia e imunohistoquímica. Agradeço também por ser um professor sempre gentil, simpático, paciente e disposto a ajudar. Devo agradecer enfaticamente ao Victor Maulen, por ter me ensinado tudo que sei hoje sobre a técnica e conceito da imunohistoquímica e por ter me ajudado sempre que precisei. Obrigada também por ser um gentil amigo.

Agradeço a minha família: meu escape, meu alicerce, minha fonte inesgotável de felicidade. Destaco o meu esposo Diego Mendes por me escutar todo dia ao meu retorno da UFMA e por sempre apoiar o meu crescimento e meu trabalho; a minha mãe Yumara Melo por ser a mulher mais importante da minha vida e por me ajudar em tudo que pode; e destaco também, a minha irmã, Luiza Melo, por ser mais do que uma irmã, por sempre estar disposta a me ajudar e a me ouvir. Agradeço ao meu avô, agora desencarnado, por essa conquista, assim como agradecei por todas as vitórias futuras. O senhor ajudou a construir em mim e na minha família uma base com a qual posso tornar todos os meus sonhos em realidade.

Agradeço aos meus amigos e companheiros de luta acadêmica, sem amigos toda jornada se torna mais difícil. Agradeço aos amigos e colegas do Laboratório de Genética e Biologia Molecular da UFMA e do Laboratório de imunofluorescência e Microscopia Eletrônica localizado no Hospital Universitário Presidente Dutra/UFMA, por cada ajuda, tenha sido ela para fazer uma solução, para achar um reagente, um material ou simplesmente pelas conversas na copa, esses pequenos momentos são mais importantes do que possamos perceber na hora. Agradeço em especial aos amigos de pesquisa Augusto Júnior e Jaqueline Pinho por me ajudarem com a pesquisa, com as coletas, com o repositório, com as conversas sobre câncer de pênis,

com seminários, com os dados histopatológicos, enfim, pela enorme ajuda de vocês. Agradeço em especial a minha parceira Marta Belfort, por ter me ajudado em todas as etapas desta pesquisa e por ter se tornado minha amiga, não ter me deixado desistir, por ter caminhado até aqui comigo, lado a lado, me sustentando quando vacilava, compartilhando comigo todos os momentos desse mestrado, tanto os ruins quanto os bons. Obrigada.

Devo meus agradecimentos a UFMA e ao programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde por me aceitar no seu corpo discente, por proporcionar o espaço físico e professores para a realização deste meu sonho. Agradeço também a instituição de fomento e apoio a pesquisa, a FAPEMA, por ter acreditado no potencial desta pesquisa e tê-la financiado. Agradeço mais uma vez a FAPEMA por ter tornado possível meu estágio em Georgetown University, EUA, supervisionado pela professora dra. Luciane Cavalli, o que me proporcionou crescimento pessoal e profissional imensurável.

Por fim, o agradecimento mais importante, á Deus, por ter segurado em minhas mãos e trazido até aqui. Devo tudo a Ti, Senhor.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	2
2.1.	Câncer peniano.....	2
2.2.	Epidemiologia e fatores de risco.....	5
2.3.	HPV e os genes <i>TP53</i>, <i>RB</i>, <i>MYC</i>.....	10
2.4.	Inflamação crônica em câncer peniano.....	15
2.5.	Câncer peniano e a via COX2, PGE2 e EGFR.....	18
3.	OBJETIVOS.....	22
3.1	Objetivo Geral.....	22
3.2	Objetivos específicos.....	22
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1.	Casuística.....	23
4.2.	Aspectos éticos.....	23
4.3.	Critérios de inclusão.....	23
4.4.	Critérios de não inclusão.....	23
4.5.	Armazenamento das amostras.....	23
4.6.	Extração de DNA de tecido fresco.....	24
4.7.	Deteção e genotipagem de HPV.....	26
4.7.1.	Nested PCR.....	26
4.7.2.	Sequenciamento.....	27
4.8.	Extração de RNA de tecido parafinado.....	28
4.9.	Transcrição reversa para obtenção de cDNA.....	29
4.10.	PCR em tempo real para estudo de expressão gênica.....	30
4.11.	Imunohistoquímica para estudo de expressão proteica e análise histopatológica.....	31
4.11.1	Técnica de Microarranjo Tecidual (TMA).....	31
4.11.2.	Ensaio de imuno-histoquímica.....	32

4.12.	Estatística.....	33
5.	RESULTADOS.....	35
5.1.	Capítulo I: Artigo I.....	35
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
	ANEXOS.....	58

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BG	- beta-globina
CaPe	- câncer de pênis
cDNA	- DNA complementar
CEPUFMA	- comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal do Maranhão
COX2	- Ciclo-oxigenase2
DNA	- ácido desoxirribonucleico
dNTP	- desoxirribonucleotídeos fosfatados
DST	- doença sexualmente transmissível
EDTA	- etileno diamina tetra acético
EGFR	- receptor de fator de crescimento
EGR1	- proteína de resposta de crescimento precoce 1
FFPE	- formalin-fixed paraffin-embedded
HCL	- ácido clorídrico
HE	- hematoxilina eosina
AIDS	- síndrome da imunodeficiência adquirida
HPV	- papilomavírus humano
HU-UFMA	- Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão
IL6	- interleucina 6
IMOAB	- Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Belo
INCA	- Instituto Nacional de Câncer
LS	- líquen escleroso
MgCl ₂	- cloreto de magnésio
mPGES	- microsomal prostaglandin E synthase
NF-KB	- factor nuclear kappa B
pb	- par de base
PBS	- tampão fosfato-salino
PCR	- reação em cadeia da polymerase
PGE	- prostaglandina E

PGE2	- prostaglandina E2
pH	- potencial hidrogeniônico
RB	- Retinoblastoma
RNA	- ácido ribonucleico
ROS	- espécies reativas de oxigênio
RON	- espécies reativas de nitrogênio
SCC	- carcinoma de células escamosas
SDS	- dodecil sulfato de sódio
TCLE	- termo de consentimento livre e esclarecido
TMA	- tissue microarray (arranjo em matriz de amostras teciduais)
TNF α	- Fator de necrose tumoral- α
UICC/AJCC-	Union for International Cancer Control–American Joint Committee on Cancer
VEGFR	- receptor de fator crescimento vascular

LISTA DE FIGURAS

Quadro 1: Sistema TNM para o câncer de pênis.....	3
Figura 1: Médias de casos de câncer de pênis por 100.000 homens registrados em alguns países. Regiões em azul representa alta incidência; em verde claro representa moderada e verde escuro, baixa incidência. Fonte: CHAUX e CUBILLA (2012).....	6
Quadro 2: Incidência de câncer peniano em algumas cidades nas Américas e na Ásia.....	7
Quadro 3: Resumo dos fatores epidemiológicos e de risco em câncer peniano citados em pesquisas realizadas no Brasil e em outros países.....	8
Figura 2: Estrutura genômica do HPV e integração ao genoma do hospedeiro. O genoma viral é dividido em três partes de acordo com a função dos genes presentes. A primeira, Longa região de Controle (LCR), trata-se de uma região não codificante com função promotora e reguladora. A segunda região, Precoce, é constituída pelos oncogenes E1, E2, E4, E5, E6 e E7, os quais são responsáveis pela replicação viral e oncogênese. A terceira é a região Tardia, na qual, estão os genes tardios L1 e L2 com o papel de codificar as proteínas do capsídio viral. Durante a patogenicidade da infecção, os tipos de alto risco, na maioria, integram seu genoma com o da célula hospedeira ocasionando instabilidade genômica na célula e superexpressão de oncogenes virais. Imagem adaptada de GILL, et al. (2014)	12
Figura 3: Ciclo de vida do HPV. Imagem adaptada de Mittal e Banks (2017).....	13
Figura 4: Principais sítios de inserção do genoma viral no cromossomo 8 apontados pelas linhas vermelhas. Imagem adaptada de Liu et al. (2015).....	15
Figura 5: Base molecular da carcinogênese relacionada à inflamação. A inflamação ou ativação oncogênica resultam da expressão de fatores proinflamatórios dentro de células tumorais como Fator nuclear-Kb (NF-Kb) e STAT3, os quais ativam citocinas e quimiocinas essenciais como Fator de Necrose Tumoral- α (TNF α) e Interleucina 6 (IL6), assim como, enzimas inflamatórias como COX2, formando uma rede complexa de respostas inflamatórias e fornecendo um microambiente tumoral favorável. Imagem adaptada de CRUSZ e Balkwill (2015).....	17

Quadro 4: Exemplos de estudos que associam a inflamação e o tipo de câncer.....	18
Figura 6: Cascata da via das prostaglandinas. Imagem adaptada de RICCIOTTI e FITZGERALD (2011).....	20
Quadro 5: Protocolo de extração de DNA com fenolclorofórmio.....	24
Quadro 6: Protocolo de reação e ciclagem da primeira etapa da Nested PCR.....	26
Quadro 7: Protocolo seguido para a 2ª etapa da Nested PCR.....	27
Quadro 8: Protocolo de desparafinização.....	28
Quadro 9: Protocolo e ciclagem utilizados na reação de transcrição reversa.....	29
Quadro 10: Protocolo utilizado na PCR quantitativa para os genes COX2, EGFR, TP53, RB e MYC.....	30
Figura 7: Microarranjo tecidual (TMA).....	31
Quadro 11: Protocolo seguido nos ensaios de imunohistoquímica.....	32

RESUMO

Câncer peniano (CaPe) é uma neoplasia rara com maior incidência em regiões com baixos índices socioeconômicos. No Brasil, a maior parte dos homens acometidos por essa doença residem nas regiões Norte e Nordeste. Entre os principais fatores de risco estão a falta de higiene, fimose, infecção por papilomavírus humano (HPV) de alto risco e inflamação crônica. Embora o papel da inflamação e da infecção por HPV sejam conhecidas em alguns cânceres, ainda não é bem estabelecida a relação entre esses dois fatores e a disfunção de genes envolvidos na gênese de CaPe. Assim, neste estudo foi avaliada a expressão de genes envolvidos no processo de inflamação crônica e na infecção pelo HPV e o papel da desregulação desses genes no estabelecimento e progressão de tumor peniano. Para isto, foram avaliadas amostras teciduais frescas e fixadas em formalina embebidas em parafina (FFPE) de 55 pacientes com câncer de pênis. Foram realizadas detecção e genotipagem de HPV por nested PCR e sequenciamento direto em todas as amostras. Um subgrupo amostral (N=37) foi avaliado por qRT-PCR para determinação da expressão dos genes *COX-2*, *EGFR*, *MYC*, *RB* e *P53*. Para isso, foram usadas seções de tecidos de FFPE contendo mais de 70% de células tumorais. A expressão proteica desses genes e de PGE2 foi determinada por imunohistoquímica em 42 amostras. Foi feita análise de associação entre os parâmetros clínico-histopatológicos, presença de HPV e expressão gênica e proteica. Todos os tumores foram classificados como carcinoma epidermóide de células escamosas. DNA de HPV foi detectado em 80% dos tumores (N=55), dos quais 95% apresentaram, pelo menos, um subtipo de alto risco, e destes, HPV16 foi o subtipo mais frequente (63%). Dentre as amostras negativas para HPV no tecido tumoral, 14% foram positivas no tecido adjacente ao tumor, de modo que 94% dos pacientes, no total, foram positivos para presença de DNA de HPV. Nas amostras nas quais foi feita análise de expressão gênica (N=37), detectou-se 94,4% de infecção, sendo 94% dos infectados possuem, pelo menos um, tipo de alto risco. Foi identificada superexpressão em todos os genes envolvidos no processo inflamatório. *EGFR* mostrou superexpressão em 84% das amostras, enquanto *COX2* e PGE mostraram-se, cada um, superexpressos em 40% dos tumores. Houve associação entre níveis de expressão de *EGFR* e *COX2*, e entre *COX2* e PGE2. Por outro lado, os genes relacionados à infecção por HPV, *MYC*, *RB* e *P53*, mostraram-se subexpressos em 97%, 85% e 81% das amostras, respectivamente. A expressão dos genes estudados não mostrou associação com as variáveis clínico-histopatológicas. Este estudo descreve a repressão da atividade de *RB* e *P53* em tumores HPV+, sugerindo que há um mecanismo de controle desses genes em câncer peniano, possivelmente mediado pelo vírus. A alta detecção de infecção por HPV mostra a importância da imunização de meninos na prevenção de câncer peniano, e ressalta-se a necessidade de ampliação da cobertura vacinal de modo a abranger tipos de vírus presentes em câncer peniano. A superexpressão de *EGFR/COX2/PGE2*, e a associação encontrada entre eles, sustenta a possibilidade de uso terapêutico de drogas anti-EGFR e anti-COX em tumores penianos.

Palavras-chave: Câncer de pênis; inflamação crônica; tumorigênese; HPV.

ABSTRACT

Penile cancer (PeCa) is a rare neoplasm with higher incidence in regions with low socioeconomic indexes. In Brazil, most of the men afflicted by this disease reside in the North and Northeast. Among the main risk factors are lack of hygiene, phimosis, high-risk human papillomavirus (HPV) infection and chronic inflammation. Although the role of inflammation and HPV infection is known in some cancers, the relationship between these two factors and the disruption of genes involved in the CaPe genesis is not yet well established. Thus, our main goal was to determine the expression of genes involved in the process of chronic inflammation and in the carcinogenesis mediated by HPV infection and the role of the deregulation of these genes in the establishment and progression of penile tumor. For this purpose, fresh and formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues from 55 patients with penile cancer were evaluated. HPV detection and genotyping were carried out by nested PCR and direct sequencing in all samples. A subgroup (N = 37) was evaluated by qRT-PCR to determine *COX-2*, *EGFR*, *MYC*, *RB* and *P53* gene expression. For this, sections of FFPE tissues containing more than 70% tumor cells were analyzed. Protein expression of these genes and PGE2 were determined by immunohistochemistry in the same tumor tissues. An analysis of the association between the clinical-histopathological parameters, presence of HPV, and gene and protein expression was performed. All tumors were classified as epidermoid squamous cell carcinoma. HPV DNA was detected in 80% of tumors, of which 95% had at least one high-risk subtype, and HPV16 was the most frequent subtype (63%). Among the HPV negative samples in the tumor tissue, 14% were positive in the tissue adjacent to the tumor, so that 94% of the patients, in total, were positive for the presence of HPV DNA.. Overexpression was identified in all genes involved in the inflammatory process. *EGFR* showed overexpression in 84% of the samples, while *COX2* and PGE were overexpressed in 40% of the tumors, each. There was an association between the levels of *EGFR* and *COX2* expression, and between *COX2* and PGE2. On the other hand, the genes related to HPV infection, *MYC*, *RB* and *P53*, were underexpressed in 97%, 85% and 81% of the samples, respectively. The gene expressions did not show any association with clinical-histopathological variables. This study describes the repression of *RB* and *P53* activity in HPV + tumors, suggesting that there is a mechanism of control of these genes, possibly mediated by the virus. The high detection of HPV infection shows the importance of the immunization of boys in the prevention of penile cancer. Our data emphasize the need to expand the vaccine coverage to cover types of HPV present in penile cancer. The overexpression of *EGFR* / *COX2* / PGE2, and the association found between them, support the possibility of therapeutic use of anti-EGFR and anti-COX drugs in penile tumors.

Key words: Penile cancer, chronic inflammation; tumorigenesis; HPV.

1. INTRODUÇÃO

O câncer de pênis (CaPe) é um tumor raro, principalmente em países com altos índices socioeconômicos. Enquanto o Brasil detém uma das maiores taxas de incidência no mundo, concentrando principalmente nas regiões norte e nordeste. A ocorrência deste câncer agressivo está associada a baixas condições socioeconômicas e a alguns fatores de risco como a higienização escassa ou incorreta do órgão, presença de fimose, a não circuncisão, presença de infecção pelo papiloma vírus humano (HPV) e inflamação crônica no local.

A presença de HPV pode induzir processos carcinogênicos através da desregulação de alguns genes como os supressores de tumor *TP53* e *RB* e o oncogene *MYC*. A inflamação crônica por sua vez pode levar a um processo carcinogênico por meio dos constantes danos e remodelamentos teciduais e por liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Neste tipo de inflamação, alguns genes centrais são constantemente expressos em níveis elevados dentre eles o *COX2* e o eicosanóide *PGE2*, os quais estimulam a expressão de receptores de fatores de crescimento, como o *EGFR*. Este último é por si só frequentemente associado a sua superexpressão e tumores epidermais.

O CaPe se trata de uma doença frequentemente diagnosticada em estágios avançados e por consequência a opção de tratamento mais utilizada é a penectomia. Este procedimento pode trazer ao paciente transtornos psicológicos e sociais. Sendo assim, é de suma importância que hajam mais estudos que contribuam para um maior conhecimento sobre este câncer e na descoberta de marcadores biológicos que auxiliem no prognóstico e também, que possam ser utilizados para uso terapêutico.

Neste trabalho, com o intuito de entender um pouco da ação do HPV nos tumores penianos infectados e a expressão de genes importantes na tumorigênese foram avaliadas as expressões relativas de genes afetados pela infecção por HPV, *RB*, *TP53* e *MYC*, assim como os que são frequentemente superexpressos em microambientes de inflamação crônica, *COX2* e *EGFR* e o eicosanóide *PGE2*. Avaliou-se também uma possível associação dos genes entre si e com características clínica-histopatológicas dos pacientes. Este trabalho será aqui documentado como

dissertação de mestrado em forma de artigo, o qual foi submetido a revista internacional The Journal of Urology, qualis A1.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Câncer Peniano

O termo câncer abrange um conjunto de mais de 100 doenças caracterizadas por apresentarem o crescimento desordenado de células, com possibilidade de invasão de tecidos e órgãos. Quando a origem do tumor ocorre em tecidos epiteliais, como pele ou mucosas, tais tumores são denominados carcinomas. Os sarcomas, por sua vez, são considerados aqueles tumores que se originaram em tecidos conjuntivos, como osso, músculo ou cartilagem (INCA, 2017a).

O carcinoma peniano é uma malignidade geralmente agressiva, caracterizada pela disseminação precoce para o linfonodo regional e possíveis metástases para sítios distantes como pulmão, cérebro e ossos (KAYES et al., 2007; SONPAVDE et al., 2013). A glândula do pênis é o sítio de origem mais comum, seguido pelo prepúcio, sulco coronal e haste. A maioria dos pacientes geralmente chegam ao diagnóstico com uma úlcera ou lesão inflamatória na região do pênis (HEYNS et al., 2010).

A maioria dos tumores malignos de pênis (95%) é classificada histologicamente como Carcinoma de Células Escamosas (SCC) (CUBILLA et al., 2001; CALMON et al., 2011; SOUSA, 2015) restando aproximadamente 5% dos casos para os tipos melanomas, carcinomas basocelulares e sarcomas (CUBILLA et al., 2001; CALMON et al., 2011). O SCC é classificado como usual, basaloide, verrucoso, condilomatoso (verrugoso), papilar, sarcomatoide, adenoescamoso e misto (EBLE et al., 2004). Tais subtipos variam entre si em relação à agressividade dos tumores e o tempo de sobrevivência dos pacientes (PIZZOCARO, et al., 2010; SONPAVDE et al., 2013), como por exemplo, o subtipo verrucoso, o qual possui comportamento menos agressivo, sendo caracterizado pela lesão vegetante com lento crescimento e menor potencial metastático (DE PAULA et al., 2005).

O carcinoma condilomatoso e o basalóide estão entre alguns subtipos histológicos que estão fortemente associados com infecção por HPV, onde tal associação pode estar envolvida na etiologia do processo de carcinogênese (LOPES et al., 2002; KIEFFER et al., 2014).

A agressividade e estágio tumorais de pênis seguem o padrão clínico-histopatológico de diferenciação e estadiamento tumoral utilizado para carcinomas epidermóides. A definição do grau de diferenciação segue o critério de Broders, o qual é dividido em três níveis:

- Grau I: bem diferenciado;
- Grau II: moderadamente diferenciado;
- Grau III: indiferenciado (PIZZOCARO et al., 2010).

Em relação ao estadiamento tumoral a classificação utilizada segue dois critérios que possibilitam a identificação das características histológicas, estruturais e anatômicas envolvidas em cada tumor analisado e, estes critérios tratam-se de um clínico e um histopatológico. O estadiamento clínico se dá pelo critério de Jackson, que divide os estágios em quatro níveis:

- Estágio I: Circunscrito à glândula e ao prepúcio, sem envolvimento do corpo do pênis;
- Estágio II: Invasão do corpo cavernoso do pênis, mas sem disseminação para os linfonodos;
- Estágio III: Disseminação clínica dos linfonodos regionais da virilha. A possibilidade de cura depende do número e da extensão dos nodos envolvidos;
- Estágio IV: Invasivo, apresentando extenso envolvimento dos linfonodos, sem possibilidade de ressecção dos mesmos (JACKSON, 1966).

O estadiamento histopatológico se dá pelo sistema de classificação TNM o qual foi proposto pela *Union for International Cancer Control* juntamente com a *American Joint Committee on Cancer* (UICC/AJCC) (STEPHEN; CAROLYN, 2010). No sistema TNM cada letra corresponde a uma categoria, a T abrange informações sobre o tumor primário, como tamanho, abrangência no órgão em que se originou e quanto invadiu os tecidos adjacentes; a N aborda se houve invasão para os linfonodos vizinhos enquanto a categoria M informa se há metástase a distância (INSTITUTO ONCOLOGIA, 2017).

O sistema TNM compreende os níveis inseridos no Quadro 1 (STEPHEN; CAROLYN, 2010):

Quadro 1: Sistema TNM para o câncer de pênis.

Estágio	Descrição
Tumor (T)	
Tx	Tumor primário não é passível de avaliação.
T0	Sem evidência de tumor primário.
Tis	Carcinoma in situ.
Ta	Tumor verrucoso não invasivo.
T1	Tumor invade tecido conectivo subepitelial.
T1a	Sem invasão linfovascular e bem ou moderadamente diferenciado (Grau 1-2).
T1b	Com invasão linfovascular ou pouco diferenciado/indiferenciado (Grau 3-4).
T2	Tumor invade corpo esponjo/ corpo cavernoso
T3	Tumor invade a uretra.
T4	Tumor invade outras estruturas adjacentes.
Linfonodos regionais (N)	
NX	Linfonodos regionais não passíveis de avaliação.
N0	Sem evidência de infiltração.
N1	Metástase única.
N2	Metástase múltiplas ou bilaterais superficiais.
N3	Metástase em linfonodos profundos pélvicos ou inguinais.
Metástase distante (M)	
MX	Metástase distante não é passível de avaliação.
M0	Nenhuma metástase distante.
M1	Metástase à distância.
Graduação Histopatológica	
Gx	O grau de diferenciação não pode ser avaliado.
G1	Bem diferenciado.
G2	Moderadamente diferenciado.
G3	Pouco diferenciado.
G4	Indiferenciado.

Fonte: Adaptado de AJCC Câncer Staging Manual (2010).

2.2. Epidemiologia e fatores de risco

O câncer de pênis é um câncer raro e frequentemente associado a fatores sócio econômicos baixos e culturais, sendo mais frequente em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. A frequência média de câncer peniano nas nações do Reino Unido chega a 1,3-2,0 por 100.000 homens e a taxa de mortalidade por esta doença é de 0,3-0,4 por 100.000, na Espanha a incidência está por volta de 0.7-1.5 por 100.000. O Canadá e Estados Unidos apresentam uma incidência de 0,5 casos a cada 100.000 homens. Entretanto, nos Estados Unidos, apesar de rara, CaPe trata-se de uma malignidade com altas taxas de morbidade e mortalidade (GOODMAN et al., 2007; FRISCH, et al., 1995; BARNHOLTZ-SLOAN, et al., 2007; FERRÁNDIZ-PULIDO, et al, 2012; JAYARATNA et al., 2014; CHRISTODOULIDOU et al., 2015; PUBLIC HEALTH ENGLAND KNOWLEDGE AND INTELLIGENCE TEAM, 2013; FORMAN et al., 2014; INCA, 2017b).

O fator cultural está fortemente associado com a etiologia do câncer de pênis pois, em culturas judaicas, musselinas ou em regiões, nas quais a circuncisão neonatal é praticada de forma cultural na população, a incidência deste tumor encontra-se virtualmente nula (SCHMAUZ; JAIN, 1971). A inibição da inflamação crônica devido à circuncisão é considerada como uma explicação para tal incidência nessas regiões (SCHOEN, 1991; KOCHEN; McCURDY, 1980).

A epidemiologia deste câncer em países não desenvolvidos ou em desenvolvimento (com exceção de regiões que tenham a circuncisão na sua cultura), como o Brasil, Paraguai e países africanos e asiáticos, sua incidência se torna elevada, com incidências superiores a 2,08 por 100.000 homens (Figura 1) (MISRA et al., 2004; ORNELLAS, 2008; KOIFMAN et al. 2011; CHAUX, et al., 2013; ROMERO et al., 2013; DO COUTO et al. 2014; CHRISTODOULIDOU et al., 2015). Tal variação geográfica na prevalência e na incidência desta patologia já era visível no ano de 1992 (PARKIN; MUIR, 1992). Fatores socioeconômicos e o acesso a sistemas de saúde básica são fatores determinantes para estas variações regionais (ORNELLAS, et al., 1994; CHAUX, et al. 2013a).

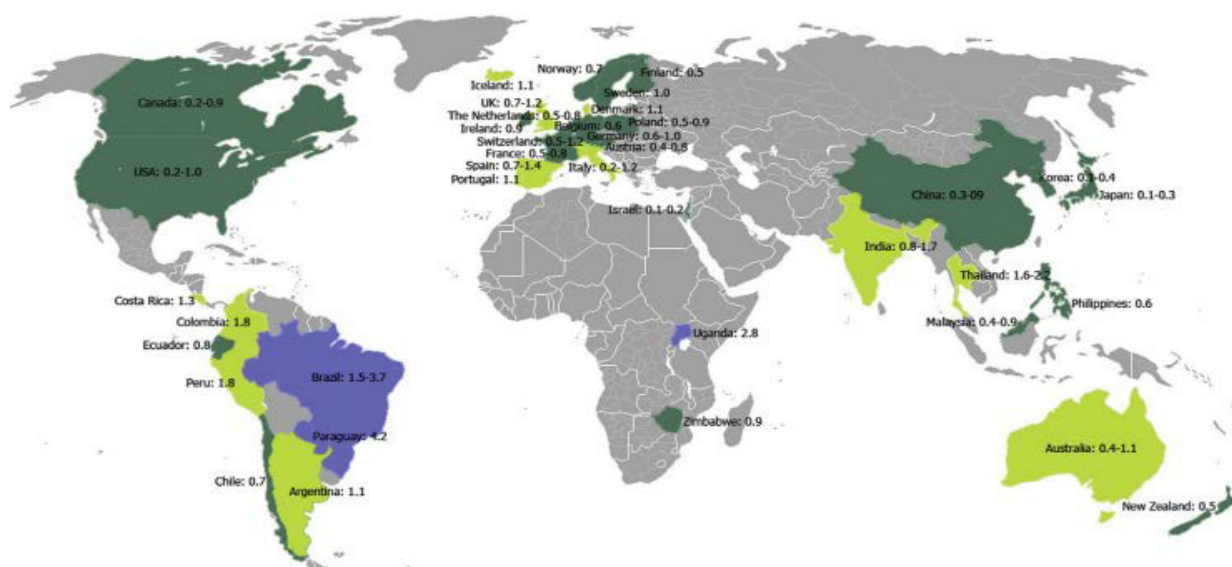


Figura 1: Médias de casos de câncer de pênis por 100.000 homens registrados em alguns países. Regiões em azul representa alta incidência; em verde claro representa moderada e verde escuro, baixa incidência. Fonte: CHAUX e CUBILLA (2012).

No Paraguai, a incidência de CaPe chega a ser quatro vezes maior do que nos Estados Unidos e na Europa. A maioria dos pacientes é oriunda de zonas rurais ou suburbanas (82%), vivem na pobreza (75%) e com escasso acesso à educação (91%), com histórico de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST), principalmente pelo Papilomavírus Humano (HPV) (74%), verrugas genitais, presença de fimose (57%), ruins/péssimos hábitos de higiene (90%), e 45% com diagnóstico de Líquen Escleroso (LS) doença inflamatória de pele que atinge áreas anogenitais de homens e de mulheres (CHAUX et al., 2013). Este padrão, social e fatores de risco, é observado não só no Paraguai mas também é tido como um padrão universal em estudos com CaPe (KOIFMAN et al., 2011; D'HAUWERS, et al. 2012; CARLSON et al., 2013; PHILIPPOU et al. 2013; COUTO et al., 2014; CHRISTODOULIDOU et al., 2015).

No Brasil, país com uns dos maiores índices de câncer peniano, há variação entre suas regiões, como o caso das regiões sul e sudeste onde a incidência é menor em relação ao norte e nordeste (FAVORITO et al. 2008; ROMERO et al., 2013; BUSSO-LOPES et al., 2015). No estado de Pernambuco, o perfil clínico e epidemiológico deste carcinoma se dá por pacientes com menores condições

econômicas, com menor nível de educação e dificuldade ao acesso a assistência médica (DO COUTO et al. 2014), o que pode justificar o diagnóstico prevalentemente tardio da doença em todo o país e a consequente prevalência de estágios avançados no momento do diagnóstico (FAVORITO et al. 2008; KOIFMAN et al. 2011; MORRIS et al. 2011; DO COUTO et al. 2014, GAO et al, 2016). Entretanto, algumas cidades do centro-oeste também registram altos índices da doença, sendo observada em Goiânia uma incidência de 3,3 casos a cada 100,000 homens e de 2,1 casos por 100,000 homens na cidade de Cuiabá, localizada no estado vizinho. Ao ponto que, na cidade de Belo horizonte, região sudeste, é observada incidência de apenas a 0,9 casos por 1000,000 homens. Refletindo a baixa incidência desse tipo de tumor em regiões mais desenvolvidas no Brasil, tal como sudeste e principalmente a região sul (FAVORITO et al., 2008; FORMAN et al., 2014).

No estado do Maranhão, no período de 2006 a 2009 foram detectados 74 casos de câncer peniano de acordo com um levantamento realizado pelo Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello- IMOAB e 40 casos entre os anos de 2003 e 2008 levantados pelo Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (HU-UFMA) ambos com pacientes apresentando diversos fatores de risco (ALVES et al., 2010).

No Quadro 2 é possível observar as variações entre as incidências de algumas cidades da América do Norte, das Américas central e sul e alguns países asiáticos. As cidades brasileiras estão entre as com os maiores índices da doença (principalmente as da região nordeste. Israel, país praticante da circuncisão neonatal, observa-se a menor incidência dentre os países citados (CHAIM et al., 2005; FAVORITO et al., 2008; FORMAN et al., 2014).

Quadro 2: Incidência de câncer peniano em algumas cidades nas Américas e na Ásia.

América Central e Sul	Incidência por 100.00 homens	América do Norte	Incidência por 100.00 homens
Cidade / País		Cidade/País	
Córdoba / Argentina	1,2	British Columbia/ Canadá	0,3
Aracaju / Brasil	2,5	Alabama / Estados Unidos	0,6
Fortaleza / Brasil	1,7	Colorado / Estados Unidos	0,4
Cuiabá / Brasil	2,1	Delaware / Estados Unidos	0,2
Goiânia / Brasil	3,3	Ásia	Incidência por 100.00 homens
Belo horizonte / Brasil	0,9	Cidade / País	
São Paulo / Brasil	1,7	Israel	0,1-0,2
Valdívia/ Chile	0,9	Fukui Prefecture / Japão	0,2
Uruguai	1,5	Seoul / Coréia do Sul	0,2
Cali / Colombia	1,2	Mizoram / Índia	1,7
Cuba	1,6	Zhongshan City / China	1,0

Fonte: Forman et. al. (2014)

O CaPe ainda é considerado um câncer pouco estudado, todavia, na literatura, algumas características epidemiológicas e fatores de risco já são bem estabelecidos (Quadro 3).

Quadro 3: Resumo dos fatores epidemiológicos e de risco em câncer peniano citados em pesquisas realizadas no Brasil e em outros países.

EPIDEMIOLOGIA	REFERÊNCIAS
Baixo status sócio econômico	Favorito et al., 2008; Koifman et al., 2011; Chaux et al., 2013a; Do Couto et al., 2014; Christodoulidou et al., 2015; INCA, 2017b.
Reside em zonas rurais ou suburbanas	Koifman et al. 2011; Chaux, et al. 2013a.
Escasso acesso à educação	Favorito et al., 2008; Morris et al., 2011; Koifman et al. 2011; Chaux, et al. 2013a; Do couto et al. 2014; INCA, 2017b.
Idade igual ou maior que 58,35 anos	Favorito et al., 2008; Chaux et al., 2013a; Koifman et al., 2011; Do couto et al., 2014.
Católicos	Koifman et al., 2011.
Casados	Koifman et al., 2011; Do couto et al., 2014.
FATORES DE RISCO	
Má higiene	Favorito et al., 2008; Koifman et al., 2011; Ferrándiz-pulido et al., 2012; D'hauwers et al., 2012; Chaux et al., 2013a; Gastardelo et al., 2014; Christodoulidou et al., 2015.
Fumo	Favorito et al., 2008; Koifman et al., 2011; D'hauwers et al., 2012; Chaux et al., 2013a; Christodoulidou et al., 2015.
Fimose	koifman et al., 2011; D'hauwers et al. 2012; Chaux et al., 2013a; Gastardelo et al., 2014; christodoulidou et al., 2015; inca, 2017b.
DST (HPV mais prevalente)	Ferrándiz-pulido, et al, 2012; D'hauwers et al. 2012; Chaux e Cubilla et al., 2012; Sonpavde et al., 2013; Calmon et al., 2013; Do couto et al., 2014; Gastardelo et al., 2014; busso-lopes et al., 2015; Christodoulidou et al., 2015.
Inflamação crônica	Koifman et al., 2011; Ferrándiz-pulido, et al., 2012; D'hauwers et al., 2012; Chaux e Cubilla et al., 2012.
Líquen escleroso	Ferrándiz-pulido, et al., 2012; D'hauwers et al., 2012; Chaux et al., 2013a; Carlson et al., 2013; Gastardelo et al., 2014; Christodoulidou et al., 2015.
Obesidade	Barnes et al., 2016.
Trauma peniano	Christodoulidou et al., 2015.
Não circuncisão	Favorito et al., 2008; Morris et al., 2011; Koifman et al., 2011; Ferrándiz-pulido et al., 2012; Chaux et al., 2013a; Gastardelo et al., 2014; Christodoulidou et al., 2015.
Raios ultravioleta	Christodoulidou et al., 2015.
AIDS	Christodoulidou et al., 2015; Shah et al., 2015.

A infecção pelo HPV, juntamente com a má higiene e presença de fimose, está entre um dos fatores de risco mais estudados em CaPe. A presença do vírus torna-se determinante quanto a etiologia do carcinoma, pois, há, um perfil genômico distinto entre os pacientes que são HPV positivos e HPV negativos, sugerindo que tais tumores podem ter duas etiologias moleculares diferentes devido a associação do HPV nos diferentes subtipos histológicos de tumores de pênis (POW-SANG et al., 2010; FERRÁNDIZ-PULIDO, et al, 2012; AFONSO et al., 2012; CHAUX; CUBILLA, 2012; CHAUX, et al. 2013a; BUSSO-LOPES et al. 2015; SOUSA, 2015).

2.3. HPV e os genes *TP53*, *RB*, *MYC*

O Papilomavírus Humano (HPV) pertence a uma família de vírus de DNA com cerca de 8000 pares de bases apresentando distintos tipos patogênicos (PARTRIDGE, KOUTSKY, 2006). Dentre estes, os tipos 16 e 18 estão entre os de alto risco (ZUR HAUS, 2002; CARVALHO, et al. 2007) mais encontrados em amostras de câncer peniano invasivos e *in situ* (DIANZANI, et al. 1998, SOUSA, 2015, FLAHERTY et al, 2014).

O HPV trata-se de um vírus circular de dupla fita de DNA, epiteliotrópico, o qual infecta células basais epidermais e de mucosas por meio de microfissuras no tecido. O ciclo de vida do vírus se inicia com a infecção destas células basais e se instala nas mesmas de forma epissomal ou se integra ao DNA do hospedeiro (Figura 2). À medida que estas células se diferenciam e passam para a camada superficial da epiderme os genes virais vão sendo transcritos, se iniciando pelos precoces E1, E2, E6, E7 e, com o passar do ciclo normal da célula os demais genes precoces são ativados E4, E5, iniciando, nesta etapa, a amplificação do DNA viral e indução da reentrada da célula na fase S levando a proliferação anormal celular. Neste momento, algumas células filhas sobem para o epitélio e começam o processo terminal de diferenciação. Em tais células infectadas e diferenciadas ocorre a ativação de genes tardios L1/2 os quais vão levar ao encapsulamento dos vírus e sua liberação para posterior infecção e reinício do ciclo (Figura 3). (MITTAL; BANKS, 2017).

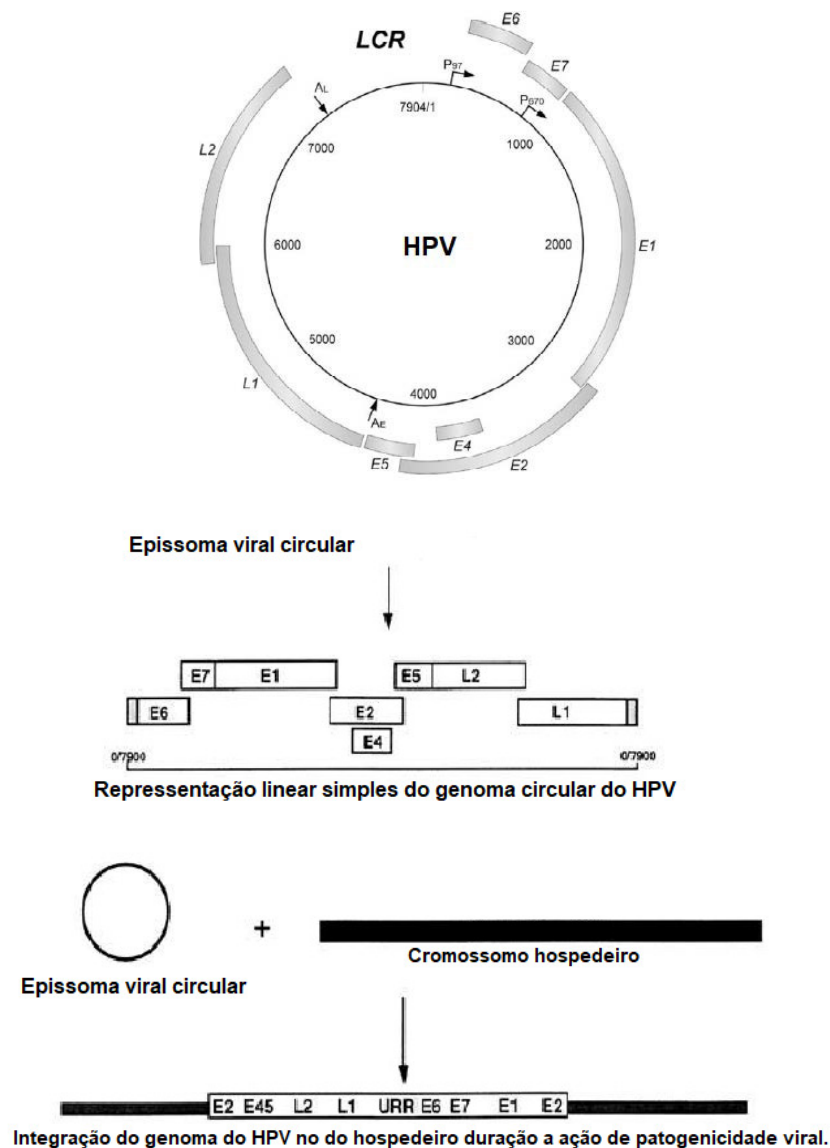


Figura 2: Estrutura genômica do HPV e integração ao genoma do hospedeiro. O genoma viral é dividido em três partes de acordo com a função dos genes presentes. A primeira, Longa região de Controle (LCR), trata-se de uma região não codificante com função promotora e reguladora. A segunda região, Precocce, é constituída pelos oncogenes *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* e *E7*, os quais são responsáveis pela replicação viral e oncogênese. A terceira é a região Tardia, na qual, estão os genes tardios *L1* e *L2* com o papel de codificar as proteínas do capsídeo viral. Durante a patogenicidade da infecção, os tipos de alto risco, na maioria, integram seu genoma com o da célula hospedeira ocasionando instabilidade genômica na célula e superexpressão de oncogenes virais. Imagem adaptada de GILL, et al. (2014).

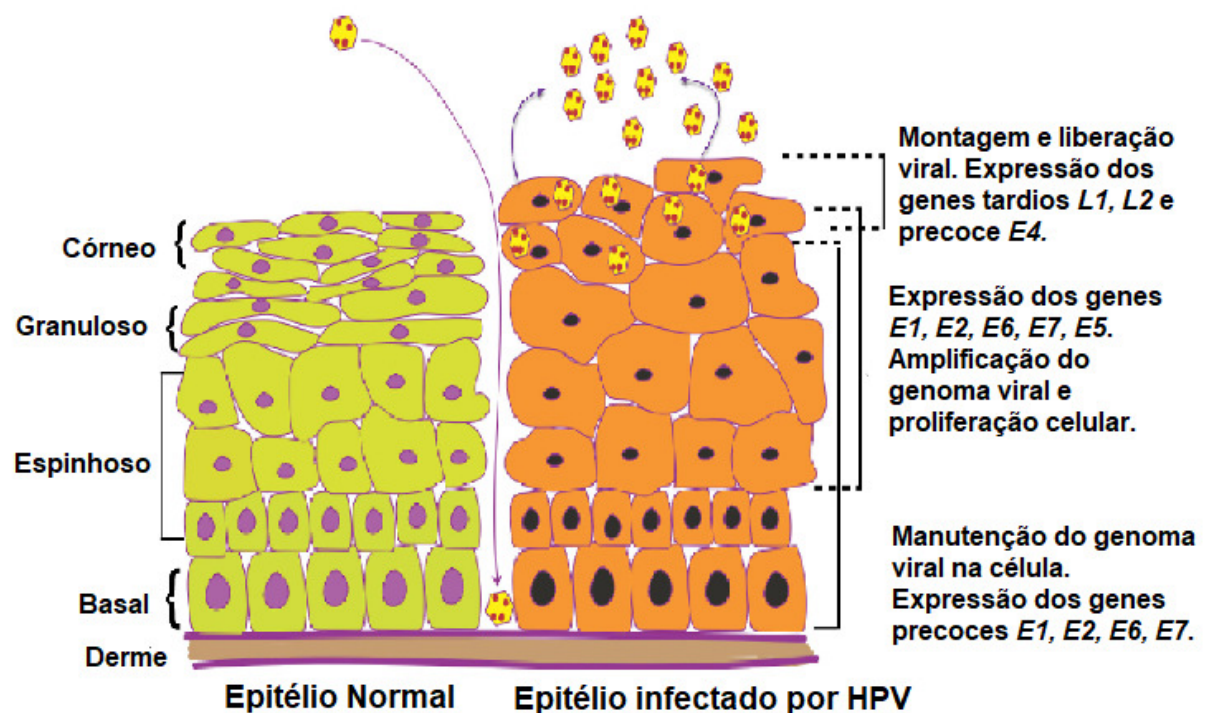


Figura 3: Ciclo de vida do HPV. Imagem adaptada de Mittal e Banks (2017).

O ciclo normal de células basais epidermais inclui a diminuição de síntese proteica e a parada de divisão celular a medida que se diferenciam e chegam na superfície epitelial. Entretanto, o HPV consegue manter um constante ritmo de divisão celular através de indução a entradas na fase S do ciclo da célula. Este descontrole no potencial proliferativo da célula se dá através da inativação de proteínas chaves no controle do ciclo celular, como TP53 e membros da família pRb pela ação cooperativa de oncoproteínas virais E6 e E7 (MITTAL; BANKS, 2017).

As oncoproteínas virais E6 e E7 são continuamente expressas, principalmente em células infectadas com tipos de HPV de alto risco, e seus produtos cooperam no distúrbio da diferenciação celular, proliferação e apoptose através do envolvimento destas proteínas com as vias de sinalização Rb e p53. Em câncer de cérvix, a expressão destas proteínas é necessária para induzir e manter o fenótipo neoplásico e supõe-se que em câncer peniano possa haver um mecanismo semelhante KAYES, et al., 2007; PROTZEL, et al. 2007; LIMA et al., 2013).

O produto oncogenético E6 é conhecido por interferir diretamente na via da proteína p53 através da ligação com a região de oligomerização da mesma para mediar sua ubiquitinização e degradação pela via 26S, que se supõe ser análoga a

degradação da p53 mediada pela MDM2, via que realiza um feedback negativo com p53 (CAMUS, et al., 2007; MENENDEZ, et al., 2007). Tal ligação de E6 com p53 leva então a uma supressão da função inibitória desta proteína nos *checkpoints* da fase G1/S do ciclo celular causando uma proliferação celular descontrolada, perda da diferenciação celular e do controle apoptótico (CAMUS, et al., 2007; MENENDEZ, et al., 2007).

A expressão de E7 não demonstra associação direta com p53, porém, a proteína Rb demonstra ser alvo desta oncoproteína. O Rb faz parte de uma via de sinalização, P16INK4a/ ciclina D/ Rb, que se encontra desregulada em muitos carcinomas. A inativação da proteína retinoblastoma pode contribuir para eventos carcinogênicos em tumores dependentes de HPV (FERREUX et al., 2003; JACOBS; DE LANGE, 2005).

Os tipos de HPV de alto risco possuem uma característica em comum: a alta taxa de inserção do genoma viral no genoma do hospedeiro. Essa inserção pode levar a instabilidade genômica na célula hospedeira como quebras cromossômicas, monossomias, trissomias, amplificação de oncogenes e deleção de genes supressores de tumor, sendo então, uma importante etapa para o processo de carcinogênese. Durante a integração, alterações genômicas também ocorrem no DNA do HPV, havendo consequências, como a perda do gene viral *E2* e a desregulação da atividade dos oncogenes virais *E6* e *E7* (GILL et al., 2014; MITTAL; BANKS, 2017; FLAHERTY, 2014; FERNANDES et al, 2015;)

A inserção ocorre ao acaso e pode ocorrer em diversos sítios do genoma das células hospedeiras. Entretanto, há sítios considerados “pontos quentes” que são geralmente alvos desta integração viral. Essas regiões denominadas sítios frágeis. Muitos desses pontos estão no cromossomo 8 onde está localizado o oncogene *MYC* (8q24) (Figura 4) (COUTURIER, et al., 1991; PETER et al., 2006; LIU et al., 2015; MITTAL; BANKS 2017).

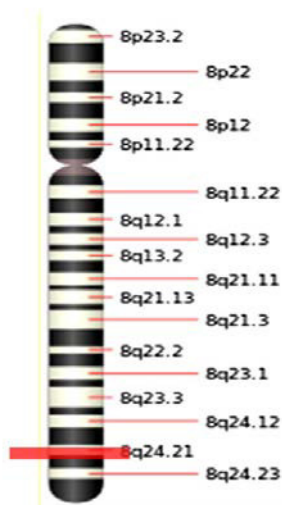


Figura 4: Principais sítios de inserção do genoma viral no cromossomo 8 apontados pelas linhas vermelhas. Imagem adaptada de Liu et al. (2015).

O oncogene *MYC* age como um fator de transcrição ativando genes com funções proliferativas normais do ciclo celular. Entretanto, quando este gene está desregulado, há uma série de aberrações e instabilidades genômicas, as quais, podem iniciar um processo carcinogênico (KUZYK; MAI, 2014).

A inserção do genoma viral perto de *MYC* e a atividade dos oncogenes E7 e E6 são associados com a desregulação deste gene e a sua amplificação por aumento do número de cópias (COUTURIER et al., 1991; KAYES; MINHAS, 2012; MASFERRER et al., 2012). Em alguns casos há a correlação entre ganho de cópias de *MYC* e o aumento de expressão com piores prognósticos clínicos em pacientes com câncer peniano (KAYES; MINHAS, 2012; MASFERRER et al., 2012). Entretanto, a infecção por HPV pode, em alguns casos, aumentar a expressão de *MYC* sem, necessariamente, agir através da indução do aumento do número de cópias (PETER et al., 2006; MASFERRER et al., 2012; MCDANIEL et al., 2015; BUSSO-LOPES et al., 2015).

A participação do HPV na etiologia de CaPe coloca em discussão a importância da imunização em homens na prevenção, não só de carcinoma de pênis, mas também de minimizar a prevalência de condilomas, verrugas genitais e outras neoplasias relacionadas ao HPV. A vacinação é tida como uma estratégia na diminuição da incidência de CaPe principalmente em locais onde as incidências de HPV e CaPe são altas (FLAHERTY et al., 2014).

A infecção pelo HPV, na maioria dos casos, é eliminada pelo sistema imunológico do hospedeiro. Entretanto, quando essa eliminação não ocorre e a infecção passa a ser persistente pode desenvolver um quadro de inflamação crônica devido as lesões e ao estímulo constante do vírus no local. Em células neoplásicas de cérvix, os oncogenes virais tem a capacidade de ativar a via ciclooxigenase 2 (COX2) / prostaglandinas e demais vias inflamatórias. Tendo assim, um potencial carcinogênico devido a constante liberação de quimosinas, citocinas e fatores de crescimento celular somados a superexpressão das oncoproteínas virais E6 e E7 (FERNANDES et al, 2015).

2.4. Inflamação crônica em câncer peniano

A inflamação trata-se de uma resposta natural do sistema imune à estímulos externos ou internos, infecções ou injúrias teciduais. Entretanto, se essa resposta não cessar naturalmente, passando a se tornar crônico, torna-se um evento danoso à homeostase do organismo e pode levar a uma série de doenças (RICCIOTTI; FITSGERALD, 2011; VENDRAMINI-COSTA; CARVALHO et al., 2012; HA-NA et al. 2013; FERNANDES et al., 2015), entre elas o câncer (AOKI; NARUMIYA, 2012; VENDRAMINI-COSTA; CARVALHO et al., 2012; HA-NA et al. 2013; FERNANDES et al., 2015).

Na inflamação há a infiltração de leucócitos, como macrófagos associados a tumores (TAM), células dendríticas, células Natural Killers (NK), mastócitos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos. Mediadores citotóxicos são produzidos por essas células, tais como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS e RNS), fator de necrose tumoral alfa (TNF α), interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8). Enzimas como ciclooxigenase-2 (COX-2) também são produzidas e podem ativar fatores de transcrição como fator nuclear κ B (NF- κ B) (VENDRAMINI-COSTA; CARVALHO, 2012; FERNANDES et al., 2015).

A liberação e presença constante de espécies reativas de oxigênio ou de nitrogênio, na inflamação crônica, podem causar danos no material genético em células do próprio organismo, o que é acentuado pelos contínuos sinais de expansão e remodelamento tecidual. Com a cronicidade destes eventos, cria-se um microambiente com sucessivos danos no DNA, levando a instabilidade genômica,

desregulação epigenética, alterações nas sinalizações intracelulares, perda da arquitetura tecidual ou seja, cria-se um ambiente extremamente favorável a uma tumorigênese e progressão (VENDRAMINI-COSTA; CARVALHO, 2012; HA-NA et al. 2013; FERNANDES et al., 2015). O tumor, por si só, estimula o surgimento de um processo inflamatório, pois células neoplásicas podem recrutar células inflamatórias para o sítio tumoral (Figura 5) (VENDRAMINI-COSTA; CARVALHO, 2012; GASTARDELO et al., 2014; CRUSZ; BALKWILL, 2015).

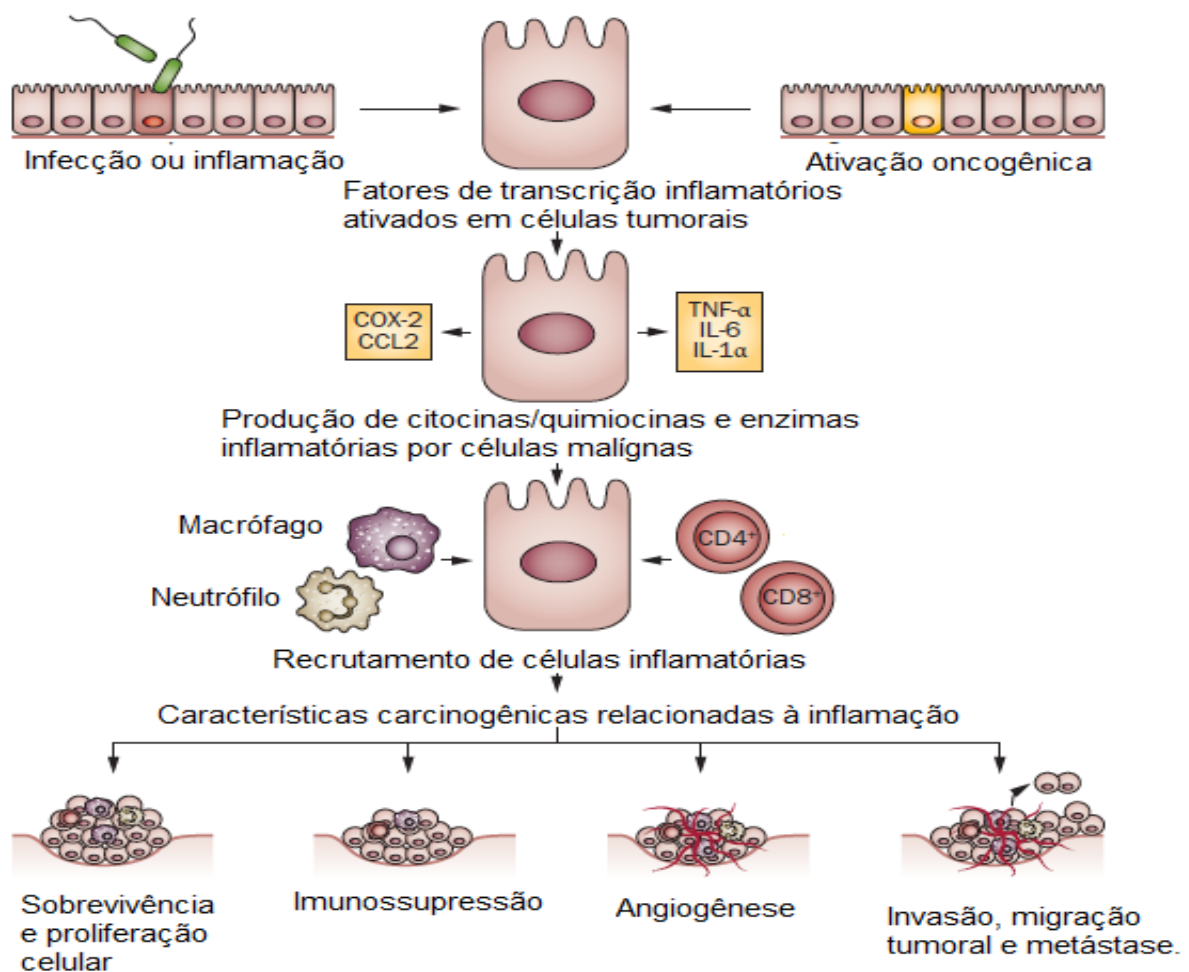


Figura 5: Base molecular da carcinogênese relacionada à inflamação. A inflamação ou ativação oncogênica resultam da expressão de fatores proinflamatórios dentro de células tumorais como Fator nuclear- κ B (NF- κ B) e STAT3, os quais ativam citocinas e quimiocinas essenciais como Fator de Necrose Tumoral- α (TNF α) e Interleucina 6 (IL6), assim como, enzimas inflamatórias como COX2, formando uma

rede complexa de respostas inflamatórias e fornecendo um microambiente tumoral favorável. Imagem adaptada de Crusz e Balkwill (2015).

A presença de infiltrado inflamatório no tecido tumoral pode estar relacionada com um pior prognóstico de câncer peniano, sugerindo-se rastreio no exame patológico de infiltrados inflamatórios na peça tumoral (VASSALLO et al., 2015). A inflamação crônica é tida como um fator de risco na carcinogênese de diversos cânceres (Quadro 4), principalmente aos epidermais (TANG; WANG, 2016).

Quadro 4: Exemplos de estudos que associam a inflamação e o tipo de câncer.

TIPO DE CÂNCER	REFERÊNCIAS
Laringe	Gastardelo et al., 2014.
Pênis	De Paula et al., 2011; Chaux e Cubilla, 2012; Calmon et al., 2013.
Gástrico (H. pilory)	Oshima et al., 2011.
Boca	Kekatpure et al., 2015.
Pulmão	Dougan et al., 2011.
Vulva	Carlson et al., 2013.
Cólon	Yang et al., 2016.
Colorretal	Crusz; Balkwill, 2015.

A condição de fimose pode induzir a frequentes casos de inflamação e doenças inflamatórias na glândula do pênis (SHAH et al., 2015; MORRIS; KRIEGER, 2017). A circuncisão neonatal exerce um efeito protetor contra o desenvolvimento de carcinoma peniano (LARKE et al., 2011), provavelmente devido a inibição de quadros de inflamações crônicas. Observa-se que a circuncisão tardia promove um prognóstico mais favorável para pacientes com CaPe em relação aos não circuncidados. Entretanto, a retirada do prepúcio na fase adulta não oferece o mesmo efeito protetor oriundo da circuncisão neonatal (KOIFMAN et al., 2011; MORRIS et al., 2011; MORRIS; KRIEGER, 2017; SONPAVDE et al., 2013). A maioria dos pacientes com carcinoma peniano são homens não circuncidados (FERRÁNDIZ-PULIDO et al., 2012).

A presença de fimose é considerada um fator de risco no câncer peniano, o que deve-se a possibilidade de formação de um quadro de inflamação crônica gerada pelo acúmulo de esmegma e por prejudicar uma inadequada higienização na região afetada, levando assim a um microambiente propício a tumorigênese, alimentado pela inflamação. Esta ação pode ser a explicação do efeito protetor da circuncisão em relação ao desenvolvimento de câncer de pênis, já que a exposição da glândula permite a detecção precoce de lesões e elimina fatores de inflamação crônica no local (MORRIS et al., 2011; KOIFMAN et al., 2011; FERRÁNDIZ-PULIDO et al., 2012; CHAUX, et al., 2013a; SONPAVDE et al., 2013; SHAH et al., 2015; MORRIS; KRIEGER, 2017).

Muitos dos fatores de risco do câncer peniano têm o processo inflamatório como sua principal característica patológica, além da fimose, como o líquen escleroso (LS) e sua forma mais avançada, balanite xerótica obliterante (FERRÁNDIZ-PULIDO, et al, 2012; CARLSON et al. 2013; SONPAVDE et al., 2013; D'HAUWERS et al., 2012; SHAH et al., 2015; CHAUX; CUBILLA, 2012.; CHRISTODOULIDOU et al., 2015; MORRIS et al., 2011, MORRIS; KRIEGER, 2017) e até mesmo o fumo (HUANG; CHEN, 2011).

A transformação maligna a partir de um quadro de LS para um sarcoma de células escamosas (SSC) pode ser mediada por COX2 e EGF. Sugere-se mais estudos testando o COX2 e EGF como marcadores de angiogênese e na identificação de casos de LS com potencial para malignidade, assim como, o uso de inibidores de COX2 em pacientes com LS, a fim de evitar um possível desenvolvimento de pSCC. Em adição, observou-se que o supressor tumoral p16 também é superexpresso tanto em SSC de vulva quanto de pênis, porém, não está relacionado com o LS e sim com a presença do vírus do HPV (CARLSON et al., 2013), mesmo este último não apresentando qualquer ligação com o líquen escleroso (D'HAUWERS et al. 2012).

2.5. Câncer peniano e a via COX2, PGE2 e EGFR

As citocinas (TNF α , algumas interleucinas como IL-1 β , IL-6, IL-17, TGF β), fatores de transcrição (NFK β) e eicosanoides (mediadores inflamatórios lipídicos sintetizados a partir de ácido araquidônico) são exemplos de mediadores envolvidos no câncer e na inflamação. Estes últimos são produtos derivados da membrana

fosfolipídica e estão envolvidos, na sua grande maioria, no controle de muitos processos fisiológicos, inclusive como peças-chave na inflamação (FERNANDES et al., 2015; CRUSZ; BALKWILL, 2015).

Os derivados de eicosanoides tem como precursor o eicosanoide ácido araquidônico (AA), um ácido graxo insaturado encontrado esterificado em fosfolipídios. Durante uma resposta inflamatória, o AA é catalisado e passa por transformações enzimáticas. Destas enzimas, há a COX, a qual é encontrada principalmente nas duas isoformas COX1 e COX2, sendo a primeira constitutiva em vários tecidos e responsável por outras funções fisiológicas (RICCIOTTI; FITSGERALD, 2011; VENDRAMINI-COSTA; CARVALHO, 2012; AOKI; NARUMIYA, 2012), como protetor do tecido epitelial gástrico (DUBOIS et al., 1998). Após o AA ser metabolizado sequencialmente por COX2 e em seguida por outras enzimas como as mPGES (síntese microsomal de PGE), forma-se uma das principais moléculas derivadas de eicosanoides, as prostaglandinas (PG), e, dentre elas o PGE₂, uma isoforma de prostaglandina responsável pelos processos que levam aos clássicos sintomas da inflamação como vermelhidão (pela angiogênese) e edema (Figura 6) (RICCIOTTI; FITSGERALD, 2011; VENDRAMINI-COSTA; CARVALHO, 2012; AOKI; NARUMIYA, 2012; HA-NA et al. 2013).

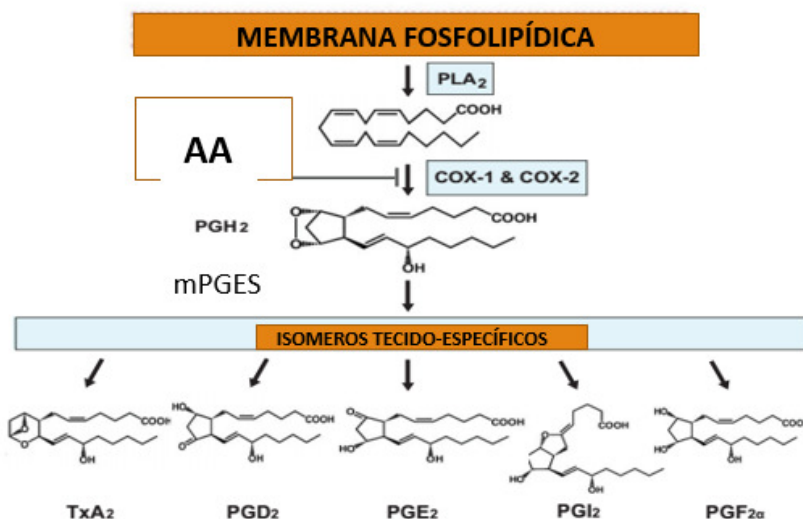


Figura 6: Cascata da via das prostaglandinas. Imagem adaptada de RICCIOTTI e FITZGERALD (2011).

A via da enzima COX2 e PGE2 tem conhecida participação na tumorigênese e progressão tumoral devido ao seu papel central no processo de inflamação crônica em diversos cânceres destacando-se os do tipo SCC, como de boca (KEKATPURE et al., 2015), cólon (CASTELLONE et al, 2005), cérvix (KIM et al., 2002), de pênis (GOLIJANIN et al, 2004; DE PAULA et al 2011; CARLSON et al 2013), orofaringe (CHANG et al, 2004) e em cânceres relacionados ao fumo (HUANG; CHEN, 2011). Esta via, possui a capacidade de ativar outros genes, como os fatores de crescimento endoteliais (EGF), seus receptores (EGFR) e os fatores de crescimento vasculares (VEGF), os quais, conferem algumas características do processo inflamatório como aumento da vascularização, renovação e remodelamento tecidual. Essa interação é vista também na carcinogênese e progressão tumoral (DANNENBRG et al, 2005; Donnini et al 2007; DE PAULA et al, 2011; VENDRAMINI-COSTA; CARVALHO, 2012; DONNINI et al, 2012).

Há também o sentido inverso da ativação, onde a via EGF (Fator de Crescimento Epidermal) / EGFR ativam e aumentam a regulação de mPGES1, via EGR1, o que, por consequência, aumenta a expressão de PGE2 em células epiteliais. EGF ativa o receptor EGFR o qual leva a expressão de EGR1, e este, somente em células que são ativadas por EGR1, vai agir como um fator de transcrição se ligando ao promotor de mPGES1, o qual por sua vez, aumenta a síntese de PGE2. O aumento de mPGES1/PGE2 estão envolvidos na malignidade em células epiteliais induzidos por EGF e no ganho de propriedades tumorigênicas como invasão, habilidade de formar metástases e crescimento tumoral (DONNINI et al, 2012).

Tendo como base o conhecimento do favorecimento por parte da inflamação crônica ao surgimento e progressão tumoral por meio do fornecimento de angiogênese, crescimento tecidual e contínuos danos ao DNA, há sugestões para novas terapias antitumorais ou de prevenção tumoral com inibidores de inflamação ou com terapias que tenham como alvo genes e proteínas inflamatórias (DANNENBRG et al, 2005; CRUSZ; BALKWILL, 2015). Como exemplo, o uso da proteína antiinflamatória ANXA1 em SCC de laringe (GASTARDELO et al, 2014); uso de inibidor de COX-2, Sinomenine (SIN) em SCC de cólon sendo uma alternativa para terapias antitumorais menos citotóxicas (YANG et al. 2016); uso de mecanismos de bloqueio da via mPGES1 em carcinomas epidermóides (DONNINI et al, 2012) e o uso

de inibição simultânea de COX2 e EGFR/VEGFR em SCC colorretal (VALVERDE et al, 2015). A resolução de inflamação pode agir não apenas remediando, mas também como uma medida quimiopreventiva, sendo reconhecida como uma nova estratégia contra formação de tumores (HA-NA et al., 2013).

O receptor EGFR, em especial, também é associado ao CaPe de forma independente da via inflamatória. A proteína deste receptor é frequentemente encontrada superexpressa em carcinomas penianos, sendo, por si só, uma opção válida para estudos de terapias alternativas para esses carcinomas (GOU et al., 2013; CHAUX et al. 2013b) e para prognósticos de recorrência (LORENZO et al, 2013). Entretanto, poucos são os estudos que focam na sua expressão gênica conjuntamente a expressão de genes da via COX2/PGE2 nas mesmas amostras tumorais.

O conhecimento sobre a base genética dessa doença ainda é bastante limitado e, os atuais métodos de diagnóstico, prognóstico e terapia direcionada ainda são insuficientes para evitar que os tumores dos pacientes, quando atendidos nos hospitais em estudo, estejam evoluídos de tal forma que, a penectomia torna-se a principal forma de tratamento imediata indicada (DE PAULA et al. 2011; GAO et al. 2016). Quando descoberto no início o tratamento se resume na retirada da lesão preservando o órgão, causando menores transtornos psicológicos e na qualidade de vida dos pacientes em relação a penectomia (KIEFFER et al, 2014).

Assim, é fundamental a realização de estudos que visem identificar alterações genéticas presentes no tumor peniano e relacioná-las aos dados clínicos dos pacientes, tais como tipo histológico, tamanho do tumor, grau de estadiamento e evolução clínica. Esses dados sustentam a busca por marcadores diagnósticos precoces, prognósticos e novas moléculas para tratamento terapêutico.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Determinar o perfil de expressão dos genes *MYC*, *TP53*, *Rb*, *COX2*, *EGFR* e de *PGE2* em câncer de pênis, correlacionando as alterações observadas com a presença de HPV e com os parâmetros clínico-histopatológicos dos pacientes.

3.2. Específicos

- Descrever o perfil clínico-histopatológico dos pacientes com câncer peniano;
- Identificar a presença de infecção por HPV;
- Genotipar os subtipos de HPV;
- Identificar alterações na expressão de genes envolvidos na carcinogênese mediada por infecção viral: *MYC*, *Tp53*, *Rb* e na via inflamatória: *COX2* e *EGFR*;
- Identificar alterações na expressão das proteínas *MYC*, *Tp53*, *EGFR*, *COX2* e *PGE2*.
- Correlacionar os achados moleculares com os dados clínico-histopatológicos, bem como com a presença de HPV.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. Casuística

Estudo experimental realizado com tamanho amostral de conveniência de 55 pacientes com câncer de pênis. No período de 2015 a 2017, as amostras pareadas (tecidos tumorais frescos e adjacentes com distância de 2cm) foram coletadas de pacientes adultos após procedimento cirúrgico em dois hospitais de referência em São Luís, Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Belo e o Hospital Universitário Presidente Dutra da Universidade Federal do Maranhão. Amostras parafinadas dos mesmos pacientes também foram coletadas no setor de patologia de ambos os hospitais. As coletas foram realizadas após a aprovação no CEPUFMA e participaram apenas os pacientes que assinaram TCLE (ANEXO A).

4.2. Aspectos éticos

Este projeto está vinculado ao projeto guarda-chuva “ANÁLISE DE ALTERAÇÕES GENÔMICAS E NA EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA EM CÂNCER PENIANO”, o qual foi aprovado pelo Comitê de ética em Pesquisa-CAAE: 46371515.5.0000.5087 (Anexo B) obedecendo a Resolução CNS 466/12 e suas normas complementares do Conselho Nacional de Saúde/MS.

4.3. Critérios de inclusão

Pacientes com diagnóstico clínico e anatomopatológico de câncer de pênis, sem tratamento prévio, atendidos nos Ambulatórios de Urologia do HU-UFMA e do IMOAB.

4.4. Critérios de não inclusão

Pacientes que, não se enquadram nos critérios acima ou os que, no seu prontuário, apresentam dados incompletos que dificultem o levantamento de dados demográficos, clínicos e/ou laboratoriais, assim como, ausência de material adequado disponível para a realização das técnicas.

4.5. Armazenamento das amostras

Os materiais frescos coletados nas cirurgias destinados a extração de DNA foram armazenados em freezer -20°C imersos em TLN (Tampão de Lise Nuclear). Os

tecidos destinados a extração de RNA foram armazenados imersos em *RNA/ater* em ultra freezer -80°C. O material parafinado foi armazenado em temperatura ambiente.

A coleta de dados clínico-histopatológicos foi realizada em dois momentos, antes e depois da cirurgia. Antes da cirurgia essa coleta se deu através de uma entrevista com paciente (posteriormente à leitura e ao consentimento do TCLE) para obtenção de dados sócio epidemiológicos e fatores de risco. O segundo momento se deu pela coleta das informações oriundas dos laudos histopatológicos mantidos nos hospitais e liberados pelos urologistas responsáveis pelos pacientes operados.

4.6. Extração de DNA de tecido fresco

Foi realizada extração de DNA por fenolclorofórmio e precipitação com etanol a partir de 100mg de tecido de todos os tumores frescos e tecidos adjacentes coletados (n=55) (Quadro 5). As amostras extraídas foram armazenadas em freezer -20° C. A leitura da concentração de DNA foi realizada utilizando-se o espectrofotômetro e somente foram consideradas para as análises moleculares, as amostras que apresentarem razão A260nm/A280nm com valor entre 1,8 e 2,0.

Quadro 5: Protocolo de extração de DNA com fenolclorofórmio

ETAPAS DA EXTRAÇÃO DE DNA	
1) Em um tubo com tampa de 1,5 mL foram feitas as etapas:	c) Transferência do sobrenadante, com as mesmas indicações para preservação do anel de proteínas, para um novo tubo;
a) Adição de 40 µL de SDS10% e imersão no banho-maria a 37°C por 30 minutos; b) Adição de 40 µL de protease K 20mg/ml e banho-maria a 55°C por 12 horas; c) Retirada do banho-maria e aplicação de 20 µL de RNase, homogeneização e banho-maria a 37°C por 30 minutos; d) Retirada do banho-maria e acréscimo de 500 µL de fenol/clorofórmio/ álcool isoamílico (25:24:1). Inversão lenta do tubo por 10 vezes; e) Centrifugação dos microtubos em 12000 rpm à 4°C por 15 minutos; f) Sucção do líquido sobrenadante, preservando o anel de proteínas no meio das duas fases e transferência do sobrenadante para um novo tubo;	3) No novo tubo de 1,5mL foram realizadas as etapas: a) Acréscimo de 200 µL de Acetato de sódio 3M e complementação do volume com isopropanol gelado; b) Armazenamento das amostras em freezer a -20°C por, pelo menos, 12 horas; c) Retirada do freezer e centrifugação em 12000 rpm à 4°C por 15 minutos; d) Descarte do sobrenadante; e) Adição de 500 µL de etanol 70% gelado;
2) No novo tubo de 1,5 ml foram realizadas as etapas de: a) Adição de 500 µL de clorofórmio/álcool isoamílico e após, inversão lenta do tubo por 10 vezes; b) Centrifugação a 12000 rpm à 4°C por 15 minutos;	f) Centrifugação a 12000 rpm à 4°C por 15 minutos; g) Descarte do etanol e secagem do tubo em temperatura ambiente; h) Acréscimo de 25 ou 50 µL de TE dependendo do tamanho do pellet;

4.7. Detecção e genotipagem de HPV

A detecção e genotipagem do DNA viral nas amostras foram efetuadas por duas técnicas distintas, Nested PCR e sequenciamento, com a finalidade de minimizar falsos negativos.

4.7.1. Nested PCR

Na primeira etapa da Nested-PCR foram utilizados nove novos iniciadores degenerados (5 MY09A-D e 5 MY11-1-5) modificados para cobrir todas as sequências de genótipos de 40 tipos de HPV. Como controle interno positivo, o gene constitutivo da β -globina (BG) foi utilizado. O protocolo utilizado para a primeira etapa da Nested PCR está apresentado no Quadro 6.

Quadro 6. Protocolo de reação e ciclagem da primeira etapa da Nested PCR.

PREPARO DA REAÇÃO		CONDIÇÕES DE CICLAGEM		
Reagentes	Concentração	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (Minuto)
BGA2	2 pmol	40	94	1
BGS1	2 pmol		50	1
Primer MY11	7,5 a 22,5 pmol		72	2
Primer MY09	7,5 a 22,5 pmol	1	72	
Taq Polimerase	1,5 U			
DNTP	200 μ M			
MgCl ₂	1,5 mM			
Tris-HCl (pH 8,3)	10 mM			
KCl	50 mM			
DNA	200ng/ μ L			
Volume final	30 μL			

Para a segunda reação, 40 iniciadores específicos, referentes a 40 tipos de HPV mais associados a tumores cervicais, foram marcados com fluoróforos, misturados e preparados para serem submetidos a PCR multiplex. O protocolo de genotipagem foi desenvolvido pelo laboratório BioGenetics Molecular Technologies, Uberlândia, MG, Brasil, e está sob patente (número de processo BR 10 2017 004615 0) de modo que

os primers não serão detalhados aqui. Como controle da segunda reação, foi utilizado primers BGA2 com iniciadores BGS3 para o gene constitutivo da β -globina. Para a amplificação nesta etapa foi seguido o protocolo do Quadro 7.

Quadro 7. Protocolo seguido para a 2ª etapa da Nested PCR

PREPARO DA REAÇÃO		CONDIÇÕES DE CICLAGEM		
Reagentes	Concentração 1X	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (Minuto)
BGA2	0,2 pmol	36	95	2
BGS1	0,2 pmol		56	1
Primer específico HPV	0,5 pmol		72	0,66
Primer específico HPV	0,5 pmol	1	72	5
Taq Polimerase	1,0			
DNTP	200 Um			
MgCl ₂	1,5 Mm			
Tris-HCl (pH8,3)	10 Mm			
KCl	50 Mm			
Produto da 1ªPCR	ng/ uL			
Volume final	15 UI			

O produto amplificado foi diluído 200 vezes e deste, 1 μ L submetido à eletroforese capilar com um filtro de pico no software para Fragment Profiler com as sondas marcadas com fluoresceína para a leitura das amplificações. Os resultados foram tidos como positivos quando um ou mais fragmentos de 74 a 338 pb foram gradados. Os casos onde apenas o gene da β -globina foi amplificado foram considerados negativos.

4.7.2. Sequenciamento

O sequenciamento automático do HPV foi realizado com o kit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) seguindo o protocolo sugerido pelo

fabricante. Após a montagem dos reagentes a solução final foi submetida a uma reação de PCR com um ciclo de 5 minutos a 94°C seguido a 45 ciclos de 45 segundos a 94°C, 1 minuto a 60°C e 1 minuto a 72°C finalizando com resfriamento das amostras a 15°C.

Para a precipitação do DNA amplificado se utilizou 750µL de Solução Sephadex e 5ul do DNA em um tubo de eppendorf com coluna. Os tubos foram centrifugados a 4.400 rpm por 4 minutos. Posteriormente a coluna foi descartada e ao precipitado se adicionou 10ul de formamida. A solução resultante foi inserida na placa de sequenciamento.

A reação foi realizada no equipamento de sequenciamento automático ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) e a análise foi realizada pelo software MEGA 6.0. As sequências, após análise, foram comparadas com as do banco de dados do GeneBank/NCBI, utilizando-se o Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.8. Extração de RNA de tecido parafinado

A extração de RNA foi realizada de 37 amostras a partir de 3 fitas de 10 µm de tecido tumoral parafinado. A região tecidual da qual a extração ocorreu, foi previamente selecionada e demarcada por um patologista com a região que apresentasse mais de 70% de células tumorais por lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina (HE). As moléculas de RNA foram extraídas com o kit Ambion™ da empresa Life Technologies™ de acordo com o protocolo sugerido pela mesma. Antes da utilização do kit os tecidos foram primeiramente desparafinizados (Quadro 8) e somente então se iniciou o procedimento de extração. Após extraídas, as amostras foram quantificadas e armazenadas em temperatura de -80°C.

Quadro 8: Protocolo de desparafinização

ETAPAS DE DESPARAFINIZAÇÃO DE TECIDO TUMORAL	
1) Em um tubo de 1.5ml, livre de RNase, foi inserido 3 folhas de 3 micras cada de tecido parafinado e adicionado 1ml de Xilol 100%;	6) Com o tubo livre de Xilol, foi adicionado 1ml de Etanol 100% e levado ao vórtex por 20 segundos;
2) O tubo foi colocado no vórtex por 20 segundos e incubado a 50°C por 5 minutos;	7) O tubo foi centrifugado a 14000 rpm por 2 minutos;
3) Centrifugou-se o tubo a 14000 rpm por 2 minutos;	8) O álcool foi aspirado do tubo e descartado;
4) O xilol do tubo foi aspirado e descartado;	9) As etapas 6-8 foram repetidas por 3 vezes;
5) Repetição das etapas 1-4 por mais 3 vezes;	10) Após a retirada e completa secagem do álcool do tubo, o tecido foi armazenado a -80°C.

4.9. Transcrição reversa para obtenção de cDNA

A transcrição reversa para a conversão do RNA para cDNA das 37 amostras foi realizada utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit™ da empresa ThermoFisher™ (Quadro 9). O cDNA obtido foi diluído 1:5 com água ultrapura e armazenado em temperatura média de 4°C.

Quadro 9: Protocolo e ciclagem utilizados na reação de transcrição reversa

PREPARO DA REAÇÃO		CONDIÇÕES DE CICLAGEM		
Reagentes	Volume 1X	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (Minuto)
100mM dNTPs	0.5 µL	1	25	10
MultiScribe Reverse Transcripts, 50U/ µl	0,75 µL	1	37	120
10X Reverse Transcription Buffer	1,25 µL	1	85	5
Randon Primer	1,25 µL	1	60	4
RNA	0,5 µg			
Nuclease Free Water	Ajustar o volume final para 25 µL			
Volume Final	25 µL			

4.10. PCR em tempo real para estudo de expressão gênica

As análises de expressão relativa dos genes *EGFR*, *COX2*, *RB*, *TP53* e *MYC* foram realizadas nas 37 amostras utilizando-se o kit Taqman Universal PCR Mix II (2X) no UNG (fluorocromo FAM) da empresa ThermoFisher™ seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante (Quadro 10). Os primers com as sondas foram adquiridos pela empresa Applied Biosystems™, o produto, TaqMan® Gene Expression Assays, possui sondas com fluorocromos Applied Biosystems™ FAM™ ou VIC™ nas extremidades 5' e quencher não fluorescente (NFQ) na extremidade 3'. O gene GAPDH também foi utilizado, porém, como gene referência da reação.

Quadro 10: Protocolo utilizado na PCR quantitativa para os genes *COX2*, *EGFR*, *TP53*, *RB* e *MYC*.

PREPARO DA REAÇÃO		CONDIÇÕES DE CICLAGEM		
Reagentes	Volume 1X	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (Minuto)
Sonda Taqman	0.50 µL	1	50	2
Taqman Universal PCR Master Mix II (2X) no UNG	5.00 µL	1	95	10
Água livre de nuclease	2.5 µL	40	95	0,25
cDNA	2 µl		60	1
Volume final	10 µl			

Para a amplificação, utilizou-se o cDNA obtido das amostras tumorais parafinadas dos pacientes, e como controle experimental, utilizou-se um *pool* amostral de cDNAs oriundos de tecidos normais de mama. A amplificação do DNA ocorreu no aparelho de PCR em tempo Real ABI 7500 Fast da empresa AppliedBiosystems™. A leitura da corrida foi realizada pelo software da mesma empresa Software 7500 fast v.1.0.5 (ThermoFisher®). As expressões relativas para cada paciente foram determinadas pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Consideraram-se superexpressas as amostras que possuíam o valor do *Fold Change* duas vezes maior ou igual ao valor das amostras normais. O inverso foi adotado para as amostras consideradas subexpressas, ou seja, as que possuíam igual ou duas vezes menor valor do *Fold Change* em relação ao normal (PETER et al., 2006).

4.11. Imunohistoquímica para estudo de expressão proteica e análise histopatológica

4.11.1. Técnica de Microarranjo Tecidual (TMA)

Foram construídos cinco TMAs (tissue microarrays), cada qual contendo cerca de 10 amostras de carcinoma de pênis, totalizando 42 tumores. Os microarranjos foram construídos a partir de tecidos tumorais corados com hematoxilina e eosina. As seções mais representativas do tumor foram puncionadas dos blocos de origem com 4µm de espessura e inseridas em um novo bloco de parafina.

A inclusão dos tecidos selecionados se deu através de punções de 4 µm de espessura no bloco parafinado na região correspondente a demarcação. O tecido puncionado foi transferido para um outro bloco de parafina com furos de 4 µm já feitos e preenchendo-os. Este procedimento foi repetido para cada amostra até a montagem de um bloco de TMA. Cada bloco de montado era integrado por 9 casos como demonstrados na Figura 7.



Figura 7: Microarranjo tecidual (TMA).

4.11.2. Ensaio de imunohistoquímica

Os ensaios de imunohistoquímica foram realizados para as 42 amostras (N=42) com secções histológicas de 3 µm de espessura dos blocos montados de TMA. As fitas foram dispostas em lâminas sinalizadas. Os anticorpos monoclonais anti-EGFR, anti-PGE2, anti-COX2 anti-MYC, anti-RB e anti-P53 foram adquiridos pela empresa Spring Bioscience (Pleasanton, CA, USA). Para o ensaio as lâminas passaram pelas etapas conforme o protocolo do Quadro 11.

Quadro 11. Protocolo seguido nos ensaios de imunohistoquímica

ETAPAS SEGUIDAS PARA O ENSAIO DE IMUNOHISTOQUÍMICA	
1) Inclusão das lâminas em estufa a 65°C por 1 hora;	5) Bloqueio de proteínas e enzimas endógenas com aplicação de Bloqueador de Proteína A (Kit EasyPath) e permanência por 10 minutos em câmara úmida;
2) Em seguida, desparafinização com imersões em xilol 100% e desidratadas com banhos em álcool 100%. Por fim, lavagem em água corrente por 5 minutos;	6) Aplicação de anticorpo primário diluído em PBS-Tween 20/BSA 1%. Incubação por 90 minutos seguida de lavagem com PBS-Tween 20 pH 7,4
3) Bloqueio da enzima endógena peroxidase com H ₂ O ₂ a 3% por 10 minutos. Em seguida, lavagem com água destilada;	7) As reações foram reveladas incubando-se por 5 minutos com cromógeno 3,3' Diaminobenzidina (DAB, Sigma, St Louis, MO, USA, D5637-1G). Após o tempo, as lâminas foram lavadas com água corrente.
4) Recuperação antigênica com EDTA pH 8,0 a 90°-100°C por 40 minutos. Após o resfriamento, as lâminas foram lavadas com solução de PBS- Tween 20 pH 7,4;	8) Contra coloração com Hematoxilina seguida de desidratação dos cortes com imersões em álcool 100% e xilol 100%.

4.12. Estatística

Para verificar possíveis associações entre as variáveis categóricas foi utilizado o teste QUI-quadrado somente quando as frequências observadas foram maiores que 5, caso contrário, utilizou-se o teste Exato de Fisher. As análises de associação entre

expressão de proteínas (imunohistoquímica) foram feitas em um grupo amostral de 44 pacientes. Para as associações entre os dados entre expressão gênica e outras variáveis foi considerado um N =37 (qRT-PCR). Para as variáveis numéricas como idade e tamanho tumoral o teste regressão Linear foi utilizado. O valor de significância utilizado foi $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico STATA®.

5. RESULTADOS

5.1. Capítulo I: Artigo I: Down-regulated expression of the HPV-associated genes (TP53, RB and C-MYC), and up-regulated expression of inflammatory pathway markers (COX-2, PGE2 and EGFR) in penile squamous cell carcinomas

Artigo submetido na revista: The Journal of Urology

Qualis Medicina I: A1

Fator de impacto: 5.157

Down-regulated expression of the HPV-associated genes (*TP53*, *RB* and *C-MYC*), and up-regulated expression of inflammatory pathway markers (*COX-2*, *PGE2* and *EGFR*) in penile squamous cell carcinomas

Juliana M. Macedo, Marta R. C. Belfort, Antônio A. L. Teixeira Júnior, Elis V. L. Silva, Leudivan R. Nogueira, José Calixto, Ronald W. P. Coelho, Jaqueline D. Pinho, Luciane R. Cavalli, Gyl E. B. Silva and Silma R. F. Pereira.

From Laboratório de Genética e Biologia Molecular, Department of Biology (SRFP, JMM, MRCB, AALTJ), Pathology (GEBS) and Medicine II (EVLS, JC), Pós-graduação em Ciências da Saúde (JMM, MRCB), Universidade Federal do Maranhão and Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Belo (LRN, RWPC) São Luis, MA, Brazil and Department of Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Pará (JDP), and Department of Oncology, Georgetown Lombardi Comprehensive Cancer Center Washington, DC (LRC).

* Correspondence: Department of Biology, Federal University of Maranhão, av. dos Portugueses, 1966 Bacanga, CEP: 65065-545, São Luis, Brazil (email: silmaregina@yahoo.com.br).

Purpose: Infection by high risk human papillomavirus (HPV) and chronic inflammation are the main risk factors for the development of penile cancer (PeCa). The main goal of our study was to determine whether selected HPV (*TP53*, *RB* and *MYC*) and inflammatory associated proteins (*COX2*, *EGFR* and *PGE2*) present alterations in their expression levels in a PeCa patient cohort from the State of Maranhão, Brazil. We also aimed to determined whether these expression alterations were associated with HPV infection and with clinical and histopathological parameters from the patients.

Material and Methods: HPV genotyping was performed in 55 PeCa patients studied, by nested-PCR and direct sequencing in both the tumor and non-tumor adjacent areas. Gene expression analysis of *the COX-2*, *EGFR*, *MYC*, *RB* and *P53* were determined by qRT-PCR and immunohistochemistry (IHC) and of the *PEG2* by IHC.

Results: HPV infection was observed with high frequency (94%) in the patients of this study and phimosis, a risk factor for chronic inflammation was observed in 67% of the patients. The most common types of HPV observed were the high-risk types 16 (63% of the patients) and 59 (14%), followed by the intermediate risk type 74 (11.6%) and high risk type 35 (9.3%). No significant association was observed between the presence of HPV infection (simple or multiple) and clinical and histopathological variables from the patients (age, tumor grade, tumor stage, tumor size, phimosis and histological). The HPV associated genes, *TP53*, *RB* and *C-MYC*, were observed with downregulated genic expression in 80.5%, 80.5% and 97% of the patients, respectively. Down-regulation of *TP53* expression was associated with the absence of lymphatic invasion and down-regulation of *C-MYC* with larger tumor size. The inflammatory pathway associated genes, *EGFR* and *COX-2* were observed with up-regulated expression in 84% and 40% of the patients, respectively, as well as the protein *PGE2* (40%). Both gene and protein expression of *COX2* were associated with the expression of *PGE2* and *EGFR*. An association between expression of *MYC* and *COX2* proteins was also observed. No association was observed between the inflammatory associated genes and the clinical and histopathological parameters.

Conclusions: A high frequency of HPV infection and phimosis were observed in the majority of the patients of our study, supporting their roles as risk factors for PeCa. This data emphasizes the importance of HPV immunization for prevention of PeCa, Our data also emphasize the need to expand the vaccine coverage to HPV types present in penile cancer. The expression of the associated HPV and chronic inflammation genes evaluated in this study, were down and up-regulated, respectively, in a higher

frequency of the cases. Further studies should be conducted to determine the molecular mechanisms of these expression alterations, particularly in PeCa patients with HPV positive tumors. These studies could also further support the development of targets therapies based on anti-EGFR and COX2 expression.

Key words: penile cancer; carcinoma squamous cell; human papillomavirus; inflammation, ERBB1

Penile cancer (PeCa) is a rare neoplasm in developed countries; however, its incidence is high in developing countries. In Brazil, the North and Northeast regions, present with the highest incidences worldwide; in the state of Maranhão, in particular, about four penectomies procedures are conducted weekly in patients with advanced PeCa. Despite of this high incidence, studies on PeCa are limited and there is still lack of precise diagnostic methods and/or target therapies, which contributes to elevate mortality rates ¹⁻³

The etiology of PeCa is complex and multivariate due to the influence of socioeconomic, environmental and biological factors; the lack of proper hygiene, phimosis and uncircumcision, in addition to the infection of Human Papillomavirus (HPV) and chronic inflammation have been attributed as main risk factors ^{1,2,4,5}.

The association of HPV infection and carcinogenesis has been described in tumors of the vulva, anogenital, penis and cervix ^{1, 6, 7, 8, 9, 10}. Although the genetic mechanism that underline this association is not completely known, it has been shown that the HPV oncoproteins E6 and E7 can lead to the degradation of proteins with tumor suppressor function, such as TP53 and RB proteins, and also promote the activation of proto-oncogenes, such as C-MYC, by their insertion on fragile sites' locations of the host genome ^{7, 11, 12}.

The chronic inflammatory process has been extensively investigated in association with cancer and in the case of PeCa can be triggered by phimosis, lichen sclerosus, and balanitis process ^{8, 13, 14}. It has been suggested that chronic inflammation propitiates a favorable microenvironment for malignant cell transformation and progression due to the continuous release of reactive species of oxygen and nitrogen, as well as due to the extensive tissue damage and remodeling that is mediated by the immune system cells ^{15, 16}. The Cyclooxygenase 2 (COX2), ProstaglandinE2 (PGE-2) and the epidermal growth factor receptor (*EGFR*) proteins have been reported to play a role in the establishment and maintenance of both acute and chronic inflammatory conditions ^{15, 17, 18, 19, 20}, as well as in the etiology of colorectal, vulva and penile cancer ^{14-18, 21, 22}. The overexpression of these proteins can directly lead to carcinogenesis, through the promotion of angiogenesis, cell survival and proliferation, classical hallmarks of aggressive tumors ^{14, 15, 20-23}.

Considering the scarcity of molecular studies investigating the genetic alterations associated with HPV infections and inflammatory processes on PeCa, the main goal of our study was to determine whether selected HPV (*TP53*, *RB* and *MYC*) and inflammatory associated genes/proteins (*COX2*, *EGFR* and *PGE2*) present alterations in their expression levels in a PeCa patient cohort from the State of Maranhão. We also aimed to determine whether these gene/proteins expression alterations were associated with HPV infection and with histopathological parameters (age, tumor grade, tumor stage, tumor size, phimosis, histological type and subtype) from the patients.

Our results demonstrated that the tumor suppressor genes *Rb* and *TP53* are underexpressed in penile tumors infected by hrHPV. Hence, the study suggests that the TP53 and RB proteins underexpression could occur by other mechanisms beyond degradation mediated by viral oncogenes. We consider the possibility of the virus to exert negative control of these genes' activities. Moreover, overexpression of inflammatory pathway genes was observed, opening the possibility for the use of *EGFR* and *COX2* genes as therapeutic targets for PeCa.

MATERIAL AND METHODS

Patient accrual and sample collection

Fifty-five patients with penile cancer (PeCa) admitted at the Hospital Aldenora Bello, São Luís, Maranhão, Brazil from 2014 to 2017, participated in this study. All the patients signed an informed consent form approved by the Research Ethics Committee on Humans from the Federal University of Maranhão, Brazil (protocol number CAAE: 46371515.5.0000.5087) and their identities were kept anonymous throughout the study. Formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) (n=37) and fresh tissue specimens (n=55) from these patients were obtained prior to any treatment, and used for the gene expression and HPV genotyping analysis, respectively. Paired non-tumor tissue samples, approximately 2cm distant to the tumor, were identified by the pathologist and collected from all patients.

The gene expression analysis was performed in a subset of 37 samples. The clinical and histopathological data from these patients, including age, tumor size, stage and grade, and lymphatic invasion were obtained from medical records. The mean age of the studied patients at diagnosis was 60 ± 18.3 years and the mean of tumor size was 4.11 ± 2.27 cm (ranging from 0.6 to 10 cm). All tumors were of the Squamous Cell Carcinoma (SCC), from which 37,8% were of the Usual subtype, 37,8% of Condylomatous, 18,9% of Mixed, 5,4% of Basaloid, and 2% of *In situ* subtypes. Tumors were classified according to the TNM system as tumor stage 1, 2 and 3 in 8,3%, 44,4% and 47,2% of the patients, respectively. There was lymphatic invasion and phimosis in 34.2% and 57% of the patients, respectively.

HPV Genotyping

The tumors from all the fifty-five patients of this study were genotyped for HPV. Genomic DNA was isolated from the fresh tumor tissue using the phenol-chloroform and ethanol precipitation method¹³. Viral DNA detection and genotyping was performed by nested-PCR and direct sequencing. The nested-PCR was carried out with oligonucleotides and methods established for the detection and typing of human papillomavirus, patented by BioGenetics Molecular Technologies, Uberlândia, MG, Brazil (process number BR 10 2017 004615 0). The PCR reactions were initiated with consensus primer MY09 and nine degenerate primers modified through the MY09/11 primer to cover all sequences of the 40 HPV types classified as high risk (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73 and 82), intermediate risk (MM7, MM8, 26, 30, 34, 53, 54, 55, 61, 62, 64, 67, 69, 70, 71, 72, 74 and 81), and low risk (6, 11, 42, 43, 44 and 57). The β -globin gene was used as positive control. The second reaction was performed using a multiplex with 40 specific primers for the 40 most common HPV subtypes. Cases in which only the β -globin gene was amplified were considered negative.

HPV genotyping was also performed by sequencing analysis, to confirm the nested PCR results and minimize the incidence of false negatives. Automatic sequencing was performed using the Big Dye Terminator v3.1 kit (Applied Biosystems) under the manufacturer's protocol, followed by the ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer sequencer (Applied Biosystems). Data analysis was performed using the software MEGA 6.0. Sequences and the GenBank/NCBI database/Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) for sequencing comparison.

Gene expression analysis

The gene expression analysis was performed in a subset of 37 samples. Prior to RNA isolation, 10 μ m of unstained FFPE tissue sections containing more than 70% of tumor epithelial cells were selected by an experienced pathologist at Presidente Dutra Hospital from Universidade Federal do Maranhão. Samples were deparaffinized and dehydrated using xylene solution and absolute ethanol, respectively. RNA isolations were performed using the Ambion™ kit from Life Technologies™ following manufacturer's protocol. Samples were quantified and cDNA was obtained using the High Capacity

cDNA Reverse Transcription Kit™ from ThermoFisher™ following manufacturer's protocol. Gene expression analysis was performed by Taqman Universal PCR Mix II (2X) no UNG (Fluorochrome FAM) kit from Life Technologies™.

All the probes for the selected genes (*COX2*, *EGFR*, *TP53*, *RB*, *MYC*) and the endogenous gene (*GAPDH*) were acquired from ThermoFisher™. Amplification reactions were conducted in ABI 7500 Fast thermocycler in a total volume of 10 µl, containing 100ng of cDNA and 0.5µl of primer and probe (KIT Taqman® Gene expression assay from Applied Biosystems™) for each gene. PCR conditions included an initial hold step of 50°C for 5 minutes followed by a denaturation step of 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles at 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. All reactions were carried out in triplicate, and a negative control with no DNA template was included in every PCR run. For all the qPCR assays, Ct numbers were established using the Software 7500 fast v.1.0.5 (ThermoFisher®). Fold change was determined by the 2- $\Delta\Delta C_t$ method: two-fold increase or decrease in the relative expression of the selected genes in tumor samples in comparison to the normal control was considered as up- or downregulated, respectively 7.

Immunohistochemistry analysis

Immunohistochemistry analysis was carried out in a subset of 42 samples. Five tissue microarrays (TMAs) were constructed at Laboratory of Immunofluorescence and Electronic Microscopy (Hospital Presidente Dutra, UFMA, Maranhão, Brazil). Each TMA contained 10 penile carcinoma samples. TMA of 4µm sections were evaluated for protein expression using monoclonal antibodies anti-MYC, anti-TP53, anti-COX2, anti-EGFR and anti-PGE2 obtained from Spring Bioscience® (Pleasanton, CA, USA). PGE2 expression was analyzed only by immunohistochemistry once this protein is not a direct gene product¹⁸. Actually, arachidonic acid is transformed into PGE2 via cyclooxygenase (COX) enzymes and terminal prostaglandin E synthases (PGES).

The tissues were deparaffinized and dehydrated using xylene and absolute ethanol solutions. Antigenic recuperation was performed using EDTA (pH 8.0) and Peroxidase Blocker solution (EasyPath®, São Paulo, Brazil) following manufacturer's instructions. PBS-Tween 20/BSA 1% diluted primary specific antibodies were applied for 90 minutes. The polymers from EasyLink One Kit (EasyPath®, São Paulo, Brasil) were added. Blades were washed again and incubated for 5 minutes with chromogene 3,3' diaminobenzidine (DAB, SIGMA, St Louis, MO, USA, d5637-1g) diluted in DAB substrate. Finally, blades were rinsed in running water, counterstained with Hematoxylin and covered with Etelan coverslips. After montage, blades were analyzed by a pathologist physician considering the marking of each antibody according to the literature ²¹.

Statistical Analyses

The association of the gene expression and IHC data with the clinical parameters was performed using bivariate tests, chi-square or Fisher's exact test, when applicable, for the analysis between all the categorical variables (gene and protein expression, tumor grade, HPV infection, HPV genotyping, lymphatic invasion, tumor staging and smoking). The multivariate linear regression test was carried out for numerical variables, such as age and tumor size. The significance level was $P < 0.05$ ^{8, 17, 23}. Statistical tests were carried out in software STATA® version 12.

RESULTS

HPV genotyping: High HPV Frequency in Penile Cancer

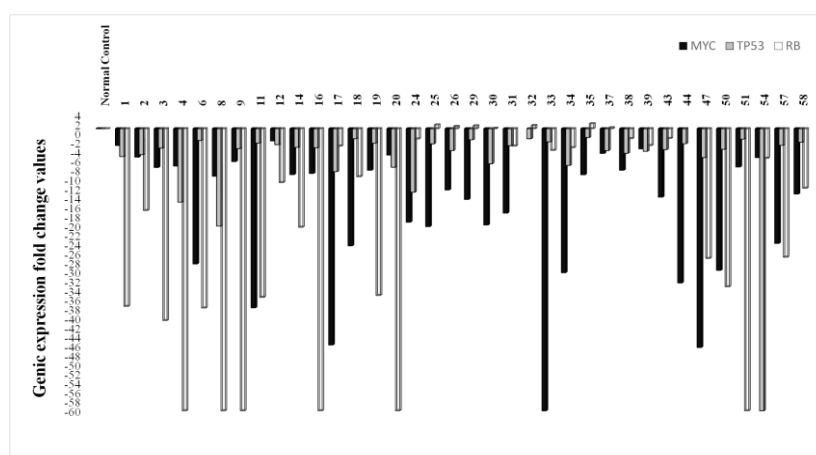
All the PeCa cases of this study were genotyped for HPV. HPV-DNA was detected in 80% (44/55) of the tumor samples. Simple and multiple infections were detected in 37% and 63% of the cases, respectively. From 95% (41/44) of the infected tumors, at least one HPV of a high risk type was detected. The HPV type 16 was the most common, present in 63% (27/43) of the cases, followed by HPV types 59 (14%), 74 (11.6%), 35 (9.3%), 11 (7%) and, 30, 56, 58, 66 in 4.6% of the cases, each. The less frequent HPV types, were types 6, 18, 44, 51, 53 and 73, which were observed in 2.3% of the cases. Among the 11 cases where the tumor was negative for HPV, 8 cases presented with positive results in the adjacent normal tissue. Considering all the positive cases, both in the tumor and in the adjacent non-tumor tissues, 94.6% CaPe patients were infected by HPV. Similar frequencies were observed in the subset for which the gene expression was carried out (N=37), that is, 94.4% presented HPV DNA, from which, 94% had at least one high risk HPV.

There was no significant association between the presence of HPV infection (simple or multiple) and clinical and histopathological variables from the patients (age, tumor grade, tumor stage, tumor size, phimosis and histological subtype). There was no association among the cases with high or low risk HPV type and the clinical-histopathological parameters.

Gene and protein expression analysis – HPV associated genes are downregulated in PeCa

Expression analysis of the *TP53*, *RB* and *C-MYC* genes revealed that in 80.5% of the cases, *TP53* was down-regulated, with an average reduction of 20.37 ± 80.8 ; Similarly, *RB* was down-regulated in 80.5% of the samples, presenting an average reduction of 37.3 ± 45.5 . The proto-oncogene *C-MYC* was down-regulated in the highest number of the cases (97%), with an average expression reduction of 21.72 ± 34.6 (Fig. 1).

Fig. 1. Gene expression levels of *TP53*, *RB* and *C-MYC* genes in the penile carcinoma analyzed by qPCR. The results are shown as relative fold change (FC) compared to normal control.



Association of the gene expression data from these 37 patients with the clinical-pathological parameters, showed that down-regulation of *TP53* was associated with the absence of lymphatic invasion ($p=0.037$). On the other hand, the down-regulation of *C-MYC* was associated with larger tumor size ($p=0.023$). No

significant association was observed between these genes and other clinical-parameters evaluated or for *RB* ($p>0.05$).

mRNA expression from TP53 and C-MYC were confirmed by immunohistochemistry analysis, which showed protein reduction in 81% and 83.3% of the tumors, respectively; Immunohistochemistry data was not available for *RB* and no statistical association was observed among the expression of the HPV and these genes.

As expected, association of the gene expression with the HPV genotyping data was not statistically significant, due to the high frequency of cases positive for HPV infection. Also, as expected, alterations in gene expression of *TP53*, *RB* and *C-MYC* were associated with HPV infection with the high risk type, considering the higher number of patients that were in this category: down-regulation of TP53, RB and C-MYC expression was observed in 85%, 87% and 76% of these cases (Table 1).

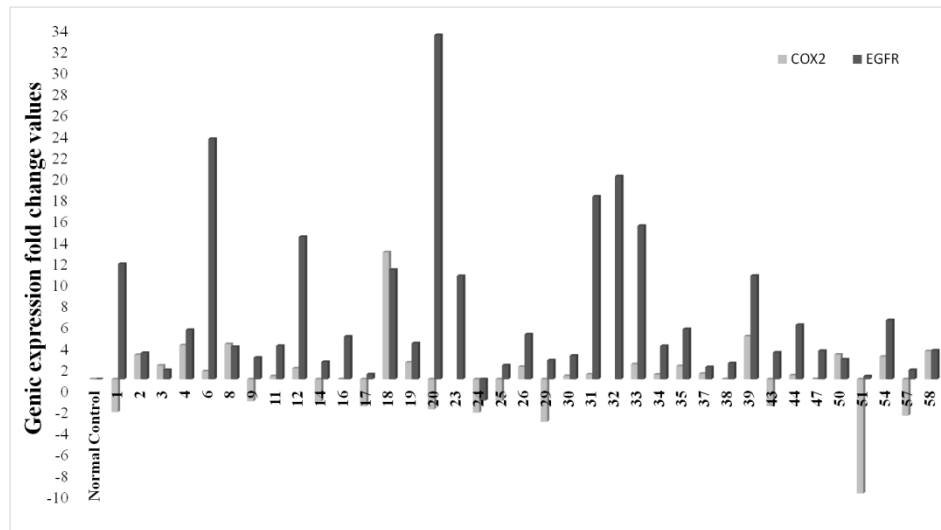
Table 1. Differential *TP53*, *RB* and *MYC* gene expression according to HPV status in penile carcinoma.

Gene Expression	HPV positive		HPV negative	Total samples
	High risk	Low risk		
<i>C-MYC</i>				
Under	30	2	2	34
Normal	1	0	0	1
<i>RB</i>				
Under	26	2	2	30
Normal	6	0	1	7
<i>TP53</i>				
Under	25	2	2	29
Normal	6	0	1	7

Gene and protein expression analysis: Inflammatory pathway associated genes (*EGFR*, *COX-2* and *PGE2*) are upregulated in PeCa

Gene Expression (*COX* and *EGFR*) were performed for 37 PeCa, while protein expression to the same genes and PGE2 were performed for 42 PeCa. The mRNA expression results showed that 84% and 40% of the tumors were up-regulated for *EGFR* and *COX2*, respectively (Fig.2). The immunohistochemistry results revealed overexpression to EGFR (62%) and COX2 and PGE2 (40% each).

Fig.2. Gene expression levels of *COX2* and *EGFR* in penile carcinoma analyzed by qPCR. The results are shown as relative fold change (FC) compared to normal control.



Both gene and protein expressions of COX2 were associated to the PGE2 expression ($p=0.033$ and $p=0.016$, respectively). An association between protein expression of C-MYC and COX2 ($p=0.024$) was also observed. There was association between the overexpression of both genes (*EGFR*, *COX2*), and their protein expression ($p=0.045$ and $p=0.013$ respectively).

Association of the gene and protein expression data with the clinical-pathological parameters showed that was no association between *EGFR* activity and tumor size and degree, or in relation to other histopathological variables and HPV presence. COX2 and PGE2 did not show association with clinical and histopathological variables, as well as with the presence of HPV.

DISCUSSION

Socioeconomic factors associated with lack of hygiene, such as the presence of phimosis, have been attributed as main risk factors for the development of inflammatory chronic conditions²⁴, which can lead to the development of penile cancer^{4, 14}. In this study, as observed in other developing countries, the majority of patients (57%) presented phimosis at the time of diagnosis or were living with this condition throughout their adult lives. The lack of foreskin retraction propitiates the accumulation of smegma in the area, impairs proper hygiene and inhibits the early detection of local lesions, enabling the development of an acute inflammation condition or, if not controlled, the progression to chronic inflammation^{1, 4, 13, 15, 16, 25}. Neonatal circumcision can have a protective effect against penile cancer^{4, 5, 16}. Association between phimosis e the usual tumor subtype was founded, which corroborates with studies that suggest the phimosis condition as an important etiological factor for CaPe^{1, 25}.

In this study, the highest frequency of patients presented with HPV infection of the high risk type: HPV type 16 (63%) was detected in the highest number of patients, followed by the high risk HPV types 59 and 35 (23.3%), and the intermediate and low risk types 74 and 11 (18.6%). This data reinforces the need of increasing the valence potential of the current HPV vaccines, that currently are targeted for the HPV types 6, 11, 16, 18, only two of the HPV types that affected the patients of our study (one of which, HPV 11, a low risk type which was present in only 7% of the cases). D'Hauwers and colleagues also observed that viral types occurring in PeCa correspond to only 13% of the virus contemplated by the vaccine⁸. Thus, our data reinforce that the HPV vaccines current available are effective in protecting only a portion of men infected by HPV and accordingly the development of PeCa affected only by these

HPV types. Therefore, it is imperative the identification of the most frequent circulating HPV genomic profiles in the patients' populations, so that the vaccines can be distributed accordingly.

The viral DNA insertion in specific genome sites of the host occurs more frequently through high risk types. These insertions induce host DNA instability leading to neoplastic transformation, by the expression of the viral oncoproteins E6 and E7, which induce cell proliferation and inhibit apoptosis. Oncoprotein E6 interferes directly in the p53 pathway mediating ubiquitination and degradation by 26S pathway^{6, 7, 11, 25, 26}. On the other hand, viral protein E7 binds to the retinoblastoma protein (RB) inducing its degradation by a process dependent on ubiquitin, enabling the release of E2F transcription factor, thereby activating important genes for DNA synthesis and cell cycle control^{6, 25, 26}. Considering the action of these proteins we investigated in this study, the expression of these *TP53* and *RB* genes at both the mRNA and protein level. These genes were found to be downregulated in a high percentage (80.5%) of the 37 tumors analyzed by qRT-PCR, most of which that presented HPV infection (94%). Thus we suggest that the virus could control the expression of these proteins through other mechanisms further than proteins Rb and TP53 degradation, such as gene silencing by miRNAs. Has been recently proposed that HPV may exert an influence in carcinogenic genes activity either by methylation or remodeling of gene promotor regions' chromatin²⁷. These findings may explain the mechanism by which RB and TP5 genes were silenced in our analyzed CaPe samples.

We also investigated the expression status of the *MYC* gene. Among the HPV genome insertion sites, one of the most frequent is the fragile site located in the 8q24.21 region, where *MYC* is located. Its viral integration induces amplification and/or overexpression of the *MYC* proto-oncogene^{7, 11}, which can lead to the development of PeCa. However, this gene can be found with copy number gains in these tumors, independently of the HPV infection^{12, 28}. In fact, therapies targeting the *MYC* oncogene have been indicated for PeCa¹².

In our study, we reported the down-expression of the *C-MYC* (mRNA and protein) in the majority of the PeCa patients. The mechanism by which this gene is down-regulated is not clear. But, some studies have been suggested gene repression mechanisms, including the ones mediated by miRNAs. In cervix cancer, per example, it was shown that the E7 viral oncoprotein induces the overexpression of miRs-15 and 16, which inversely regulates the expression of E2F1 transcription factor that activates the expression of *C-MYC* (competitor transcription factor of c-Myc binding sites). Thus these miRNAs negatively regulating the expression of *Myc*²⁹. Moreover, Shao and colleagues³⁰ demonstrated that miR-145 represses *MYC* expression in mouth SCC leading to the inhibition of cell growth in these carcinomas.

Chronic inflammation also plays a role in the etiology of PeCa by several process including the activation of *COX2* activity, which participates in PGE2 synthesis¹⁵. In the present study, we observed the overexpression of *COX2* and PGE2. We also report their association with *EGFR* overexpression (both, mRNA and protein), corroborating with other studies in which this gene was found overexpressed in PeCa.^{19, 23}. Interestingly, and supporting *EGFR* overexpression, copy number gains at 7p11.2, where this gene is mapped, was observed in 91% of these same PeCa cases of this study (unpublished data).

Taking in account we detected the *COX2* overexpression associated to protein and gene *EGFR* overexpression, we suggest that the elevated expression of epidermal growth receptors could induce *COX2* gene transcription and vice-versa. Corroborating this finding, *COX2* protein expression was also correlated to PGE2 protein expression, another relevant transcription factor. These data, despite unprecedented in penile carcinomas, have been cited in previous research that demonstrated the association between *COX2*/*PGE-2* protein expression and *EGFR* in other tumors carcinogenesis^{14, 15, 19, 29}.

The relationship between *COX2*/*PGE2* and *EGFR* expression has been reported in other type of cancers¹⁷⁻²⁰, suggesting that the concomitant inhibition of these two markers could be effective therapeutic targets to a variety of cancers²⁹. Several studies support the use of anti-inflammatories in therapy as an adjuvant treatment for solid cancers and even as a prophylactic measure for high risk patients^{14, 16}. Recently, it was demonstrated the efficiency of the anti-inflammatory drug Sinomenine, a *COX2* inhibitor, to suppress colon cells tumoral growth³¹. Valverde et al¹⁸ report that the combined treatment of colorectal squamous cell carcinomas cell lines with anti-*EGFR*/*VEGFR* and anti-*COX2* increased the antitumor and anti-metastasis effects of these inhibitors. Considering our results regard the interaction of these inflammatory associated proteins in the PeCa patients, and that chronic inflammation is a strong risk factor for PeCa, the therapies combining anti-*EGFR* and anti-*COX2* can also be promising for PeCa patients.

CONCLUSIONS

Our data support that the presence of phimosis and high-risk HPV infection are important risk factors for PeCa's etiology. In total, 94.6% of the PeCa patients of our study were infected by high-risk HPV. To our knowledge, this is the highest percentage of HPV infected patients in PeCa studies to date. This data highlight the urgent need of educational and health programs to population from countries with high incidence of PeCa. In addition, this study reinforces the need of the implementation of the current recommended guidelines for HPV vaccination in boys, as well as the availability of multivalence HPV vaccines.

It was observed a high percentage of HPV+ tumors with repressed activity of *RB* and *P53*, suggesting that there is a gene control mechanism, probably mediated by the virus, different from the already known protein tumor suppressor protein degradation through the E6 and E7 viral oncogenes. Similarly, *C-MYC* proto-oncogene was down-regulated, differently from what has been reported in other studies. These data show the importance of individualized therapies respecting different genetic profiles of individuals and populations.

We also found elevated expression of genes from the inflammatory pathway and an association between *EGFR* and *COX2*, reinforcing these genes' role in penile carcinoma genesis. Hence, we emphasize the concomitant use of anti-*EGFR* and anti-*COX2* inhibitors as a promising therapy for penile tumors.

REFERENCES

1. CHRISTODOULIDOU M, SAHDEV V, HOUSSEIN S et al: Epidemiology of penile cancer. *Curr Probl Cancer*; **39**:126, 2015.
2. FAVORITO LA, NARDI AC, RONALSA M et al: Epidemiologic Study on Penile Cancer in Brazil. *Int Braz J Urol*; **34**:587, 2008.
3. FORMAN D, BRAY F, BREWSTER DH et al: Cancer Incidence in Five Continents. Lyon: IARC; vol. X, 2014.
4. KOIFMAN L, VIDES AJ, KOIFMAN N et al: Epidemiological aspects of penile cancer in Rio de Janeiro: Evaluation of 230 cases. *Int Braz J Urol*; **37**:231, 2011.
5. DO COUTO TC, ARRUDA RMB, DO COUTO MC et al: Epidemiological study of penile cancer in Pernambuco: experience of two references centers. *Int Braz J Urol*; **40**:738, 2014.
6. MITTAL S, BANKS L: Molecular mechanisms underlying human papillomavirus E6 and E7 oncoprotein-induced cell transformation. *Mutat Res*; **772**:23, 2017.

7. PETER M, ROSTY C, COUTURIER et al: *MYC* activation associated with the integration of HPV DNA at the *MYC* locus in genital tumors. *Oncogene*; **25**:5985, 2006;
8. D'HAUWERS KWM, DEPUYDT CE, BOGERS JJ et al: Human papillomavirus, lichen sclerosus and penile cancer: A study in Belgium. *Vaccine*; **30**: 6573, 2012.
9. CHAUX A, CUBILLA AL: Advances in the pathology of penile carcinomas. *Hum Pathol*; **43**:771, 2012.
10. FLAHERTY A, KIM T, GIULIANO A et al: Implications for human papillomavirus in penile cancer. *Urol Onc*; **32**:53.e1, 2014.
11. CHU-YI L, FAN L, YI Z et al: Infection and integration of high-risk human papillomavirus in HPV-associated cancer cells. *Med Oncol*; **32**:109, 2015.
12. BUSSO-LOPES AF, MARCHI FA, KUASNE H et al: Genomic profiling of human penile carcinoma predicts worse prognosis and survival. *Cancer Prev Res*; **8**:149, 2015.
13. FERNANDES JV, FERNANDES TAAM, AZEVEDO JCV et al: Link between chronic inflammation and human papillomavirus-induced carcinogenesis. *Oncol Lett*; **9**:1015, 2015.
14. CARLSON BC, HOFER MD, BALLEK N et al: Protein markers of malignant potential in penile and vulvar lichen sclerosus. *J Urol*; **190**:399, 2013.
15. VENDRAMINI-CONSTA DB, CARVALHO JE: Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. *Curr Pharm Design*; **18**:3831, 2012.
16. CRUZ SM, BALKWILL FR: Inflammation and cancer: advances and new agents. *Nat Rev Clin Oncol*; **12**:584, 2015.
17. DE PAULA AAP, MOTTA ED, ALENCAR RC et al: The impact of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor C immunoexpression on the prognosis of penile carcinoma. *J Urol*; **187**:134, 2011.
18. VALVERDE A, PEÑARANDO J, CAÑAS A et al: Simultaneous inhibition of EGFR/VEGFR and cyclooxygenase-2 targets stemness-related pathways in colorectal cancer cells. *Plos One*; **10**:23, 2015.
19. DONNINI S, FINETTI F, TERZUOLI E et al: EGFR signaling upregulates expression of microsomal prostaglandin E synthase-1 in cancer cells leading to enhanced tumorigenicity. *Oncogene*; **31**:3457, 2012.
20. DONNINI S, FINETTI F, SOLITO R et al: EP2 prostanoid receptor promotes squamous cell carcinoma growth through epidermal growth factor receptor transactivation and iNOS and ERK1/2 pathways. *FASEB J*; **21**:2418, 2007.
21. GLIJANIN D, JIAN-YOU T, KAZIOR A et al: Cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase-1 are overexpressed in squamous cell carcinoma of penis. *Clin Cancer Res*; **10**:1024, 2004.
22. RUAN D, SHUI-PING S: Prostaglandin E2 produced by inducible COX-2 and mPGES-1 promoting cancer cell proliferation in vitro and in vivo. *Life Sci*; **116**:43, 2014
23. CHAUX A, MUNARI E, KATZ B et al: The epidermal growth factor receptor is frequently overexpressed in penile squamous cell carcinomas: a tissue microarray and digital image analysis study of 112 cases. *Hum Pathol*; **44**:2690, 2013.
24. MORRIS BJ, KRIEGER JN. Penile inflammatory skin disorders and the preventive role of circumcision. *Int J Prev Med*; **8**:1, 2017.
25. CAMUS S, MENÉNDEZ S, CHEOK CF et al: Ubiquitin-independent degradation of p53 mediated by high-risk human papillomavirus protein E6. *Oncogene*; **26**:4059, 2007.
26. GILL SS, JANA AM, SHRIVASTAV A 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.
27. JIMÉNEZ-WENCES H, PERALTA-ZARAGOZA O, FERNÁNDEZ-TILAPA G. Human papilloma virus, DNA methylation and microRNA expression in cervical cancer (Review). *Oncol Rep*; **31**: 2467, 2014.
28. MASFERRER E, FERRÁNDIZ-PULIDO C, LLOVERAS B et al: *MYC* copy number gains are associated with poor outcome in penile squamous cell carcinoma. *J Urol*; **188**:1965, 2012.

29. DÍAZ-GONZÁLEZ SDM, DEAS J, BENÍTEZ-BOJSEAUNEAU O et al: Utility of MicroRNAs and siRNAs in Cervical Carcinogenesis. *Biomed Res Int*; **2015**:1, 2015.
30. SHAO Y, QU Y, DANG S et al: MiR-145 inhibits oral squamous cell carcinoma (OSCC) cell growth by targeting c-Myc and Cdk6. *Cancer Cell Int*; **13**:1, 2013.
31. YANG H, YIN P, SHI Z et al: Sinomenine, a COX-2 inhibitor, induces cell cycle arrest and inhibits growth human colon carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. *Oncol Lett*; **11**:411, 2016.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados obtidos nesta pesquisa mostram que a presença de fimose e a infecção por HPV de alto risco são importantes fatores de risco para a etiologia de CaPe. No total, mais de 94% dos pacientes estavam infectados por HPV, assim, supomos que o vírus tenha participado da mediação da tumorigênese, nos casos positivos, reprimindo a atividade de TP53 e RB, os quais se apresentaram subexpressos pela técnica de PCR quantitativa. Entretanto, se faz necessária uma posterior investigação quanto ao número de cópias destes genes, tendo como objetivo o rastreio de possíveis deleções de cópias dos mesmos.

A elevada taxa de HPV de alto risco observada e as subexpressões gênicas dos supressores tumorais TP53 e RB na maioria das amostras também podem servir de embasamento científico para o estímulo a formulação de campanhas de vacinação para meninos e também a ampliação da valência destas vacinas.

Os resultados gerados também permitem a suposição de que o gene/proteína da via inflamatória COX2/PGE2 e o gene EGFR estejam relacionados a carcinogênese peniana. As proteínas COX2 e PGE2 revelaram-se associadas no câncer de pênis assim como COX2 e EGFR. Estes achados podem dar base científica para estudos que buscam desenvolver terapias anti-EGFR e anti-COX2 como tratamentos adjuvantes em pacientes com carcinoma de pênis.

O protooncogene MYC, tem sido encontrado frequentemente superexpresso na literatura oncológica e por consequência vem sendo estudado como um possível alvo terapêutico em CaPe. Entretanto, na população estudada neste trabalho, este gene e sua proteína se apresentaram subexpressos, demonstrando a importância do manejo de terapias individualizadas, respeitando os diferentes perfis genéticos entre os indivíduos e populações.

A etiologia do câncer de pênis é variada e pouco se sabe sobre sua base genética. Cada estudo gerado sobre este carcinoma é de suma importância para o seu entendimento e posterior aplicabilidade na clínica médica. Posteriores trabalhos confirmando a eficácia de terapias anti-EGFR combinadas a anti-COX2 em culturas

de células tumorais de pênis são necessárias para se dar um passo à frente ao combate a esse câncer mutilante.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFONSO, L.A., MOYSES, N., ALVES, G., ORNELLAS, A.A.; PASSOS, M.R.L., OLIVEIRA, L.H.S., CAVALCANTI, S.M.B. Prevalence of human papillomavirus and Epstein-Barr virus DNA in penile cancer cases from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, p.18-23, 2012.

ALVES, J. R. O., MAMEDIO P. M. N., SOUZA, R. D. M. et al. Análise clínicoepidemiológica de pacientes com neoplasia de pênis atendidos no Imoab-MA. **Revista Oficial do Congresso Franco-Brasileiro de Oncologia**, v. 1, p. 151 -151, 2010.

AOKI, J.; NARUMIYA, S. Prostaglandins and chronic inflammation. **Trends Pharmacological Sciences**, v.33, p.304-311, 2012.

BARNES, K. T., MCDOWELL, B.D., BUTTON, A., SMITH, B.J., LYNCH, C.F., GUPTA, A. Obesity is associated with increased risk of invasive penile cancer. **BMC Urology**, v. 16, p. 1-4, 2016.

BARNHOLTZ-SLOAN, J.S., MALDONADO, J.L., POW-SANG, J, GIULIANO, A.R. Incidence trends in primary malignant penile cancer. **Urology Oncology**, v.25, p.361-367, 2007.

BUSO-LOPES, A.F., MARCHI, F.A., KUASNE, H., SCAPULATEMPO-NETO, C., TRINDADE-FILHO, J.C.S., JESUS, C.M.N., LOPES, A., GUIMARÃES, G.C., ROGATTO, S.R. Genomic profiling of human penile carcinoma predicts worse prognosis and survival. **Cancer Prevention Research**, v.8, p.149-156, 2015.

CALMON, M. F., MOTA, M. T., VASSALLO, J., RAHAL, P. Penile Carcinoma: Risk Factors and Molecular Alterations. **The Scientific World Journal**, n. 11, p. 269–282, 2011.

CALMON, M.F., MOTA, M.T.O., BABETO, E., CANNDIDO, M.N., GIROL, A.P., MENDIBURU, C.F., BONILHA, J.L., SILVESTRE, R.V.D., A ROSA, B.M., THOME, J.A., MEDEIROS, G.H.A., SOARES, F.A., GUIMARÃES, G.C., DE ARRUDA, J.G.F., OLIANI, S.M., VILLA, L.L., VASSALLO, J., RAHAL, P. Protein Markers of Malignant Potential in Penile and Vulvar Lichen Sclerosus. **The Journal of Urology**, v.190, p.399-406. 2013.

CARVALHO, N. S., KANNENBERG, A. P., MUNARETTO, C., YOSHIOKA, D., ABSY, M. C. V., FERREIRA, M. A., TAMBARA-FILHO, R. Associação entre HPV e Câncer Peniano: Revisão da Literatura. **DST: Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v.19, p. 92-95, 2007.

CASTELLONE, M. D., TERAMOTO, H., WILLIAMS, B. O., DRUEY, K. M., GUTKIND, J. S. Prostaglandin E2 Promotes colon cancer cell growth through a Gs-Axin- β -Catenin signaling Axis. **Science**, v.310, p.1504-1510, 2005.

CAMUS, S., MENÉNDEZ, S., CHEOK, C. F., STEVENSON, L.F., LAÍÍN, S., LANE, D.P. Ubiquitin-independent degradation of p53 mediated by high-risk human papillomavirus protein E6. **Oncogene**, v.26, p.4059-4070, 2007.

CHAIM, J. B., LIVNE, P. M., BINYAMINI, J., HARDAK, B., BEN-MEIR, D., MOR, Y. Complications of circumcision in Israel: a one year multicenter survey. **The Israel Medical Association journal**, v. 7, n. 6, p. 368 -370, 2005.

CHANG, B.W., KIM, D.H., KOWALSKI, D.P., BURLESON, J.A., SON, Y. H., WILSON, L. D., HAFETY, B. G. Prognostic significance of cyclooxygenase-2 in oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v.10, p. 1678-84, 2004.

CHAUX, A.; CUBILLA, A. L. Advances in the pathology of penile carcinomas. **Human Pathology**, v. 43, p.771-789, 2012.

CHAUX, A., NETTO, G.J., RODRÍQUEZ, I.M., BARRETO, J.E., OERTELL, J., CAMPOS, S.O., BOGGINO, H., CODAS, R., BOSCH, X.F., SANJOSE, S., MUÑOZ, M., HILDESHEIM, A., CUBILLA, A.L. Epidemiologic profile, sexual history, pathologic features, and human papillomavirus status of 103 patients with penile carcinoma. **World Journal of Urology**, v. 31, p. 861-867, 2013a.

CHAUX, A., MUNARI, E., KATZ, B., SHARMA, R., LECKSELL, K., CUBILLA, A.L., BURNETT, A.L., NETTO, G.J. The epidermal growth factor receptor is frequently overexpressed in penile squamous cell carcinomas: a tissue microarray and digital image analysis study of 112. **Human Pathology**, v.44, p. 2690-2695, 2013b.

CHRISTODOULIDOU, M., SAHDEV, V., HOUSSEIN, S., MUNEEER, A. Epidemiology of penile cancer. **Curr Probl Cancer**, v.39, p. 126-136, 2015.

COUTURIER, J., SASTRE-GARAU, X., SCHNEIDER-MAUNOURY, S., LABIB, A., ORTH, G. Integration of papillomavirus DNA near *myc* genes in genital carcinomas and its consequences for proto-oncogene expression. **Journal of Virology**, v. 65, p.4534-38, 1991.

CUBILLA, A.L., REUTER, V., VELAZQUEZ, E., et al. Histologic classification of penile carcinoma and its relation to outcome in 61 patients with primary resection. **International Journal of Surgical Pathology**, v.9, p. 111-120, 2001.

CRUSZ, S. M.; BALKWILL, F. R. Inflammation and cancer: advances and new agents. **Nat. Rev. Clin. Oncol.**, v.12, p.584–596, 2015.

DANNENBERG, A. J., LIPPMAN, S. M., MANN, J. R., SUBBARAMAIAH, K., DUBOIS, R. N. Cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor: Pharmacologic targets for chemoprevention. **Journal of Clinical Oncology**, v.23, 2005.

D'HAUWERS, K. W. M., DEPUYDT, C. E., BOGERS, J. J., NOEL, J. C., DELVENNE, P., MARBAIX, E., DONDERS, A. R., TJALMA, W. A. Human papillomavirus, lichen sclerosus and penile cancer: A study in Belgium. **Vaccine**, v.30, p.6573-6577, 2012.

DE PAULA, A. A. P., MOTTA, E. D., ALENCAR, R. C., SADDI, V. A., DA SILVA, R. C., CAIXETA, G. N., ALMEIDA NETTO, J. C., CARNEIRO, M. A. The Impact of Cyclooxygenase-2 and Vascular Endothelial Growth Factor C Immunoexpression on the Prognosis of Penile Carcinoma. **The Journal of Urology**, v.187, p.134-140, 2011.

De PAULA, A.A.P., ALMEIDA NETTO, J. C., DA CRUZ, A. D., DE FREITAS JÚNIOR, R. Carcinoma epidermóide do pênis: considerações epidemiológicas, histopatológicas, influência viral e tratamento cirúrgico. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 51, p. 243-252, 2005.

DIANZANI, C.D., BUCCIB, M., PIERANGELIB, A., CALVIERIA, S., DEGENERB, A.M. Association of Human Papillomavirus Type 11 with Carcinoma of the Penis. **Urology**, v.51, p.1046-1048, 1998.

DO COUTO, T.C., ARRUDA, R.M.B., DO COUTO, M.C., BARROS, F.D. Epidemiological study of penile cancer in Pernambuco: Experience of two reference centers. **Int Braz J Urol**, v.40, p.738-44, 2014.

DONNINI, S., FINETTI, F., SOLITO, R., TERZUOLI, E., SACCHETTI, A., MORBIDELLI, L., PATRIGNANI, P., ZICHE, M. EP2 prostanoid receptor promotes squamous cell carcinoma growth through epidermal growth factor receptor transactivation and iNOS and ERK1/2. **The FASEB Journal**, v.21, p.2418-2430, 2007.

DONNINI, S., FINETTI, F., TERZUOLI, E., GIACHETTI, A., IÑIGUEZ, HANAKA, H., FRESNO, M., RADMARK, O., ZICHE, M. EGFR signaling upregulates expression of microsomal prostaglandin E synthase-1 in cancer cells leading to enhanced tumorigenicity. **Oncogene**, v.31, p. 3457-3466, 2012.

DOUGAN, M., LI, D., NEUBERG, D., MIHM, M., GOOGE, P., WONG, K., DRANOFF, G. A dual role for the immune response in a mouse model inflammation-associated lung cancer. **J Clin Invest**, v.121, p.2436-2446, 2011.

DUBOIS, R.N., ABRAMSON, S.B., CROFFORD, L., GUPTA, R. A., SIMON, L. S., VAN DE PUTTE, L. B., LIPSKY, P. E. Cyclooxygenase in biology and disease. **FASEB Journal**, v. 12, p.1063-1073, 1998.

EBLE, J. N., SAUTER, G., EPSTEIN, J. I. E., SESTERHENN, I. A. *Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*. (Eds.): World Health Organization Classification of Tumours. **IARC Press**: Lyon, 2004.

FAVORITO, L.A., NARDI, A.C., RONALSA, M., ZEQUI, S.C., SAMPAIO, F.J.B., GLINA, A. Epidemiologic Study on Penile Cancer in Brazil. **International Braz J Urol**, v.34, p. 587-593, 2008.

FERRÁNDIZ-PULIDO, C.; DE TORRES, I.; GARCIA-PATOS, V. Penile Squamous Cell Carcinoma. **Actas Dermosifiliogr**, v.103, p.478-487, 2012.

FERREUX, E.; LONT, A.P.; HORENBLAS, S., GALLEE, M. P., RAAPHORST, F.M., VON KNEBEL DOEBERITZ, M., MEIJER, C. J., SNIJDERS, P. J. Evidence for at least three alternative mechanisms targeting the p16INK4A/cyclin D/ Rb pathway in penile carcinoma, one of which is mediated by high-risk human papillomavirus. **Journal of Pathology**, v.201, p.109-18, 2003.

FERNANDES, J. V., DE MEDEIROS FERNANDES, T. A., DE AZEVEDO, J. C., COBUCCI, R. N., DE CARVALHO, M. G., ANDRADE, V. S., DE ARAÚJO, J. M. Link between chronic inflammation and human papillomavirus-induced carcinogenesis (Review). **Ocology Letters**, v.9, p.1015-1026, 2015.

FLAHERTY, A., KIM, T., GIULIANO, A., MAGLIOCCO, A., HAKKY, T. S., PAGLIARO, L. C., SPIESS, P. E. Implications for human papillomavirus in penile cancer. **Urologic Oncology**, v. 32, p. 53e1-53e8, 2014.

FORMAN, D., BRAY, F., BREWSTER, D. H., GOMBE MBALAWA, C., KOHLER, B., PIÑEROS, M., STELIAROVA-FOUCHER, E., SWAMINATHAN, R., FERLAY, J. Cancer Incidence in Five Continents, Vol. X. **IARC Scientific Publication** 10. Eds. 164. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2014.

FRISCH, M., FRIIS, S., KJAER, S.K., MELBYE, M. Falling incidence of penis cancer in an uncircumcised population (Denmark 1943-90). **British Medical Journal**, v.311, p.1471, 1995.

GASTARDELO, T.S., CUNHA, B.R., RAPOSO, L.S., MANIGLIA, J.V., CURY, P.M., LISONI, F.C.R., TAJARA, E.H., OLIANI, S.M. Inflammation and cancer: Role of annexin A1 and FPR2/ALX in proliferation and metastasis in human laryngeal squamous cell carcinoma. **Plos one**, v.9, p. e111317, 2014.

GAO, W., SONG, L., YANG, J., SONG, N., WU, X., SONG, N., QIAO, D., CHEN, C., ZHANG, J., WANG, Z. Risk factors and negative consequences of patient's delay for penile carcinoma. **World Journal of Surgical Oncology**, v.14, 2016.

GILL, S. S., JANA, A. M., SHRIVASTAV, A., SHARMA, S., SHARMA, A. 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. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.5, p. 703-712, 2014.

GOLIJANIN, D., TAN, J.Y., KAZIOR, A., COHEN, E., G., RUSSO, P., DALBAGNI, G., AUBORN, K., J., SUBBARAMAIAH, K., DANNENBERG, A., J. Cyclooxygenase-2 and Microsomal Prostaglandin E Synthase-1 Are Overexpressed in Squamous Cell Carcinoma of the Penis. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 1024-1031, 2004.

GOODMAN, M.T.; HERNANDEZ, B.Y.; SHVETSOV, Y.B. Demographic and pathologic differences in the incidence of invasive penile cancer in the United States,

1995-2003. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.16, p. 1833-1839, 2007.

GOU, H-F., LI, X., QIU, M., CHENG, K., LI, L-H., DONG, H., CHEN, Y., TANG, Y., GAO, F., ZHAO, F., MEN, H-T., GE, J., SU, J-M., XU, F., BI, F., GAO, J-J., LIU, J-Y. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)RAS Signaling Pathway in Penile Squamous Cell Carcinoma. **Plos One**, v.8, p. e62175, 2013.

HA-NA, L.; HYE-KYUNG, N.; YOUNG-JOON, S. Resolution of inflammation as a novel chemopreventive strategy. **Semin Immunopathol**, v. 35, p. 151-161, 2013.

HEYNS, C. F.; MENDONZA-VALDES, A.; POMPEO, A.C. Diagnosis and Staging of Penile Cancer. **Urology**, v.76, p. S15-S23, 2010.

HUANG, R-Y.; CHEN, G. G. 2011. Cigarette smoking, cyclooxygenase-2 pathway and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1815:158–169.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Câncer. O que é. <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>. Acessado em 25/04/2017a.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/penis>. Acessado em 13/04/2017b.

INSTITUTO ONCOGUIA. Sistema TNM. <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/sistema-tnm/4801/725/>. Acessado em 15/10/2017.

JACKSON, S.M. The treatment of carcinoma of the penis. **British Journal of Surgery**, v.53, p.33–35, 1966.

JACOBS, J.J.; DE LANGE, T. p16INK1a as a second effector of the telomere damage pathway. **Cell Cycle**, v.4, p.1364-68, 2005.

JAYARATNA, I.S., MITRA, A.P., SCHWARTZ, R.L., DORFF, T.B., SCHUCKMAN, A.K. Clinicopathologic characteristics and outcomes of penile cancer treated at Tertiary Care Centers in the western United States. **Clinical Genito urinary Cancer**, v.12, p.138-142, 2014.

KAYES, O., AHMED, H. U., ARYA, M., MINHAS, S. Molecular and genetic pathways in penile cancer. **The Lancet Oncology**. v. 8, p.420-429, 2007.

KIEFFER, J. M., DJAJADININGRAT, R. S., VAN MUILEKOM, E. A., GRAAFLAND, N. M., HORENBLAS, S., AARONSON, N. K. Quality of life for patients treated for penile cancer. **The Journal of Urology**, v. 192, 1105-1110, 2014.

KAYES, O.; MINHAS, S. Biomarker Discovery in Penile Cancer. **The Journal of Urology**, v.188, 1660-1661, 2012.

KEKATPURE, V. D. et al. Factors predicting outcome after salvage treatment for stage IV oral squamous cell carcinoma: Evidence of the potential importance of the cyclooxygenase-2–prostaglandin E2 pathway. **Head & neck**, v.37, p.1142-1149, 2015.

KIM, Y. B.; KIM, G. E.; CHO, N. H., PYO, H. R., SHIM, S. J., CHANG, S. K., PARK, H. C., SUH, C. O., PARK, T.K., KIM, B. S. Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with a poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the uterine cervix treated with radiation and concurrent chemotherapy. **Cancer**, v.95, p.531-39, 2002.

KOCHEN, M., McCURDY, S. Circumcision and the risk of cancer of the penis. A life-table analysis. **American Journal of Diseases of Children**, v.134, p. 484-486, 1980.

KOIFMAN, L., VIDES, A. J., KOIFMAN, N., CARVALHO, J. P., ORNELLAS, A. A. Epidemiological aspects of penile cancer in Rio de Janeiro: Evaluation of 230 cases. **International Braz J Urol**, v.37, p.231-243, 2011.

KUZYK, A.; MAI, S. c-MYC-Induced Genomic Instability. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v.4, p.a014373, 2014.

LARKE, N. L., THOMAS, S. L., DOS SANTOS SILVA, I., WEISS, H. A. Male circumcision and penile cancer: a systematic review and meta-analysis. **Cancer Causes Control**, v. 22, p. 1097-110, 2011.

LIMA, M. A. P.; SILVA, C. G. L.; RABENHORST, S. H. B. Papel das Proteínas Precoces do Papiloma Vírus Humano na Carcinogênese. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.59, p.565-573, 2013.

LIU, C., LI, F., ZENG, Y., TANG, M. Z., HUANG, Y., LI, J. T., ZHONG, R. G. Infection and integration of high-risk human papillomavirus in HPV-associated cancer cells. **Med oncol**, v.32, 2015.

LOPES, A., BEZERRA, A.L., PINTO, C.A., SERRANO, S. V., DE MELLO, C. A., VILLA, L. L. P53 as a new prognostic factor for lymph node metastasis in penile carcinoma: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy. **Journal of Urology**, v.168, p. 81-86, 2002.

LORENZO DI, J.; PERDONA, S.; BUONERBA, C.; SONPAVDE, G.; GINGANTINO, V.; PANNONE, G.; QUARTO, G.; FERRO, M.; GAUDIOSO, G.; TERRACCIANO, D.; TROLIO DI, R.; RESCIGNO, P.; BOTTI, G.; PLACIDO DE, S.; FACCHINI, G.; ASCIERTO A, P.; FRANCO, R. Cytosolic phosphorylated EGFR is predictive of recurrence in early stage penile cancer patients: a retrospective study. **Journal of translational Medicine**, v.11, p.161, 2013.

MASFERRER, E., CARLA, FERRÁNDIZ-PULIDO, E., BELÉN LLOVERAS, B., MASFERRER-NIUBÒ, M., ESPINET, B., SALIDO, M., RODRÍGUEZ-RIVERA, M., ALEMANY, L., PLACER, J., GELABERT, A., SERVITJE, O., GARCÍA-PATOS, V., PUJOL, R. M., TOLL, A. MYC copy number gains are associated with poor outcome in penile squamous cell carcinoma. **Journal of Urology**, v.188, p.1965-1971, 2012.

MENENDEZ, D., INGA, A., JORDAN, J.J., RESNICK, M.A. Changing the p53 master regulatory network: ELEMENTary, my dear Mr Watson. **Oncogene**, v.26, p.2191-2201, 2007.

MISRA, S.; CHATURVED, A.; MISRA, N.C. Penile carcinoma: a challenge for the developing world. **The Lancet Oncology**, v.5, p.240-247; 2004.

MITAL, S.; BANKS, L. Molecular mechanisms underlying human papillomavirus E6 and E7 oncoprotein-induced cell transformation. **Mutation Research**, v. 772, p. 23-35, 2017.

MORRIS, B.J., GRAY, R.H., CASTELLSAGUE, X., BOSCH, F.X., HALPERIN, D.T., WASKETT, J.H., HANKINS, C.A. The Strong Protective Effect of Circumcision against Cancer of the penis. **Advances in Urology**, v.21, Article ID 812368, 2011.

MORRIS, B. J.; KRIEGER, J. N. Penile Inflammatory Skin Disorders and the Preventive Role of Circumcision. **International Journal of Preventive Medicine**, v.8, p. 32, 2017.

ORNELLAS, A.A. Management of penile cancer. **Journal of Surgical Oncology**, v.97, p.199-200, 2008.

ORNELLAS, A.A., SEIXAS, A.L., MAROTA, A., et. al. Surgical treatment of invasive squamous cell carcinoma of the penis: retrospective analysis of 350 cases. **Journal of Urology**, v. 151, p. 1244-1249, 1994.

OSHIMA, H., HIOKI, K., POPIVANOVA, B.K., OGUMA, K., ROOIJEN, N.V., ISHIKAWA, T., OSHIMA, M. Prostaglandin E2 signaling and bacterial infection recruit tumor-promoting macrophages to mouse gastric tumors. **Gastroenterology**, v.140, p. 596-607, 2011.

PARKIN, D. M.; MUIR, C. S. Cancer Incidence in Five Continents. Comparability and quality of data. **IARC Scientific Publications**, v.120, p.45-173, 1992.

PARTRIDGE, J. M.; KOUTSKY, L. A. Genital human papillomavirus infection in men. **The Lancet Infectious Diseases**, v.6, p. 21-31, 2006.

PETER, M., ROSTY, C., COUTURIER, J., RADVANYI, F., TESHIMA, H., SASTRE-GARAU, X. MYC activation associated with the integration of HPV DNA at the MYC locus in genital tumors. **Oncogene**, v.25, p.5985-5993, 2006.

PHILIPPOU, P., SHABBIR, M., RALPH, D.J., MALONE, P., NIGAM, R., FREEMAN, MUNEEER, A., MINHAS, S. Genital lichen sclerosis/balanitis xerotica obliterans in men with penile carcinoma: a critical analysis. **Bju Internacional**, v.111, p.970–976, 2013.

PIZZOCARO, G., ALGABA, F., HORENBLAS, S., SOLSONA, E., TANA, S., VAN DER POEL, H., WATKIN, N. A. EAU penile cancer guidelines 2009. **European Urology**, v.57, p.1002-1012, 2010.

POW-SANG, M. R., FERREIRA, U., POW-SANG, J.M., NARDI, A. C., DESTEFANO, V. Epidemiology and natural history of penile cancer. **Urology**, v. 76, S2-6, 2010.

PROTZEL, C., KNOEDEL, J., ZIMMERMMANN, U., WOENCKHAUS, C., POETSCH, M., GIEBEL, J. Expression of proliferation marker Ki67 correlates to occurrence of metastasis and prognosis, histological subtypes and HPV DNA detection in penile carcinomas. **Histology and Histopathology**, v.22, p.1197-1204, 2007.

PUBLIC HEALTH ENGLAND KNOWLEDGE AND INTELLIGENCE TEAM (South West). Penile Cancer Incidence, Mortality and Survival Rates in the United Kingdom August. **The National Cancer Intelligence Network (NCIN)**, p.1-6, 2013.

RADISKY, D. C.; KENNY, P. A.; BISSELL, M. J. Fibrosis and cancer: do myofibroblasts come also from epithelial cells via EMT? **Journal of Cellular Biochemistry**, v.101, p.830-839, 2007.

REIS, A.A.S., PAULA, L.B., PAULA A.A.P., SADDI, V.A., CRUZ, A.D. Aspectos clínico-epidemiológicos associados ao câncer de pênis. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.15, p. 1105-1111, 2010.

RICCIOTTI, E.; FITSGERALD, G.A. Prostaglandins and inflammation. **Arterioscler Tromb Vasc Biol**, v.31, p.986-1000, 2011.

ROMERO, F.R., ROMERO, A.W., DE ALMEIDA, R.M.S., OLIVEIRA, J.R. F.C., TAMBARA FILHO, R. Prevalence and risk factors for penile lesions/anomalies in a cohort of Brazilian men >_ 40 years of age. **Int Braz J Urol**, v.39, p. 55-62, 2013.

SCHMAUZ, R.; JAIN, D. K. Geographical variation of carcinoma of the penis in Uganda. **British Journal of Cancer**, v. 25, p. 25-32, 1971.

SCHOEN, E.J. The relationship between circumcision and cancer of the penis. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v.41, p.306-309, 1991.

SHAH, V.S., JUNG, N.L., LEE, D.K., NEPPLE, K.G. Does routine pathology analysis of adult circumcision tissue identify penile cancer? **Oncology**, v.85, p.1431-1435, 2015.

SONPAVDE, G., PAGLIARO, L.C., BUONERBA, C., DORFF, T.B., LEE, R. J., LORENZO, G.D. Penile cancer: current therapy and future directions. **Annals of Oncology**, v.24, p.1179-1189, 2013.

SOUSA, I.D.B., VIDAL, F. C., BRANCO VIDAL, J. P., DE MELLO, G. C., DO NASCIMENTO, M. D. S. B., BRITO, L. M. Prevalence of human papillomavirus in penile malignant tumors: viral genotyping and clinical aspects. **BMC Urology**, v.15, p.1-6, 2015.

STEPHEN, B. E.; CAROLYN, C. C. The American Joint Committee on Cancer: the 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM. **Ann Surg Oncol**, v.17, p.1471–1474, 2010.

TANG, L.; WANG, K. Chronic Inflammation in Skin Malignancies. **Journal of Molecular Signaling**, v.11, p.1-13, 2016.

Union for International Cancer Control. TNM Classification of Malignant Tumours - 7th ed. Changes between the 6th and 7th editions, 2010.

VALVERDE, A., PEÑARANDO, J., CAÑAS, A., LÓPEZ-SÁNCHEZ, L. M., CONDE, F., HERNÁNDEZ, V., PERALBO, E., LÓPEZ-PEDRERA, C., DE LA HABA-RODRÍGUEZ, J., ARANDA, E., RODRÍGUEZ-ARIZA, A. Simultaneous inhibition of EGFR/VEGFR and cyclooxygenase-2 targets stemness-related pathways in colorectal cancer cells. **Plos one**, v. 10, n. 6, p.1-23, 2015.

VASSALLO, J., RODRIGUES, A.F.F., CAMPOS, A.H.J.E.M., ROCHA, R.M., DA CUNHA, I.W., ZEQUI, S.C., GUIMARÃES, G.C., DA FONSECA, F.P., LOPES, A., CUBILLA, A., SOARES, F.A. Pathologic and immunohistochemical characterization of tumoral inflammatory cell infiltrate in invasive penile squamous cell carcinomas: Fox-P3 expression is an independent predictor of recurrence. **Tumor Biol**, v.36, p.2509-2516, 2015.

VENDRAMINI-COSTA, D. B.; CARVALHO, J. E. Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. **Current Pharmaceutical Design**, v.18, p.3831-3852, 2012.

YANG, H., YIN, P., SHI, Z., MA, Y., ZHAO, M., ZHENG, J., CHEN, T. Sinomenine, a COX-2 inhibitor, induces cell cycle arrest and Inhibits growth of human colon carcinoma cells in vitro and in vivo. **Oncology Letters**, v.11, p.411-418, 2016.

ZUR HAUS, H. Papillomavirus and cancer: from basic studies to clinical application. **Nature Reviews Cancer**, v.2, p. 342-50, 2002.

ANEXO A: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
LABORATÓRIO DE GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO INFORMAÇÕES PARA OS PACIENTES, RESPONSÁVEIS E FAMILIARES

Você está sendo convidado a participar voluntariamente do projeto de pesquisa “ANÁLISE DE ALTERAÇÕES GENÔMICAS E NA EXPRESSÃO GÊNICA EM CÂNCER PENIANO NO ESTADO MARANHÃO”

Leia atentamente as informações a seguir antes de dar o seu consentimento. No caso de não entender bem peça mais esclarecimento e só assine após ter certeza de ter esclarecido todas as suas dúvidas.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DO ESTUDO

O aparecimento de tumor no pênis é um fato não muito raro no Estado do Maranhão. Isso pode acontecer por diferentes motivos. Esta pesquisa tem como principal objetivo estudar as possíveis causas para o surgimento dessa doença, principalmente os aspectos relacionados com a presença do vírus HPV e alterações no DNA (material responsável por toda informação necessária para o bom funcionamento do corpo).

De que forma posso auxiliar neste estudo?

Você pode auxiliar autorizando que o material resultante da cirurgia para remoção do tumor e os resultados dos exames possam ser utilizados nesta pesquisa.

Quais os riscos e limites que podem ser encontrados nos exames?

O paciente não terá nenhum risco a mais, pois todo o procedimento cirúrgico será realizado conforme a prescrição médica.

Os resultados obtidos para essa pesquisa são absolutamente confidenciais, portanto, serão comunicados somente à pessoa ou responsável e ao profissional médico que acompanha o paciente. A comunicação dos resultados a terceiros só poderá ser realizada mediante autorização do interessado.

É raro, mas é possível, que por problemas técnicos, o exame forneça resultados inconclusivos.

Como será feita esta pesquisa?

As pessoas serão convidadas a participar da pesquisa. Receberão uma cópia deste documento que deverá ser lido, entendido e assinado. Os participantes serão atendidos pelo médico que fará algumas perguntas, examinará o paciente e, se necessário, poderá solicitar alguns exames complementares.

Quais os benefícios e malefícios deste estudo?

Não haverá nenhuma vantagem direta, tal como remuneração de qualquer ordem, com a participação neste estudo, porém, os resultados poderão ajudar a entender o porque e de que forma a doença apareceu e contribuirá futuramente para a melhoria do diagnóstico e tratamento dessa patologia.

O que vai ser feito com o material e os dados coletados de cada paciente?

O material e a ficha-protocolo com resultados dos exames dos pacientes serão armazenados no Laboratório de Genética e Biologia Molecular - Universidade Federal do Maranhão (UFMA). As amostras serão registradas por números, para evitar identificação dos pacientes. A identificação dos pacientes será mantida em sigilo absoluto e estará sob a guarda dos pesquisadores responsáveis.

A pessoa ou responsável legal poderá escolher entre ser informado ou não dos resultados do estudo; aqueles que se interessarem em saber sobre os resultados obtidos com o presente estudo serão orientados pela coordenadora geral do Projeto, Dra. Silma Regina Ferreira Pereira (professora do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Maranhão), podendo ser contactada no Laboratório de Genética e Biologia Molecular, no endereço: Av. dos Portugueses, 1966, cidade universitária do Campus do Bacanga, São Luis, Maranhão, telefone 32728543.

Os pacientes que não concordarem em participar da pesquisa não terão nenhum prejuízo sobre seu tratamento.

Declaro que fui devidamente esclarecido sobre a pesquisa da qual estou sendo convidado a participar, e que CONCORDO, voluntariamente, em participar do referido trabalho.

São Luís, _____ de _____ de 20____

NOME POR EXTENSO/RG

Assinatura

ANEXO B: PARECER CONSUBSTANCIADO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MARANHÃO/MA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DE ALTERAÇÕES GENÔMICAS E NA EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA EM CÂNCER PENIANO

Pesquisador: SILMA REGINA FERREIRA PEREIRA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 46371515.5.0000.5087

Instituição Proponente: FUNDACAO UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHAO

Patrocinador Principal: FUND DE AMPARO A PESQUISA AO DESEN CIENTIFICO E TECNOLÓGICO DO MARANHÃO - FAPEMA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.308.275

Apresentação do Projeto:

O câncer de pênis (CP) é uma neoplasia rara em países desenvolvidos. No entanto, sua incidência é mais elevada em países em desenvolvimento, como o Brasil, sendo mais prevalente nas regiões Norte e Nordeste. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA) esse tipo de tumor representa 2% de todos os tipos de câncer que atingem o homem, tendo sido registrados 363 mortes no ano de 2010. De acordo com a SBU, em 2007, o Maranhão teve 10,7% dos casos de câncer de pênis notificados no Brasil, estando entre os cinco estados onde há maior prevalência, sendo superior até mesmo que o câncer de próstata. No entanto, faz-se necessário a realização de um estudo epidemiológico mais robusto e atualizado para que seja conhecida a realidade sobre a ocorrência dessa patologia no Estado. A etiologia é heterogênea, mas estudos mostram uma relação com baixas condições socioeconômicas e de instrução, à má higiene íntima e a homens que não se submeteram à circuncisão. Apesar da alta prevalência de câncer peniano no Brasil, dados epidemiológicos, análise do background genético, parâmetros clínicos, evolução da doença e resposta aos tratamentos, ainda são incipientes, o que dificulta o diagnóstico, prognóstico e tratamento da doença e, consequentemente, resulta nos altos índices de diagnóstico em estágios avançados e mortalidade. A caracterização de alterações genômicas e

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho

Bairro: Bloco C, Sala 7, Comitê de Ética

CEP: 65.080-040

UF: MA **Município:** SAO LUIS

Telefone: (98)3272-8708

Fax: (98)3272-8708

E-mail: cepufma@ufma.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO/MA



Continuação do Parecer: 1.308.275

de expressão gênica apresenta grande potencial para a identificação de marcadores moleculares e vêm contribuindo para o desenvolvimento de novas terapias em uma série de cânceres humanos. Neste sentido, propomos, por meio de análises de array-CGH, alteração no número de cópias (CNA), miRNAs, e análise de expressão gênica e

proteica, a identificação de marcadores moleculares em tumores penianos de pacientes provenientes do Estado do Maranhão, normalmente diagnosticados em estágios clínicos avançados, onde o risco de recorrência tumoral é elevado. Os perfis genômicos observados serão validados através de análises gênicas específicas e funcionais, incluindo as principais vias de sinalização celular identificadas. Estas análises podem, futuramente, contribuir para a redução da taxa de mortalidade por estes tumores, pela predição do prognóstico em uma fase inicial do atendimento clínico, bem como pela escolha adequada do tratamento, propiciando uma resposta terapêutica satisfatória.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Identificar alterações genômicas e na expressão gênica e proteica em câncer de pênis, buscando a identificação de marcadores moleculares para este tipo de tumor.

Objetivo Secundário:

- Caracterizar os portadores de carcinomas penianos do Estado do Maranhão para o desenvolvimento de um registro epidemiológico específico para os homens do estado, a fim de identificar os principais fatores de risco e promover e incentivar ações preventivas.
- Identificar a presença de papilomavírus humano (HPV) e genotipar os subtipos virais.
- Identificar o perfil de alterações genômicas através do método de array-CGH.
- Identificar o perfil de expressão de miRNAs.
- Identificar alterações no número de cópias gênicas (CNA) por meio de qPCR.
- Integrar os dados de alterações de número de cópias de DNA com os de expressão de miRNA nas mesmas amostras tumorais.
- Avaliar alterações na expressão de genes específicos por meio de RT-PCR.
- Identificar, por citometria de fluxo e imunohistoquímica, variações na expressão de proteínas relacionadas às alterações genéticas detectadas nas células tumorais.
- Correlacionar as alterações observadas com parâmetros clínico-patológicos dos pacientes (tipo histológico, grau de estadiamento, tamanho do tumor), incluindo dados de seguimento clínico (tempo livre da doença, recorrência tumoral, sobrevida, entre outros).

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho

Bairro: Bloco C, Sala 7, Comitê de Ética

CEP: 65.080-040

UF: MA

Município: SÃO LUIS

Telefone: (98)3272-8708

Fax: (98)3272-8708

E-mail: cepufma@ufma.br

Continuação do Parecer: 1.308.275

Avaliação dos Riscos e Benefícios:**Riscos:**

Este projeto confere riscos mínimos aos pacientes uma vez não será realizada nenhuma intervenção direta ou indireta para fins exclusivos desta pesquisa, mas somente aquelas previstas para o diagnóstico e tratamento dos sujeitos da pesquisa. As amostras biológicas a serem utilizadas serão provenientes de procedimentos cirúrgicos prescritos para os casos com diagnóstico clínico e anatomopatológico de câncer de pâncreas. A coleta dos fragmentos de tumor não implicará em riscos adicionais no tratamento ou na cirurgia, e nem tampouco, em aumento no tempo de operação ou extensão da mesma. Sob o aspecto emocional, os pacientes serão informados pela equipe médica, que sua participação na pesquisa não terá nenhuma influência sobre seu tratamento, de modo que eles devem se sentir livres para escolher entre participar ou não da pesquisa. Assim, é garantida a continuidade do acompanhamento, tratamento, assistência integral e orientação dos pacientes independentemente destes concordarem ou não em participar da pesquisa.

É garantida a manutenção do sigilo e da privacidade dos participantes da pesquisa durante todas as fases da pesquisa. Todos os dados da paciente são absolutamente confidenciais e, portanto, serão comunicados somente à paciente ou ao médico que a acompanha. As amostras biológicas, bem como as informações clínico-laboratoriais serão codificadas para registro em programa computacional específico, cuja acesso somente é possível através de senha de identificação única. Os resultados das análises genéticas para fins de divulgação científica sempre serão feitos considerando-se o grupo amostral, e não individualmente. Esses procedimentos garantem a confidencialidade e a privacidade, a proteção da imagem e a não estigmatização dos participantes da pesquisa, garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades, inclusive em termos de auto estima, de prestígio e/ou de aspectos econômico-financeiros, conforme previsto na resolução nº466, de 12 de dezembro de 2012.

Benefícios:

O material biológico será processado para análise de alterações moleculares e este trabalho deverá produzir resultados que não beneficiarão diretamente o sujeito da pesquisa, mas contribuirá para produção de conhecimento sobre a patologia para futuras investigações sobre possíveis marcadores genéticos moleculares diagnósticos e prognósticos. Os resultados obtidos nesta pesquisa serão comparados aos já existentes na

literatura científica e serão tornados públicos, sejam eles favoráveis ou não.

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho

Bairro: Bloco C, Sala 7, Comitê de Ética

CEP: 65.080-040

UF: MA

Município: SÃO LUIS

Telefone: (98)3272-8708

Fax: (98)3272-8708

E-mail: cepufma@ufma.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO/MA



Continuação do Parecer: 1.308.275

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa esta muito bem elaborada com um forte referencial teórico bons objetivos excelentes materiais e métodos, e demais elementos necessários ao bom andamento do projeto de pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados e estão de acordo com a resolução 466/12 do CNS.

Recomendações:

Todas as recomendações foram acatadas e corrigidas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências foram acatadas ou esclarecidas e corrigidas pela pesquisadora e estão de acordo com a resolução 466/12 do CNS.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_246615.pdf	29/10/2015 15:48:44		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CARTALIME.pdf	29/10/2015 15:46:25	SILMA REGINA FERREIRA PEREIRA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CARTAGYLEANES.pdf	29/10/2015 15:46:04	SILMA REGINA FERREIRA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CARTALABGEM.pdf	29/10/2015 12:37:35	SILMA REGINA FERREIRA PEREIRA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CARTALabimunofisiologia.pdf	29/10/2015 12:31:36	SILMA REGINA FERREIRA PEREIRA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CARTAAAnaPaula.pdf	29/10/2015 12:29:12	SILMA REGINA FERREIRA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CartaMartaBelfort.pdf	29/10/2015 12:23:47	SILMA REGINA FERREIRA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CARTALEUDIVAN.pdf	29/10/2015 12:23:15	SILMA REGINA FERREIRA	Aceito
Outros	RESPOSTAAOPARECERCapeniano.pdf	28/10/2015 19:20:31	SILMA REGINA FERREIRA	Aceito
Outros	FichaSujeitodapesquisa.pdf	28/10/2015 18:57:15	SILMA REGINA FERREIRA	Aceito
Declaração de Instituição e	Anuenciainstituicao.pdf	28/10/2015 18:56:25	SILMA REGINA FERREIRA	Aceito

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho
 Bairro: Bloco C, Sala 7, Comitê de Ética CEP: 65.080-040
 UF: MA Município: SAO LUIS
 Telefone: (98)3272-8708 Fax: (98)3272-8708 E-mail: cepufma@ufma.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MARANHÃO/MA**



Continuação do Parecer: 1.308.275

Infraestrutura	Anuenciainstituicao.pdf	28/10/2015 18:56:25	SILMA REGINA FERREIRA	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	28/10/2015 18:53:22	SILMA REGINA FERREIRA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CARTARONALD.pdf	28/10/2015 18:48:31	SILMA REGINA FERREIRA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CARTAJAQUELINE.pdf	28/10/2015 18:41:54	SILMA REGINA FERREIRA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CARTAJuliana.pdf	28/10/2015 18:38:21	SILMA REGINA FERREIRA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CARTAcaxito.pdf	28/10/2015 18:38:00	SILMA REGINA FERREIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	28/10/2015 18:33:36	SILMA REGINA FERREIRA PEREIRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCancerPenianoPlataformaBrasil2 015FINAL.pdf	28/10/2015 18:33:19	SILMA REGINA FERREIRA PEREIRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCancerPenianoPlataformaBrasil2 015FINAL.docx	28/10/2015 18:33:05	SILMA REGINA FERREIRA PEREIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	28/10/2015 18:19:46	SILMA REGINA FERREIRA PEREIRA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO LUIS, 04 de Novembro de 2015

Assinado por:
Richard Diego Leite
(Coordenador)

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1968 CEB Velho

Bairro: Bloco C, Sala 7, Comitê de Ética **CEP:** 65.080-040

UF: MA **Município:** SAO LUIS

Telefone: (98)3272-8708 **Fax:** (98)3272-8708 **E-mail:** cepufma@ufma.br

ANEXO C: COMPROVANTE SUBMISSÃO DO ARTIGO

Date: Aug 01, 2017
To: "Juliana Mendes" julianamacedo.mendes@yahoo.com
From: "Journal of Urology" publications@auanet.org
Subject: Submission Confirmation for Down-regulated expression of the HPV-associated genes (TP53, RB and C-MYC), and up-regulated expression of inflammatory pathway markers (COX-2, PGE2 and EGFR) in penile squamous cell carcinomas.

Dear Dr. Mendes:

Your manuscript entitled Down-regulated expression of the HPV-associated genes (TP53, RB and C-MYC), and up-regulated expression of inflammatory pathway markers (COX-2, PGE2 and EGFR) in penile squamous cell carcinomas. has been received by *The Journal of Urology*.

You will be notified of the manuscript number once an Editor has been assigned. You will be able to check on the status of your paper by logging into Editorial Manager as an Author at <http://ju.edmgr.com/>.

The Editor will notify you of a decision within the next 4-6 weeks.

Thank you for submitting your manuscript to *The Journal of Urology*.

Sincerely yours,

Publications Administrator
The Journal of Urology
