



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



**ENVOLVIMENTO DO EIXO RANK/RANKL/OPG EM  
TUMORES PENIANOS E SUA ASSOCIAÇÃO COM O  
COMPORTAMENTO TUMORAL**

**JHESSICA IVANILDE SILVA GOMES**

**São Luís  
2019**

**JHESSICA IVANILDE SILVA GOMES**

**ENVOLVIMENTO DO EIXO RANK /RANKL/OPG EM  
TUMORES PENIANOS E SUA ASSOCIAÇÃO COM O  
COMPORTAMENTO TUMORAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão como pré-requisito para obtenção do título de mestre em Saúde do adulto.

Área de concentração: Processos biológicos em saúde

Linha de Pesquisa: HPV e câncer

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Maria Oliveira Brito

Co-orientadora: Profa. Dra. Haissa Oliveira Brito

Coordenadora: Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento

**São Luís  
2019**

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a)  
autor(a).

Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Gomes, Jhessica Ivanilde Silva.

Envolvimento do eixo RANK/RANKL/OPG EM TUMORES  
PENIANOS E SUA ASSOCIAÇÃO COM O COMPORTAMENTO  
TUMORAL / Jhessica

Ivanilde Silva Gomes. - 2019.

98 p.

Coorientador(a): Haissa Oliveira Brito. Orientador(a):  
Luciane Maria Oliveira Brito. Dissertação (Mestrado) -  
Programa de Pós-graduação em

Saúde do Adulto/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,  
São Luís- MA, 2019.

1. Câncer de pênis. 2. HPV. 3. OPG. 4. RANK. 5.  
RANKL. I. Brito, Haissa Oliveira. II. Brito, Luciane Maria

**JHESSICA IVANILDE SILVA GOMES**

**ENVOLVIMENTO DO EIXO RANK/RANKL/OPG EM  
TUMORES PENIANOS E SUA ASSOCIAÇÃO COM O  
COMPORTAMENTO TUMORAL**

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

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

---

Profa. Dra. Luciane Maria Oliveira Brito (Orientadora)  
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

---

Profa. Dra. Haissa Oliveira Brito (Co-orientadora)  
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

---

Profa. Dra. Elda Pereira Noronha Avila (Examinadora externa)  
Instituto Nacional de Câncer (INCA)

---

Prof. Dr. Rui Miguel Gil da Costa Oliveira (Examinador)  
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

---

Prof. Dr. Marcelo Magalhães Silva (Examinador)  
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

---

Profa. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento (Suplente)  
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

**Dedico**

A Deus por abençoar e iluminar meu caminho.

À minha mãe Ivanete por todo amor e apoio.

Ao meu irmão Jhonny por todo incentivo e companheirismo.

Ao meu namorado Yuri por todo companheirismo.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço em primeiro lugar a Deus por me dar proteção, sabedoria e por permitir a realização desse sonho.

À minha mãe, Ivanete Alves, por ser exemplo de determinação e por sempre me apoiar em todos os momentos.

Ao meu irmão Jhonny Gomes, por todo incentivo, amor, palavras de carinho e orientação para alcançar meus objetivos. Você é o meu orgulho.

Ao meu namorado Yuri Victor, por estar sempre ao meu lado.

Aos meus queridos sogros, Ana Tereza e Jailson Pinto por todo acolhimento e palavras de motivação.

À minha amiga Maria de Lourdes por me incentivar e sempre me apoiar.

Aos meus familiares que se fizeram presente ao longo dessa caminhada, obrigada pela confiança.

Agradeço imensamente minha orientadora Luciane Maria Oliveira Brito por me orientar e por me dar todo suporte para eu concluir essa etapa da minha carreira profissional.

À minha co-orientadora Haissa Oliveira Brito, muito obrigada por me acolher de braços abertos e por acreditar em mim. Agradeço a Deus pela sua vida e por todo conhecimento.

À professora Dra. Flávia Vidal, obrigada por todo conhecimento.

A Ana Paula Almeida Cunha uma amiga que o mestrado me deu. Obrigada por estar comigo em todos os momentos dessa caminhada.

Ana Paula Abreu uma amiga especial, agradeço por toda ajuda e pelos sorrisos que deixavam meus dias mais alegres.

Aos alunos Carlos Álvaro, Bruno, Érica e Sílvia que contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos amigos Daniel Reis, Daniele e Fernanda Lima obrigada por todo apoio prestado.

À Profa. Maria do Desterro, José, Emanuel e toda a coordenação do Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto, pelo apoio e ajuda ao solucionarmos dificuldades ao longo de todo este percurso.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto, obrigada por todos os ensinamentos ao longo dessa jornada.

Ao Banco de Tumores e DNA do Maranhão (BTMA), onde foi possível realizar as etapas de extração e quantificação de DNA, PCR *Nested*, eletroferese em gel de agarose, extração e quantificação de RNA, conversão para cDNA e a técnica de qRT-PCR para conclusão deste trabalho.

Aos professores do Centro de Pesquisa Clínica do HUUFMA (CEPEC) por toda ajuda prestada.

A toda equipe médica e ao Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello (IMOAB), Hospital Geral e Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (HUUFMA) onde foi possível realizar a coleta das amostras.

A todos os pacientes que aceitaram participar da pesquisa.

A CAPES pela bolsa concedida durante o curso.

A FAPEMA, por todo apoio financeiro para realização da pesquisa.

A UFMA, junto ao programa PPGSAD.

“Eu reconheço que para ti nada é impossível e que nenhum dos teus planos pode ser impedido”

Jó 42,02

## RESUMO

O câncer de pênis (CP) é considerado uma neoplasia rara, com maior incidência em homens com idade superior a 50 anos. O Papilomavírus Humano (HPV) é um dos fatores de risco para o desenvolvimento desta doença. Nos últimos anos tem se buscado novos alvos terapêuticos para diversos tipos de câncer, entre eles o eixo RANK/RANKL/OPG, pois o mesmo permanece desregulado em alguns tumores. O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o envolvimento do eixo RANK/RANKL/OPG em tumores penianos e sua associação com o comportamento tumoral. Trata-se de um estudo quantitativo transversal com 59 amostras de tumores penianos armazenados no Biobanco de Tumores e DNA do Maranhão (BTMA). Dados sóciodemográficos foram obtidos através de um questionário, dados clínicos e histopatológicos foram coletados por meio de análise de prontuário. O DNA genômico das amostras foi extraído e realizado a PCR/*Nested* para identificação do HPV utilizando os *primers* PGMY e GP+ e em seguida a eletroferese em gel de agarose. Amostras positivas foram submetidas ao sequenciamento pelo método de Sangers para identificação do tipo viral. Para a expressão gênica do eixo RANK/RANKL/OPG foi realizado as etapas: extração e quantificação de RNA, conversão de RNA em cDNA através da enzima transcriptase reversa e reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real (qPCR). Observou-se que o maior quantitativo de homens tinha idade superior a 60 anos (63,0), renda de até 1 salário mínimo (51%), analfabetos (42,0%), residentes em municípios do interior estado do Maranhão (59%) e não haviam realizado circuncisão (68%). Quanto ao tipo de lesão, a ulcerada foi a mais predominante, representando 36% dos casos. Em relação ao subtipo histológico, o usual foi o mais prevalente (33,9%). Conforme a classificação do CP através do estadiamento TNM (T- tamanho do tumor, N – linfonodos, M – Metástase) 23,7% correspondiam aos estádios II e III. Houve uma prevalência de 73% de HPV nas amostras, sendo os subtipos 16 e 11 os mais encontrados. Na análise da expressão gênica do eixo RANK/RANKL/OPG observou-se que na comparação das medianas entre tecidos tumorais e não tumorais não houve associação estatisticamente significativa. Quando comparou-se o eixo com características clínicas não existiu nenhuma significância com as variáveis analisadas. A associação do eixo com a histopatologia e o estadiamento da lesão mostrou que a expressão do receptor RANK esteve associada com a ocorrência de invasão perineural e com lesão ulcerada em tecido tumoral. Na comparação do sistema com o HPV, houve correlação dos subtipos de HPV com a expressão de RANK e RANKL. O perfil dos pacientes foram homens acima de 60 anos de idade, de baixa escolaridade e que residiam em municípios do interior do estado do Maranhão. A alta prevalência de infecção por HPV nas amostras pode estar associado ao baixo nível socioeconômico e hábitos sexuais. A expressão do receptor RANK esteve associada com a ocorrência de invasão perineural um marcador de agressividade tumoral, o qual pode estar associado também com a presença de HPV. Maiores estudos devem ser realizados investigando o papel do eixo RANK, RANKL e OPG no carcinoma peniano, preferencialmente, utilizando outras técnicas como imunohistoquímica.

**Palavras-chave:** câncer de pênis, HPV, RANK, RANKL, OPG.

## ABSTRACT

Penile cancer (PC) is considered rare cancer, with a higher incidence in men over 50 years. Human papillomavirus (HPV) is one of the risk factors for the development of this disease. In recent years, new therapeutic targets have been sought for various types of cancer, including the RANK / RANKL / OPG axis, as it remains unregulated in some tumors. This study aimed to evaluate the involvement of the RANK / RANKL / OPG axis in penile tumors and its association with tumor behavior. This is a cross-sectional quantitative study of 59 penile tumors stored in the Maranhão Tumor and DNA Biobank (BTMA). Sociodemographic data were obtained through a questionnaire; clinical and histopathological data were collected through medical record analysis. Genomic DNA was extracted and performed Nested PCR for HPV identification using the primers PGMY and GP, followed by agarose gel electrophoresis. Positive samples were submitted to sequencing sangers method for viral type identification. For the expression of RANK / RANKL / OPG axis, the following steps were performed: RNA extraction and quantification, RNA-cDNA conversion using reverse transcriptase enzyme and real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR). It was observed that the largest number of men were over 60 years old (63.0), income up to 1 minimum wage (51%), illiterate (42.0%) and residents of municipalities in the interior state of Maranhão (59 %) and had not performed circumcision (68%). Regarding the type of lesion, ulceration was predominant, representing 36% of cases. Regarding the histological subtype, the usual was the most prevalent (33,9%). According to the classification of PC by TNM staging (T-tumor size, N - lymph nodes, M - metastasis), 23,7% corresponded to stages II and III. There was a 73% prevalence of HPV, with subtypes 16 and 11 being the most found. In the analysis of gene expression of the RANK / RANKL / OPG axis, it was observed that, in the comparison of the medians between tumor and non-tumor tissues, there was no statistically significant association. When comparing the axis with clinical characteristics, there was no significance between these variables. The association of the axis and histopathology and lesion staging showed that RANK receptor expression was associated with the occurrence of perineural invasion and with the ulcerated lesion in tumor tissue. HPV subtypes were associated with the expression of RANK and RANKL. The profile of the patients were men over 60 years of age, with low education and residing in municipalities in the interior of the state of Maranhão. The high prevalence of HPV infection in the samples may be associated with low socioeconomic status and sexual habits. RANK receptor expression was associated with the occurrence of perineural invasion, a marker of tumor aggressiveness, which may also be associated with the presence of HPV. Further studies should be performed to investigate the role of the RANK, RANKL and OPG axis in penile carcinoma, preferably using other techniques such as immunohistochemistry.

**Keywords:** Penile cancer, HPV, RANK, RANKL, OPG.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sistema de graduação de Broders .....	25
Tabela 2 - Classificação de Jackson para estadiamento do câncer de pênis .....	26
Tabela 3 - Sistema de classificação TNM .....	27
Tabela 4 - Sequência de <i>primers</i> utilizados na reação de PCR <i>Nested</i> para detecção do vírus HPV nas lesões penianas analisadas.....	40
Tabela 5 – Perfil sociodemográfico e hábitos de vida de 59 pacientes diagnosticados com câncer de pênis no Estado do Maranhão em 2017/2018 .....	47
Tabela 6 - Características associadas a fatores de risco e hábitos de vida de 59 pacientes diagnosticados com câncer de pênis no Estado do Maranhão em 2017/2018 .....	48
Tabela 7 - Características associadas aos antecedentes pessoais, familiar de Câncer de pênis e características clínicas de 59 pacientes diagnosticados com câncer de pênis no Estado do Maranhão em 2017/2018.....	49
Tabela 8 – Associação entre o HPV e as variáveis histopatológicas e o estadiamento da lesão de 59 pacientes diagnosticados com câncer de pênis no Estado do Maranhão em 2017/2018 .....	51
Tabela 9 - Comparação das medianas da expressão gênica de RANK, RANKL e OPG em tecidos tumorais de acordo com os parâmetros clínicos de pacientes diagnosticados com câncer de pênis (n=26) no Estado do Maranhão em 2017/2018.....	53
Tabela 10 - Comparação das medianas da expressão gênica de RANK, RANKL e OPG em tecidos tumorais de acordo com as características histopatológicas e estadiamento da lesão em pacientes diagnosticados com câncer de pênis (n = 26) no Estado do Maranhão em 2017/2018. ....	54
Tabela 11 - Comparação das medianas da expressão gênica de RANK, RANKL e OPG em tecidos tumorais com o HPV em pacientes diagnosticados com câncer de pênis no Estado do Maranhão em 2017/2018.....	55

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Composição do DNA circular do HPV e suas competências na patogênese do vírus.....	19
Figura 2 - Ciclo de vida do Papilomavírus Humano.....	20
Figura 3 - Classificação dos tipos de HPV baseado na sequência de nucleotídeos de proteínas do gene L1 do capsídeo viral .....	22
Figura 4 - Progressão do câncer cervical mediada pelo vírus HPV.....	23
Figura 5 - Interação das oncoproteínas do Papilomavírus Humano com proteínas supressoras de tumor do hospedeiro .....	24
Figura 6 - Fisiologia do RANK/RANKL /OPG.....	29
Figura 7 - A via RANK/RANKL controla a remodelação óssea.....	31
Figura 8 - Sinalização RANK/RANKL em células cancerígenas.....	32
Figura 9 - Direcionando o microambiente da metástase óssea da próstata .....	35
Figura 10 – Curva de amplificação de uma reação de qPCR.....	44
Figura 11 - Distribuição da detecção de HPV na amostra de pacientes diagnosticados com câncer de pênis no Estado do Maranhão em 2017/2018 .....	50
Figura 12 - Distribuição dos tipos de HPV de pacientes diagnosticados com câncer de pênis no Estado do Maranhão em 2017/2018.....	50
Figura 13 - Expressão gênica de RANK, RANKL E OPG de tecidos não tumorais e tumorais de pacientes diagnosticados com câncer de pênis (n=26) no Estado do Maranhão em 2017/ 2018 .....	52

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CEC	Carcinoma de células escamosas
CP	Câncer de pênis
CESC/UEMA	Centro de Estudos Superiores de Caxias da Universidade do Estado do Maranhão
DNA	Ácido Ribonucléico
FSC-GM	Fator estimulante de colônias granulocítica-macrofágica
HPV	Papilomavírus Humano
HUUFMA	Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão
IMOAB	Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IL-6	Interleucina 6
IST	Infecção sexualmente transmissível
LCR	<i>Long Control Region</i>
LGR4	Receptor 4 acoplado a proteína G
M-CSF	Fator estimulante de colônias de macrófagos
MMP-14	Matriz metaloproteinase 14
NF-kB	Fator nuclear Kappa B
OPG	Osteoprotegerina
ORF	Open Reading Frames
PCR	Reação em cadeia de Polimerase
pB	Pares de base
pRB	Proteína Retinoblastoma
RANK	Receptor ativador do fator nuclear kappa B
RANKL	Ligante do receptor do fator nuclear kappa B
RNA	Ácido desoxiribonucléico
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral- $\alpha$
TNM	T- tamanho do tumor; N – linfonodos e M – metástase
SV40	Simian vírus 40
UICC	União Internacional para o Controle do Câncer

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	16
<b>2.1</b>	<b>Epidemiologia do câncer de pênis</b> .....	16
<b>2.2</b>	<b>Etiologia do câncer de pênis</b> .....	17
<b>2.3</b>	<b>Papilomavírus Humano - HPV</b> .....	18
2.3.1	Classificação dos tipos de HPV.....	21
2.3.2	Carcinogênese mediada pelo HPV.....	22
<b>2.4</b>	<b>Aspectos Clínicos e Histopatológicos do câncer de pênis</b> .....	25
<b>2.5</b>	<b>Diagnóstico e Tratamento do câncer de pênis</b> .....	27
<b>2.6</b>	<b>RANK/ RANKL/OPG</b> .....	28
2.6.1	Fisiologia do RANK/RANKL /OPG.....	28
2.6.2	RANK/RANKL e o osso.....	30
2.6.3	RANK/RANKL/OPG e o câncer.....	32
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	37
3.1	Geral.....	37
3.2	Específicos.....	37
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	38
4.1	Tipo de estudo.....	38
4.2	Período e local de estudo.....	38
4.3	Critérios de inclusão/amostra.....	38
4.4	Critérios de exclusão.....	38
4.5	Coleta de Dados.....	38
4.5.1	Coleta das amostras.....	39
4.5.2	Extração e quantificação do DNA.....	39
4.5.3	PCR <i>Nested</i> .....	39
4.5.4	Visualização dos produtos amplificados.....	40
4.5.5	Purificação dos produtos de PCR.....	40
4.5.6	Sequenciamento pelo método de Sangers.....	41
4.6	Avaliação da expressão gênica do eixo RANK/RAKL/OPG.....	41
4.6.1	q/PCR.....	42
<b>5</b>	<b>ASPECTOS ÉTICOS</b> .....	45
<b>6</b>	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	46

<b>7</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>47</b>
<b>8</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>9</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>65</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>66</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>75</b>
	<b>ARTIGO.....</b>	<b>88</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer de pênis (CP) é considerado uma neoplasia rara, com maior incidência em homens com idade superior a 50 anos, mas pode atingir também os mais jovens (INCA, 2018). No Brasil, o câncer de pênis representa 2% de todos os tipos de câncer que atingem o homem, sendo mais frequente nas regiões norte e nordeste do país (BLEEKER et al., 2009; INCA, 2018). Entre os estados do Brasil, o Maranhão apresenta o maior número de casos de câncer de pênis, causado principalmente pelo baixo índice de desenvolvimento humano (COELHO et al., 2018).

A etiologia do câncer de pênis está associada a diversos fatores como: má higiene íntima, presença de fimose, tabagismo, ausência de circuncisão, baixas condições socioeconômicas, elevado número de parceiros sexuais e a infecção por Papilomavírus Humano (HPV) (BLEEKER et al., 2009; DIORIO; LEONE; SPIESS, 2016).

O HPV é um grande fator de risco para câncer de pênis, porém o seu papel no desenvolvimento da patologia ainda não está claro (PROWSE et al., 2008; SILVA et al., 2014). O HPV atinge o epitélio escamoso do órgão genital masculino da mesma forma que atinge o feminino, com formação de condilomas e alteração neoplásica, sendo os tipos 16, 18, 31 e 33 relacionados com carcinoma in situ e invasivo, tendo o HPV 16 como o tipo o mais frequente (PAULA; SOUZA; ALMEIDA, 2012).

O tipo histológico mais freqüente do CP é o carcinoma epidermóide, também denominado espinocelular ou escamoso (CEC), que representa 95% dos tumores malignos do pênis. O carcinoma in situ, também conhecido como eritroplasia de Queyrat e doença de Bowen, apresenta uma incidência considerável e manifestam-se na forma de modificações celulares epiteliais não invasivas (MOSCONI et al., 2005; CUBILLA; SANCHES; JOSE, 2016).

O diagnóstico de câncer peniano é feito por meio de biópsia incisional da lesão, cujos principais diagnósticos diferenciais são cancro sífilítico, cancro mole e condiloma simples ou gigante. O diagnóstico precoce é fundamental para evitar o desenvolvimento da doença e a amputação, que acarretam consequências físicas, sexuais e psicológicas para o paciente (CARVALHO et al., 2007; DIAS, 2013.).

Os tumores superficiais pequenos podem ser tratados por meio de excisão cirúrgica local, quimioterapia, cirurgia a laser ou terapia de radiação superficial, os tumores com extensão maior e invasão de nódulos regionais são controlados com cirurgia ou radioterapia, porém, aqueles tumores mais invasivos são tratados por penectomia parcial ou total, variando de acordo com a região acometida. Os pacientes que apresentam metástase inguinal devem realizar a linfadenectomia (REIS et al., 2010; NAM et al., 2017).

Nos anos 90, foi descoberto o sistema RANK (receptor ativador do fator nuclear Kappa B), RANKL (ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B) e OPG (osteoprotegerina) e que o mesmo estaria associado à diversas patologias. Ele permanece desregulado em diversos tumores como cânceres mamários, tumores malignos ósseos (mieloma múltiplo, tumores ósseos com células gigantes e condroblastoma), neuroblastoma, carcinoma celular escamoso e doença de Hodgkin. Ainda, a alteração desse eixo está implicada em metástase óssea (NYSQUIST; NELSON, 2017).

O receptor RANK e seu ativador RANKL tem sido alvo terapêutico chave em diversos tipos de câncer, dentre eles, alguns cânceres urológicos como o de próstata. A expressão de RANK / RANKL possui relação com o processo oncogênico, suas atividades são determinadas pela OPG, um receptor chamariz solúvel e seus ligantes, e pelo receptor 4 acoplado a proteína G (LGR4), um receptor de membrana capaz de ligar o RANKL (RENEMA et al., 2016).

Chen et al. (2006) verificaram um aumento na expressão de RANKL/RANK/OPG em diversas linhagens celulares de câncer de próstata, sugerindo que esse sistema poderia correlacionar com tumores mais agressivos, avançados e carcinoma metastático prostático.

Entretanto, nenhum estudo, até o presente momento, investigou o envolvimento desse eixo no desenvolvimento de carcinoma, em outro órgão reprodutor masculino, como o pênis. Considerando-se que o sistema RANK/RANKL/OPG encontra-se desregulado em vários tipos de tumores, o presente trabalho justifica-se pela necessidade de identificar o seu envolvimento no câncer de pênis.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Epidemiologia do câncer de pênis

O câncer de pênis é uma enfermidade rara em países considerados desenvolvidos. Contudo, em países dados como “em desenvolvimento”, como os da América do Sul, Ásia e África, esta neoplasia possui altos índices, chegando a 10% dos cânceres malignos em homens. Nos Estados Unidos e Europa, o câncer de pênis varia de 0,4 a 0,7% de todas as neoplasias que acometem homens (MARTINS et al., 2016). Em Israel, país onde se pratica circuncisão neonatal, é possível observar uma baixa incidência de câncer de pênis cerca de 0,1 a 0,2 casos para cada 100.000 homens (FORMAN et al., 2014). O Brasil encontra-se entre os países com grandes incidências de câncer peniano no mundo, apesar de não existir dados que confirmem com exatidão esta incidência (POW- SANG et al., 2010; REIS et al., 2010).

No Brasil, a condição de país em desenvolvimento pode explicar os 2,1% de cânceres em homens, e porque os habitantes da região Norte e Nordeste são mais afetados. A incidência de CP é de 8,3 casos para cada 100.000 habitantes no Brasil (BRAGA et al., 2011; DOORBAR, 2016). No Nordeste, a incidência pode chegar a até 5,7%, e 5,3% na região Norte (FAVORITO et al., 2008; SILVA et al., 2014; SOUSA et al., 2015). No Maranhão, de 2004 a 2014, 392 pacientes foram diagnosticados com câncer de pênis, resultando em uma média de 36 casos por ano. A taxa de incidência bruta foi de 1,18 por 100.000 homens por ano (COELHO et al., 2018).

O câncer de pênis afeta principalmente aqueles que possuem baixos níveis socioeconômicos e de educação. O Estado do Maranhão, um dos estados considerados mais pobres no país, é marcado por uma desigualdade social extrema, além de ter grande parte de sua população vivendo abaixo da linha da pobreza. Dessa forma, a população que vive em zonas rurais possui um déficit quando o assunto é acesso à saúde, o que faz com que estes procurem atendimento na capital somente em um estágio avançado da enfermidade (COELHO et al., 2018).

De acordo com o Ministério da Saúde, durante os anos de 1992 a 2007, aconteceram 6.716 penectomias no Brasil, destas, 419 (6,2%) aconteceram no estado do Maranhão. Estes dados, ainda que preocupantes, são desconsiderados e

insuficientes para o entendimento real do câncer de pênis no estado do Maranhão (COELHO et al., 2018).

A variação da incidência dos casos de CP está associada aos fatores de risco da doença e as condições de vida da população de cada região. Entre os fatores de risco mais conhecidos para o surgimento de câncer estão à falta de higiene, fimose, HPV (Papillomavirus Humano), fumo (uso de tabaco) e vida sexual com riscos (COUTO et al., 2014).

## **2.2 Etiologia do câncer de pênis**

Os fatores que fazem a probabilidade de o indivíduo apresentar câncer peniano aumentarem são: a falta de higiene, produção de esmegma, retenção de células descamativas e resíduos da urina na glande, persistência de fimose, padrão socioeconômico baixo, efeito de irritação crônica da pele e a quantidade de parceiros sexuais (INCA, 2018).

Por exemplo, o esmegma é a substância produzida por descamação das células epiteliais do prepúcio, e por secreção lubrificante que se acumula em homens cuja higiene íntima é má realizada, especialmente aqueles que possuem fimose. Este seria um agente carcinogênico, pela conversão de esteróis do esmegma em esteróis cancerígenos pelo *Mycobacterium smegmatis* (REIS et al., 2010; RAPÔSO et al., 2017). O evento de fimose é encontrado em aproximadamente 85% dos pacientes com câncer peniano, estando este ligado às lesões pré- cancerígenas (REIS et al., 2010).

Outros fatores relacionados a esta patologia são as doenças venéreas antecedentes, infecção provocada pelo HPV, uso de tabaco, líquen crônico, balanite xerótica obliterante e radiação ultravioleta. O aumento dos gânglios nas virilhas está entre as complicações diretas que podem ser um indício de metástase com repercussão trágica (GUIMARÃES et al, 2011; CARVALHO, 2016).

Segundo Diorio, Leone e Spiess (2016) o uso do tabaco tem sido considerado, também, um fator etiológico, colaborando ainda mais com a hipótese de que o fumo provoca câncer em todo o epitélio malpighiano.

Estudos dão indícios que de o HPV do tipo 16 é um risco para a mucosa peniana e estaria relacionado com a patogênese de um grupo de câncer do pênis.

Os estudos revelam ainda uma prevalência de 20 a 72% do vírus HPV relacionadas a lesões neoplásicas no pênis (MINHAS et al., 2010). Segundo dados do Ministério da Saúde, entre as detecções de IST, a infecção pelo HPV foi de 23,4%, tornando este o mais comum no Brasil, além de ser dada como uma doença pré-cancerígena. Em muitas situações são assintomáticos ou apresentam apenas prurido persistente (INCA, 2018).

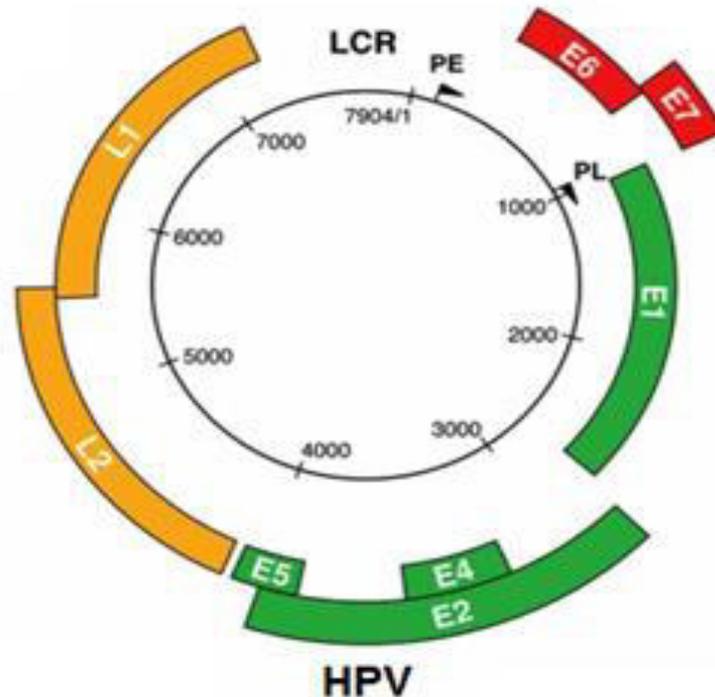
### 2.3 Papilomavírus Humano - HPV

Os papilomavírus são pequenos vírus de DNA, medem cerca de 50-55 nm, pertencem a família *Papillomaviridae*, gênero *Papillomavirus*. É um vírus não envelopado de simetria icosaédrica. Possui um genoma de aproximadamente 8.000 pares de bases de DNA dupla fita e circular. Mesmo pequeno, o vírus possui uma biologia molecular muito complexa. O DNA do vírus está relacionado a proteínas semelhantes a histonas, envolvidas por 72 capsômeros formados por duas proteínas estruturais, L1 e L2 (LETO et al., 2011).

O HPV possui um genoma formado por uma região denominada *Open Reading Frames* (ORF), onde encontra-se alocados genes capazes de realizar a codificação de proteínas, e outra área controladora denominada *Long Control Region* (LCR) (DE LIMA, 2013).

Em relação às ORFs estas podem possuir duas regiões: E (*early*) e L (*late*) (Figura 1). Na área E localizam-se os genes que são expressos no começo do ciclo viral, são os genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7. Estes genes são incumbidos pela transcrição do DNA do vírus, maturação e liberação das partículas virais, transformação e imortalização das células infectadas. Estes genes também são responsáveis por auxiliar na replicação e atuam regulando a expressão de genes virais. No mais, os genes E1 e E2 também são encarregados pela manutenção do DNA viral na forma episossomal durante as fases iniciais de infecção e durante a fase latente de infecção nas células da camada basal (HONG; LAIMINS, 2017; BANSAL et al., 2016).

**Figura 1** – Composição do DNA circular do HPV e suas competências na patogênese do vírus.



Fonte: Burk; Chen; Van Doorslaer (2009).

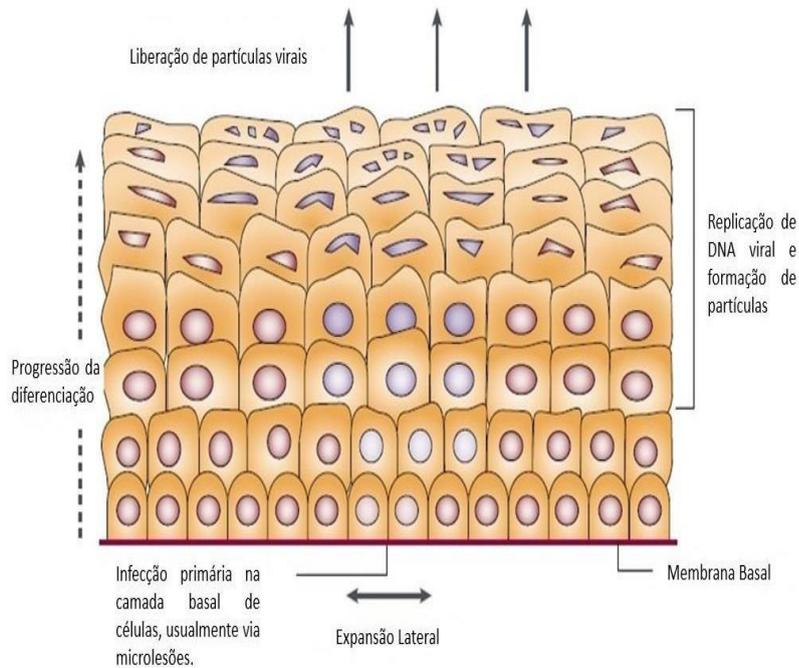
A área L é formada por genes que são expressos no ciclo tardiamente, sendo incumbidos pela introdução do DNA viral e pela codificação de proteínas do capsídeo viral. O gene L1 codifica grande parte do capsídeo viral e são expressos após o L2 no ciclo, participando da construção do vírion. As proteínas produzidas por L2 agem no transporte das proteínas L1 para o núcleo e no encapsulamento do DNA viral (DOOBAR, 2016; HONG; LAIMINS, 2017).

Em relação ao ciclo viral, no modelo de infecção viral em células epiteliais, o ciclo de replicação do HPV está relacionado ao processo de diferenciação destas células. Contudo, o epitélio é dado como a principal via biológica utilizada pelo vírus para a formação de novas cargas virais (DOOBAR, 2012).

A infecção ocorre inicialmente com o acesso da partícula infectada à camada basal do epitélio, o que só é viável por meio de microabrasões no epitélio estratificado, revelando a camada basal ao ambiente (HONG; LAIMINS, 2017). Uma vez dentro da célula, o DNA viral é liberado e conduzido até o núcleo onde irá

acontecer a replicação e manter sua forma episossomal – aproximadamente 100 cópias por célula (SPIESS et al., 2016; HONG; LAIMINS, 2017).

**Figura 2 – Ciclo de vida do Papilomavírus Humano**



Fonte: Zur Hausen (2002).

Na camada basal, a transcrição de genes precoces para a produção de vírions acontece através da expressão das proteínas E1 e E2 (Figura 2). No entanto, não se sabe o motivo do HPV infectar somente células da camada basal do epitélio escamoso, acredita-se que o fato esteja relacionado a receptores restritos a essas células. Após a divisão destas células, a proteína E2 regula a distribuição do DNA viral para as células filhas (SPIESS et al., 2016).

A maturação das células suprabasais, faz com que o ciclo viral progrida e passe a expressar as proteínas E6 e E7. A proteína E6 possui a função de prevenir que a célula entre em apoptose e a proteína E7 consegue estimular os mecanismos de replicação celular fazendo com que a célula entre na fase S do ciclo viral (Figura 3). A produção de E1 e E2 leva ao aumento da amplificação do genoma do HPV juntamente com os estágios de maturação de células epiteliais. Ocasionalmente, a partir da expressão das proteínas L1 e L2, o vírus é formado e consegue fugir das células epiteliais (SPIESS et al., 2016).

Estudos utilizando a técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) comprovam a presença deste vírus em 30% a 50% em casos de câncer peniano (CUBILLA et al., 2010).

### 2.3.1 Classificação dos tipos de HPV

De forma convencional, os papilomavírus são descritos por tipos, de acordo com a propensão das células infectadas à modificação maligna. São classificados em alto risco (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 e 82) e baixo risco (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72 e 81). No mais, as infecções que ocorrem por HPV de baixo risco são eliminadas com maior frequência e rapidez do que o contágio pelos tipos de alto risco (HUBBERS; AKGUL, 2015).

Os HPVs estão classificados nos seguintes gêneros: alfa-papilomavírus, beta-papilomavírus, gama-papilomavírus, mupa-papilomavírus e nupa-papilomavírus (Figura 3) (BANSAL; SINGH; RAI, 2016).

#### - Alfa-papilomavírus

Neste grupo encontram-se os HPVs com tropismo para epitélio genital, mas alguns tipos pertinentes a este gênero provocam verrugas vulgares. Apresentam-se os tipos de HPVs com alto risco para câncer, como os 16 e 18, reservados, respectivamente, nas espécies 9 e 7 deste gênero.

#### - Beta-papilomavírus

Este grupo abrange cinco diferentes espécies. Os vírus do tipo 5 e 8, pertencentes à espécie 1 deste gênero, são os tipos identificados normalmente na pele de indivíduos com epidermodisplasia verruciforme. Além desses, encontram-se nesse gênero, os HPVs cutâneos encontrados na pele da população geral sem lesões, demonstrando a onipresença e o alto acontecimento de infecções sem sintomas.

#### - Gama-papilomavírus

Engloba cinco espécies diferentes com sete tipos que provocam lesões cutâneas: HPVs 4, 48, 50, 60, 88, 65, 95.

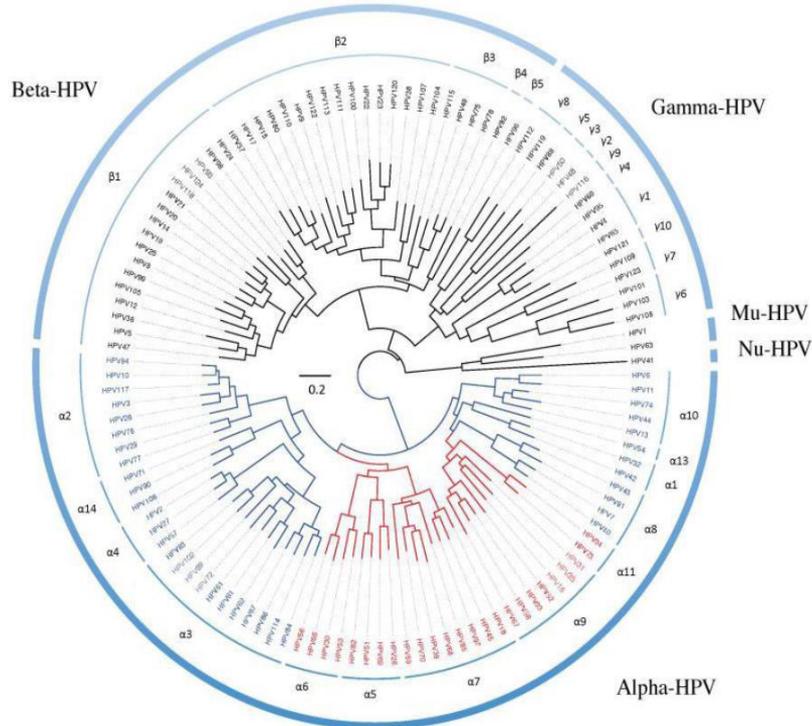
#### - Mupa-papilomavírus

Neste grupo estão os HPVs 1 e 63, com destaque para o HPV1, que é o tipo mais estudado e provoca verrugas palmares e vulgares.

#### - Nupa-papilomavírus

Este grupo contempla apenas uma espécie, o HPV 41.

**Figura 3** – Classificação dos tipos de HPV baseado na sequência de nucleotídeos de proteínas do gene L1 do capsídeo viral



Fonte: Harari; Chen; Burk ( 2014).

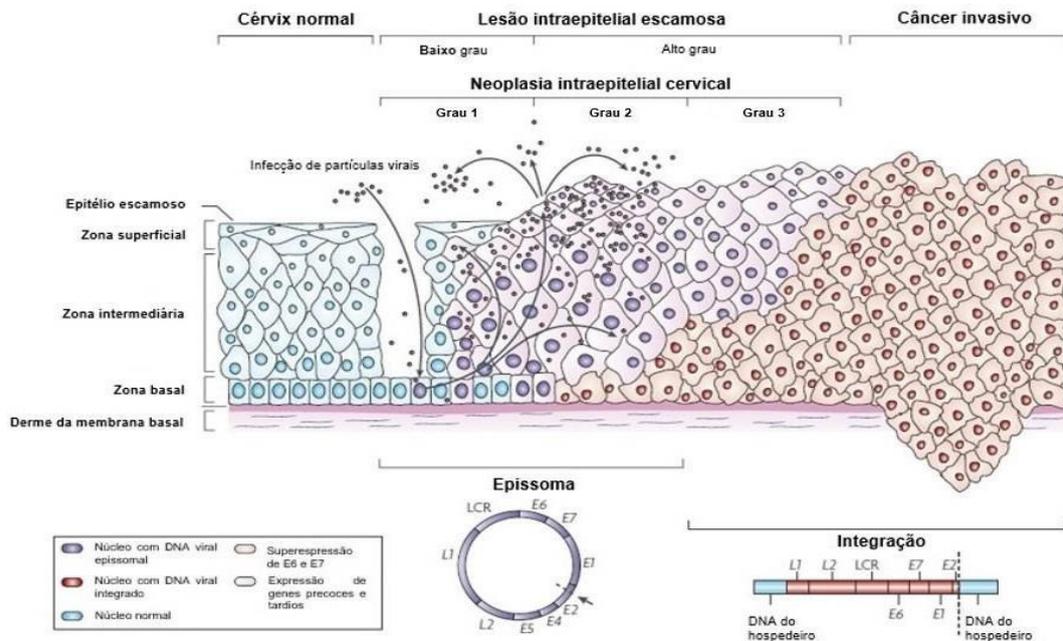
Contudo, os HPVs são englobados de acordo com o seu tropismo tecidual por certos tipos de epitélio e com a localização onde inicialmente foram isolados. A título de exemplo, o HPV 1 é um tipo cutâneo com alta taxa de replicação em epitélio queratinizado da área palmoplantar. O HPV 16 é um tipo mucoso, que prefere as regiões genitais, e o HPV 11, igualmente mucoso, tem sua replicação no tecido laríngeo e genital (LETO et al., 2011).

### 2.3.2 Carcinogênese mediada pelo HPV

Os fatores que podem levar o HPV a torna-se maligno estão relacionados tanto a carga viral, ao sítio, a persistência da infecção e a interação dos oncogenes virais E6 e E7, que são transcritos ativamente em células infecciosas (Figura 4). (HONG; LAIMINS, 2017; WALHART, 2015). Modernas técnicas de biologia molecular permitiram o estudo detalhado do processo de carcinogênese provocado por

proteínas do HPV, especialmente nos tipos estabelecidos como sendo de alto risco, como 16 e o 18 (MANSUR, 2001; DOORBAR, 2016).

**Figura 4 –** Progressão do câncer cervical mediada pelo vírus HPV.

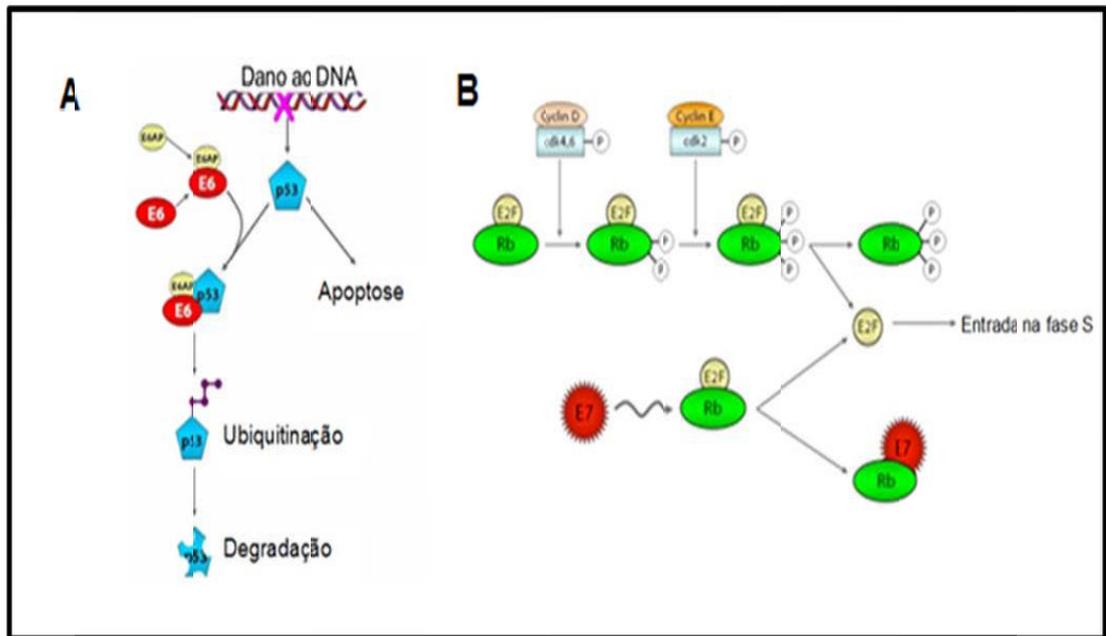


Fonte: Woodman et al. (2007).

A proteína E6 possui semelhança funcional com a proteína E1B de adenovírus e com a principal proteína T de SV 40 (simian vírus 40). A proteína E6 possui em torno de 150 aminoácidos e é detectada no núcleo e nas membranas não-nucleares. A totalidade das quatro repetições de cistina, que criam dois domínios denominados de “dedo de zinco”, é importante para a imobilidade e para grande parte das funções biológicas da E6. Estudos revelam que o gene E6 interage com a proteína p53, enquanto E7 une-se com proteína do retinoblastoma (pRB) para bloquear a ação dessas proteínas supressoras de tumor (Figura 5). A proteína E6, pertencente ao HPV-16, danifica e inativa a proteína celular p53 pela via de proteólise, intercedida pela ubiquitina. Inicialmente une-se a E6 um polipeptídeo celular do hospedeiro conhecido como polipeptídeo relacionado à E6 (E6-AP), este complexo age como uma ubiquitina-ligase, associando a ubiquitina à p53. A desintegração da p53 resulta no aumento da instabilidade genética e em um aglomerado de mutações oncogênicas. Esta mecânica in-vitro pode ser importante nas etapas incipientes da progressão do tumor (SCHIFFMAN et al., 2007; HONG; LAIMINS, 2017; WALHART, 2015).

O gene E7 possui uma homologia importante em sua sequência com os genes T de SV 40 e E1A de adenovírus. Esta ponderação foi criteriosa para a resolução das propriedades bioquímicas de E7. Esta proteína, com 100 aminoácidos, aproximadamente, é encontrada no citoplasma e no núcleo das células do vetor. A principal função do gene E7 é desregular o ciclo da célula infectada, induzindo esta a sair da fase G0 para a fase G1 e S (MANSUR 2001; BANSAL; SIGNGH; RAI, 2016).

**Figura 5** - Interação das oncoproteínas do Papilomavírus Humano com proteínas supressoras de tumor do hospedeiro.



Legenda: A) Mecanismo de degradação e inativação da p53 decorrente da ação da oncoproteína E6 do HPV. B) Mecanismo de inativação da pRB decorrente da ação da oncoproteína E7 de HPV. Fonte: MANSUR, 2001.

A zona N-terminal é importante para a ligação com a pRB. Normalmente a pRB se encontra ligada ao agente de transição E2F, incumbida de comandar a expressão de outros genes envolvidos no ciclo, mas que sustenta seu controle de ativação da transcrição dos genes reprimidos. A proteína E7 do tipo 16 de HPV, fosforilada, une-se às formas hipofosforiladas da pRB e esta ação libera o fator de transcrição E2F, ligado anteriormente à pRB. Então, a E2F ativa a transcrição dos genes relevantes para a síntese de DNA. Desta maneira, a proteína E7 perturba a evolução celular normal, promovendo, de forma ininterrupta, a expressão de genes encarregados pela divisão celular (WALHART, 2015).

## 2.4 Aspectos clínicos e histopatológicos do câncer de pênis

O CP é uma malignidade normalmente agressiva. Possui uma disseminação precoce para o linfonodo regional e prováveis metástases para regiões distantes como pulmão, cérebro e ossos (SONPAVDE et al., 2013). A glândula peniana é a região de origem mais comum, seguido pelo prepúcio, sulco coronal e haste. Grande parte dos indivíduos normalmente chega ao diagnóstico com uma lesão inflamatória ou úlcera na região peniana (HEYNS; MENDONZA-VALDEZ; POMPEO, 2010).

Para o Comitê Americano sobre o Câncer (AJCC) existem os seguintes subtipos de CEP (Carcinoma Epidermóide do Pênis): sarcomatóide, usual, basalóide, papilar, verrucoso, condilomatoso e misto. O principal subtipo do CEP é o usual, seguido pelo condilomatoso, verrucoso, papilar e basalóide. (CUBILLA; SANCHES; JOSE, 2016). Segundo Wanick (2011), as lesões malignas no pênis podem ser: vegetativas, ulcerativas e verrucosas.

Em relação à diferenciação histológica, esta é fundamentada pelo sistema de Gradação de Broders (Tabela 1). O sistema de Broders assenta-se essencialmente no grau de queratinização, quantidade de mitoses e no pleomorfismo nuclear. Assim, os grupos são identificados como: Grau I, Grau II, Grau III e Grau IV (PIZZOCARO et al., 2010).

**Tabela 1**– Sistema de Gradação de Broders.

<b>Parâmetro</b>	<b>Características</b>
Grau I	0 a 25% de células indiferenciadas
Grau II	25% a 50% de células indiferenciadas
Grau III	50% a 75% de células indiferenciadas
Grau IV	75% a 100% de células indiferenciadas

Fonte: Lourenço et al. (2006).

Em relação ao estadiamento tumoral a especificação usada segue dois critérios que permitem a identificação das características anatômicas, estruturais e histológicas que cada tumor avaliado possui e, esses padrões tratam-se de um clínico e histopatológico. O estadiamento clínico é dado pelo Critério de Jackson mostrado na tabela 2 (MENDES, 2017).

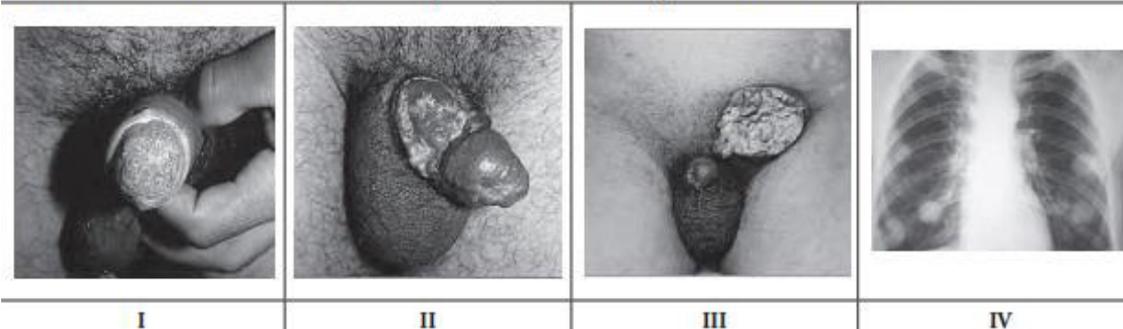
**Tabela 2 – Classificação de Jackson para estadiamento do câncer de pênis.**

**Estádio I:** Tumor limitado à glândula e/ou ao prepúcio

**Estádio II:** Tumor invade corpo cavernoso

**Estádio III:** Tumor com metástase(s) para linfonodo(s) inguinal(is)

**Estádio IV:** Tumor invade estrutura adjacente ou presença de linfonodos inoperáveis ou metástase(s) a distância



Fonte: Pompeo (2010).

Além de conduzir o tratamento, o estadiamento tumoral oferece informações sobre a possibilidade de cura e sobre a estimativa do tratamento. Um exame físico realizado de maneira criteriosa pode levantar suspeita sobre a localização tumoral e metástase. Linfadenopatia à averiguação e à palpação não são exames conclusivos, uma vez que metade desses casos não possui comprometimento linfonodal. De outra parte, 10 a 20% dos que não possuem linfadenopatia possui doença microscópica linfonodal (POMPEO, 2010).

O estadiamento histopatológico é dado pelo TMN (Tabela 3), este foi proposto pela União Internacional para o Controle do Câncer (UICC). Na classificação TMN cada letra equivale a uma categoria (T: tumor primário, tamanho, profundidade; N: invasão para linfonodos vizinhos; M: metástase à distância) (ONCOGUIA, 2017).

**Tabela 3 – Sistema de classificação TNM.**

<b>T – Tamanho do tumor e grau de Infiltração</b>	
<b>Tx</b>	Tumor não definido.
<b>T0</b>	Sem evidências de tumor primário.
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ (doença de Bowen ou Eritroplasia deQueyrat)
<b>Ta</b>	Carcinoma verrucoso não-invasivo.
<b>T1</b>	Tumor invadindo tecido conjuntivo sub-epitelial.
<b>T2</b>	Tumor invadindo corpo esponjoso ou cavernoso.
<b>T3</b>	Tumor invadindo uretra ou próstata.
<b>T4</b>	Tumor invadindo outras estruturas adjacentes.
<b>N – Situação dos linfonodos</b>	
<b>Nx</b>	Linfonodos regionais não podem ser avaliados.
<b>N0</b>	Ausência de metástase em linfonodos regionais.
<b>N1</b>	Metástase em um único linfonodo regional superficial.
<b>N2</b>	Metástase em linfonodos múltiplos ou bilaterais inguinais superficiais.
<b>N3</b>	Metástase em linfonodos regionais inguinais profundos ou pélvicos, uni ou bilaterais.
<b>M – Metástases</b>	
<b>Mx</b>	Presença de metástase à distância não pode ser avaliada.
<b>M0</b>	Ausência de metástase à distância.
<b>M1</b>	Presença de metástase à distância.
<b>M1a</b>	Metástases ocultas.
<b>M1b</b>	Metástases únicas em um único órgão.
<b>M1c</b>	Metástases múltiplas em um único órgão.
<b>M1d</b>	Metástases em múltiplos órgãos.

Fonte: Adaptado de Reis et al. (2010).

## 2.5 Diagnóstico e Tratamento do câncer de pênis

A fase inicial do diagnóstico de malignidade é a comprovação do diagnóstico e a avaliação da profundidade da invasão é realizada através de biópsia e análise microscópica (POMPEO, 2010). No mais, o tumor pode ser obscurecido pela fimose, e com isso mascarar o diagnóstico. Normalmente, os sintomas incluem sangramento e genitália com mau cheiro. Todas as lesões no pênis, especialmente aquelas em que o paciente possui um prepúcio não retrátil, devem ter uma atenção especial e deve ser investigado com suspeita de câncer. O exame de biópsia nessas situações é uma forma relevante de diagnóstico. Em grandes lesões, o diagnóstico pode ser obtido por biópsia incisional (BRASIL, 2017).

A realização da biópsia da lesão peniana é imprescindível para o diagnóstico do câncer de pênis, possibilitando avaliar a profundidade da invasão e o potencial da

diferenciação celular. No mais, o estudo histopatológico é relevante para o diagnóstico diferencial com outras doenças e para conduzir o tratamento. Os pontos a serem identificados na diferenciação do diagnóstico incluem condiloma acuminado, herpes, cancro mole e duro, linfogranuloma venéreo e tuberculose genital (NUNES et al., 2003; CARVALHO et al., 2007; DIAS, 2013). Uma prática simples e eficaz utilizada na prevenção do câncer de pênis é o autoexame do órgão, que realizado regularmente pode contribuir para detecção precoce dessa doença, melhorando o prognóstico e a sobrevida dos pacientes, a otimização da higiene do órgão é um fator também considerável na prevenção. (FAVORITO et al., 2008).

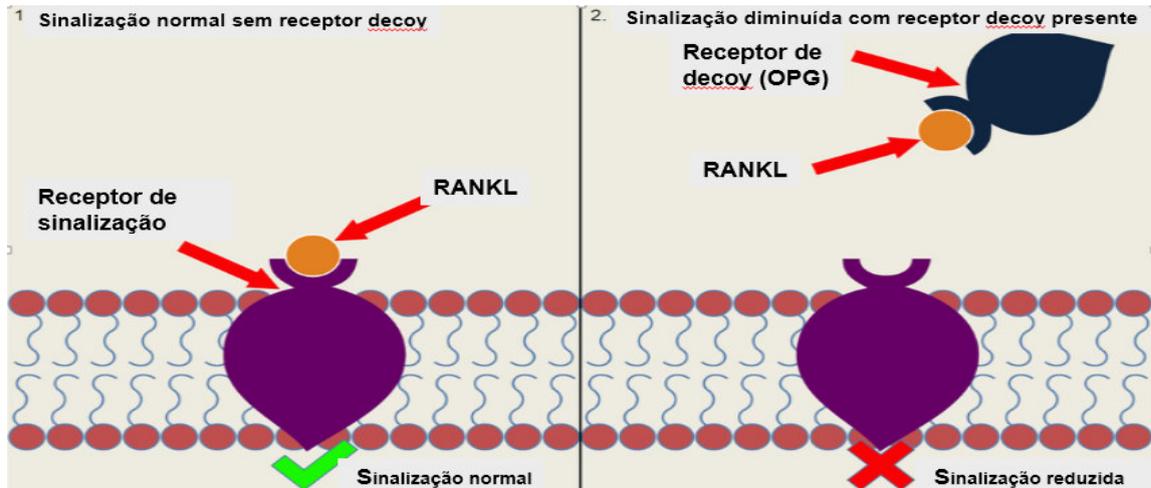
Segundo o INCA (2018), o tratamento do câncer de pênis consiste fundamentalmente na exérese da lesão primária do pênis, penectomia total ou parcial, relacionada à linfadenectomia inguinal bilateral com o objetivo de garantir uma sobrevida. Contudo, a cura é possível mesmo em casos de metástase inguinal (INCA, 2018). Os tratamentos de câncer peniano principais, combinados ou não de acordo com cada situação, são: cirurgia, radioterapia e quimioterapia (BRASIL, 2017).

## **2.6 RANK/ RANKL/OPG**

### **2.6.1 Fisiologia do RANK/RANKL /OPG**

A família do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) é formada por mais de 40 membros e está relacionada a uma quantidade igual de receptores de membrana ou solúveis. RANKL é um integrante da superfamília TNF- $\alpha$  (TNFSF11) e une-se a um receptor de membrana conhecido por receptor ativador do fator nuclear Kappa B, RANK, um integrante da superfamília de receptores TNF (TNFSF11A). As comunicações entre RANKL e RANK conduzem a uma transdução de sinal intracelular específica, que por sua vez é controlada por um receptor chamado osteoprotegerina ou OPG (TNFRSF11B) (Figura 6) (LACEY et al., 1998; RAO et al., 2018).

**Figura 6 – Fisiologia do RANK/RANKL /OPG.**



Fonte: Ashkenazi et al. ( 2002).

O RANK é um receptor de superfície celular, transmembrana, de tipologia 1 da família do TNF, este pode ser encontrado em células precursoras de osteoclastos, células dentríticas, células T e fibroblastos. RANK do ser humano é um peptídeo composto por 616 aminoácidos. Sua ativação é feita pelo RANKL e é seguida por sua ligação com integrantes da família dos receptores relacionados ao TNF (TRAF), ativação do NF- $\kappa$ B e c-Fos que estão associados ao processo de maturação osteoclástica. Após sua ativação, o RANK promove a maturação dos osteoclastos através do aumento da expressão de genes específicos (KHOSLA, 2001; ANDRADE, 2008).

Contudo, o RANK possui uma sinalização bastante complexa e pouco entendida, e com isso sua participação na proliferação de células tumorais vem sendo estudada, no intuito de descobrir futuramente o alvo para o tratamento anti-tumoral (BOYCE; XING, 2008).

O RANKL durante algum tempo foi nomeado como TRANCE (citocina induzida por ativação do fator de necrose tumoral), ligante da OPG (osteoprotegerina) e fator de variação osteoclástica. Por mais que RANKL seja a nomenclatura mais utilizada, a denominação oficial desta citocina é TNFSF11. RANKL é um peptídeo composto de 317 aminoácidos da família TNF. Possui forma distinta como uma citocina de membrana celular ou como fonte solúvel para vários tipos celulares como osteoblastos e linfócitos T (TYROVOLA et al., 2008).

Entre as isoformas, o RANKL de comprimento total é conhecido como RANKL1, sua forma mais curta é conhecida como RANKL2, nesta, uma parte do

domínio intra-citoplasmático é ausente e RANKL 3 é sua forma solúvel resultante da propagação da membrana RANKL induzida por várias enzimas como a MMP-14 (matriz metaloproteinase-14), TACE (enzima conversora de TNF- $\alpha$ ), ADAM-10 (proteína contendo desintegrina e a metaloproteinase 10) e MMP-7 (IKEDA et al., 2001; HIKITA et al., 2006; GEORGES et al., 2009).

O RANKL está presente em uma grande variedade de tecidos, como tecido mamário, pulmão, fígado, rim, intestino, pele, cérebro e outros, no entanto, tem uma concentração maior no tecido ósseo, em órgãos linfoides e no sistema vascular (KARTSOGIANNIS et al., 1999; HANADA et al., 2009; SHIMAMURA et al., 2014).

A OPG é um receptor que age juntamente do RANKL. Este é produzido por vários tipos celulares, como endoteliais, osteoblásticas e células imunes. É apontado como um receptor inibitório para RANKL, uma vez que bloqueia a interação RANKL/RANK. (BAUD'HUIN et al., 2007).

#### 2.6.2 RANK/RANKL e o osso

O sistema RANK/RANKL atua como importante regulador no desenvolvimento e ativação de osteoclastos. O osso está sendo constantemente remodelado, enquanto a deposição de osso novo depende de osteoblastos mediados por mesênquima, a degradação óssea é mediada por osteoclastos (NAGY; PENNINGER, 2015). Dessa forma, a osteoclastogênese pode ser induzida pelo ligante do receptor ativador do fator nuclear  $\kappa$ B (RANKL) e seu receptor RANK, enquanto a osteoprotegerina (OPG) atua como um receptor chamariz molecular solúvel. A expressão da OPG é regulada pelo estrogênio, a sua perda leva à diminuição dos níveis de OPG e a um aumento coordenado na atividade de RANKL. Esse eixo também participa do processo de regulação da imunidade adaptativa (NAGY; PENNINGER, 2015).

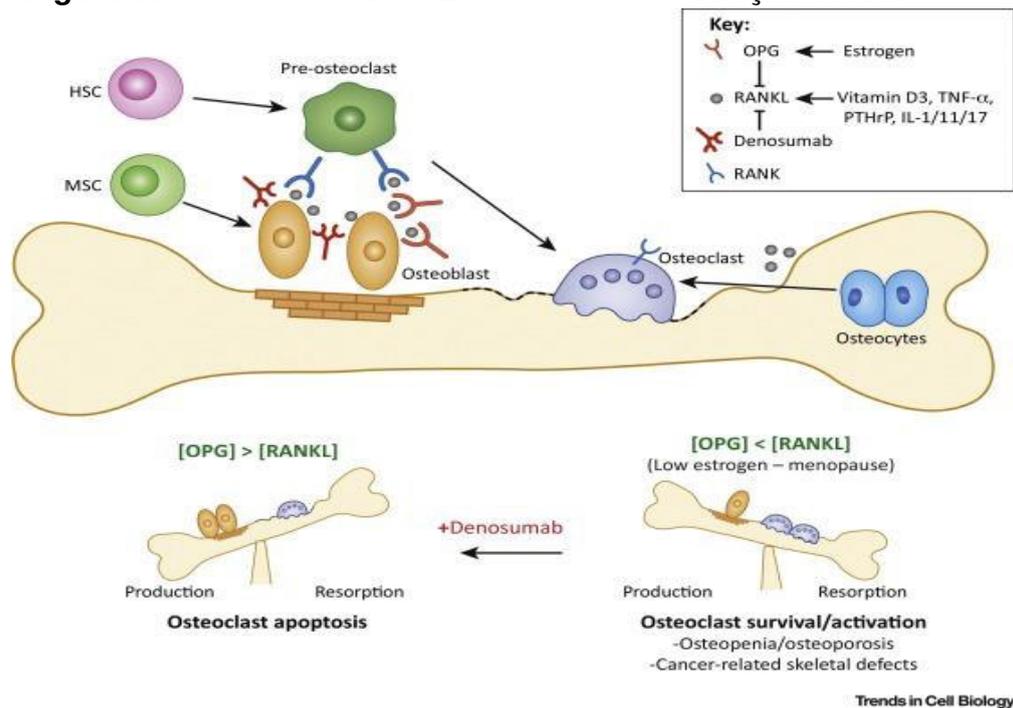
A maturação e diferenciação dos osteoclastos dependem de citocinas e fatores de crescimento, em humanos estão inclusos as interleucinas IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, TNF, fator estimulante de colônias granulocítica-macrofágica (FSC-GM) e fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF). Além de estimulação a proliferação celular, os fatores de crescimento podem desenvolver efeitos na locomoção, contratilidade, diferenciação e angiogênese celulares. Estes fatores de crescimento atuam na osteoclastogênese através de fatores parácrinos ou a estimulação de

células progenitoras, essenciais para o metabolismo ósseo, onde os osteoblastos e células progenitoras desempenham um papel central por meio de mediadores como RANK, RANKL e OPG (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

A ligação RANK/RANKL causa recrutamento de uma das várias moléculas adaptadoras incluindo o fator 6 associado ao receptor TNF (TRAF6). Esse recrutamento leva ativação de vias de sinalização, com NF- $\kappa$ B, família de proteínas quinases e c-Src, resultando em osteoclastogênese, sobrevivência, ou ativação de suas atividades reabsortivas. OPG é produzido para inibir a sinalização RANK/RANKL. ( ARMSTRONG et al.,2002).

Um novo receptor de RANKL foi descoberto, o receptor 4 acoplado à proteína G (LGR4). RANKL se liga ao domínio extracelular do LGR4 e dessa forma, regula negativamente a osteoclastogênese (RENEMA et al., 2016).

**Figura 7:** A via RANK/RANKL controla a remodelação óssea.



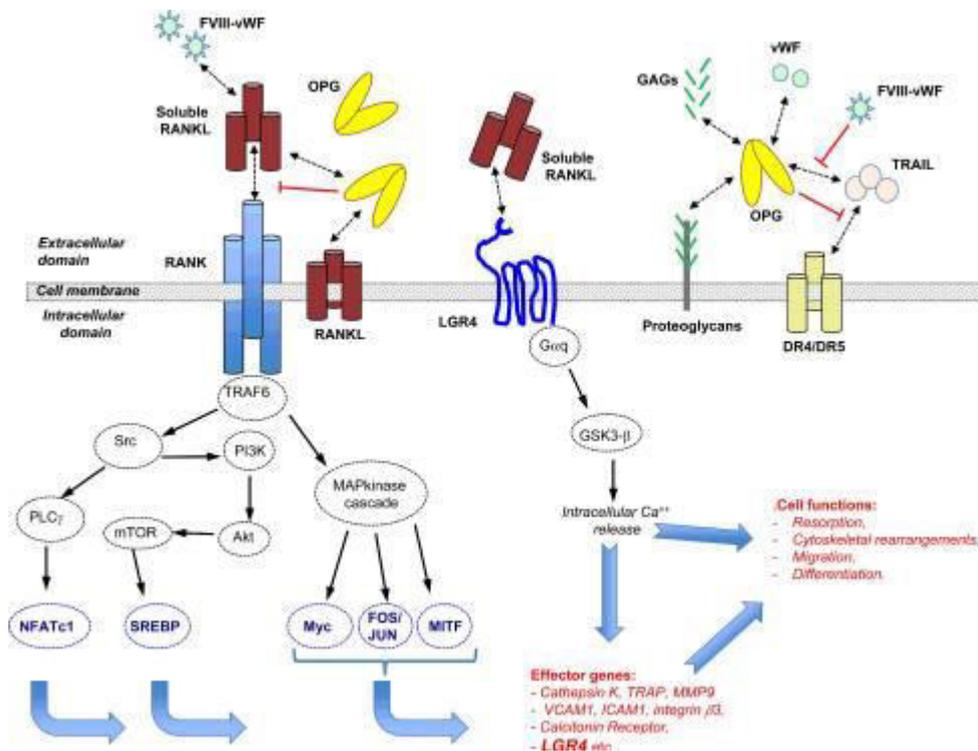
Legenda: Fatores de reabsorção óssea, como PTHrP, IL-1, IL-11, IL-17 e TNF- $\alpha$ , atuam nos osteoblastos para induzir o RANKL, que se liga ao RANK presente na superfície dos progenitores de osteoclastos (pré-osteoclastos). A interação de RANKL ligado a membrana ou solúvel com pré-osteoclastos expressando RANK induz sua diferenciação em osteoclastos multinucleados, bem como a ativação e sobrevivência de osteoclastos maduros. A expressão do OPG pode ser induzida por estrogênio, IL-4 ou fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e outros fatores. A OPG liga-se ao RANKL e, conseqüentemente, interfere com a interação RANKL / RANK, inibindo assim a reabsorção óssea. Os níveis relativos de OPG e RANKL são delicadamente balanceados para garantir uma estrutura óssea saudável. Em condições patológicas

como defeitos esqueléticos relacionados ao câncer há uma maior concentração de RANKL que leva ao desenvolvimento e ativação dos osteoclastos e, finalmente, à perda óssea. O anticorpo denosumab, ligando-se ao RANKL, demonstrou em ensaios clínicos contrariar tais efeitos. Fonte: Rao et al. (2018).

### 2.6.3 RANK/RANKL/OPG e o câncer

A expressão da tríade RANK/RANKL/OPG não se limita a tecidos saudáveis e estudos vêm demonstrando sua expressão em tecidos neoplásicos. Essa grande distribuição fortalece a ideia de seu importante papel no processo oncogênico. Renema et al. (2016) fez uma associação da tríade com alguns tipos de câncer, por meio de publicações existentes na literatura, chegando aos seguintes tipos: câncer de bexiga, carcinoma da mama, câncer cervical, condrossarcoma, câncer de cólon e reto, tumores endometriais, tumores esofágicos, tumores de células gigantes do osso, hepatocarcinoma, câncer de pulmão, linfoma, melanoma, mieloma, neuroblastoma, carcinoma escamoso oral, osteossarcoma, carcinoma da próstata, carcinoma renal, tumores do timo e adenocarcinoma da tireóide.

**Figura 8** – Sinalização RANK/RANKL em células cancerígenas.



Legenda: RANKL é um complexo trimérico produzido em uma membrana ou forma solúvel. O RANKL secretado pode ser produzido a partir de um transcrito específico ou por proteólise da sua forma de

membrana. O RANKL trimérico interage com um receptor denominado RANK e desencadeia uma cascata de sinalização controlando a transcrição de numerosos genes efetores. Protagonistas adicionais intervêm para regular a ligação do RANKL ao RANK. Deste modo, OPG atua como um receptor chamariz interagindo com RANKL, e o complexo VIII (FVIII-vWF) mostrou uma capacidade similar. No entanto, a OPG é controlada por muitos ligantes, incluindo TRAIL, vWF e glicoproteínas (GAG), e o efeito inibitório final da OPG no RANKL é dependente da sua ligação a estes ligantes. Recentemente, foi demonstrado que o LGR4 é um novo receptor de RANKL que pode contrabalançar o RANKL atividades transmitidas por sinalização. Fonte: Renema et al. (2016).

O RANK, como os outros receptores na superfamília de receptores de TNF, requer proteínas adaptadoras denominada fator associado ao receptor de TNF (TRAF) para transmitir a sinalização celular. O domínio intracelular de RANK tem dois locais de ligação ao TRAF capaz de interagir com TRAF 2, 3, 5 e 6 mas apenas as mutações TRAF 6 leva à ativação das cascatas Src / PLC $\gamma$  (proteína tirosina-quinase citoplasmática/fosfolipase C- $\gamma$ ) ,PI3K / Akt (fosfatidilinositol 3-quinase/proteína quinase b) / mTOR (rapamicina em mamíferos)) e MAPK (proteína quinase mitogeneticamente ativada) que resultam na translocação de ativadores transcricionais incluindo NF- $\kappa$ B (fator nuclear kappa b), cFos, Jun ou MITF (fator transcricional associado a microfetalmia) e subseqüentemente, a transcrição de numerosos genes efetores envolvidos na reabsorção óssea, como catepsina K ou TRAP, na adesão celular e motilidade, como a molécula de adesão vascular 1 (VCAM1) ou molécula de adesão intercelular 1 (ICAM1). Isso explica os vários impactos funcionais que o RANKL tem sobre as células normais e cancerígenas (RAJU et al., 2011).

A OPG liga-se ao RANKL e controla fortemente a biodisponibilidade do RANKL na membrana celular. O desequilíbrio OPG / RANKL leva à reabsorção óssea, um fenômeno exacerbado pela produção de RANKL das células e contribui para estabelecer ambiente necessário para que as células tumorais sejam mantidas e proliferadas (HOLEN, 2002; SISAY; MENGISTU; EDESSA, 2017).

Dessa forma, é possível detectar uma alta porcentagem de células cancerígenas que expressam RANK em vários níveis. De fato, em 89% dos carcinomas identificados por Renema et al. (2016) apresentaram imunocoloração positiva para RANK e cerca de 60% dos casos possuíam mais de 50% de células cancerígenas positivas.

Igualmente, os cânceres de próstata, de acordo com Pfizner (2014), demonstram que a expressão mais alta de RANK no tumor inicial está relacionada a uma sensibilidade maior à quimioterapia, porém, existe um grande risco de recaída e morte, apesar dessa sensibilidade elevada. A expressão de RANK foi caracterizada

como sendo preditiva de prognóstico ruim em pacientes com metástase óssea, mas não em pacientes com metástase viscerais (ZHANG et al., 2012).

As células do sarcoma expressam RANK, cerca de 20% a 69% dependendo da série e a expressão está associada aos parâmetros clínicos. Trieb e Windhager (2015) retratam essa relação como sendo reversa entre a expressão de RANK e a sobrevida de vários pacientes com osteossarcoma porém, não ocorre uma resposta à quimioterapia. Os autores identificaram baixas taxas de sobrevida e cura em pacientes com tumores RANK positivos (TRIEB; WHINDHAGER, 2015).

O estudo de Bago-Hovarth (2014) revelou que a expressão de RANKL foi consideravelmente mais comum no osteossarcoma da extremidade inferior que em outra área e não identificou nenhuma relação relevante entre o RANKL e a sobrevida sem o osteossarcoma ou peculiar a enfermidade. Entretanto, o autor relata que a expressão RANK é um fator de prognóstico negativo no que diz respeito à sobrevida sem a doença, confirmando assim o resultado do estudo de Trieb e Windehager (2015).

Contudo, no ano de 2012, uma nova isoforma de RANK, denominada RANK-c, foi identificada por Papanastasiou; Sirinian e kalofonos (2012), esta nova isoforma é gerada através de um splicing alternativo e expressa em amostras de câncer mamário. Sua expressão foi relacionada inversamente com o grau histológico e RANK-c conseguiu inibir a motilidade celular e a migração de células cancerígenas da mama, intervindo na sinalização de RANK.

Em diversos estudos como o de Pfitizner (2014) e Bago-Horvath (2014), a expressão RANKL não foi relacionada a nenhum desfecho clínico em sarcoma e carcinoma. No entanto, em um grupo de 40 pessoas, Lee et al. (2011) revelou que a expressão de RANKL estava correlacionada a quimioterapia pré-operatória e que um alto nível de RANKL estava relacionado a uma sobrevida inferior.

Enquanto o RANK pode ser expresso por vários tipos de células cancerígenas, ainda não existem relatos de estudos que comparem o eixo RANK com o câncer peniano.

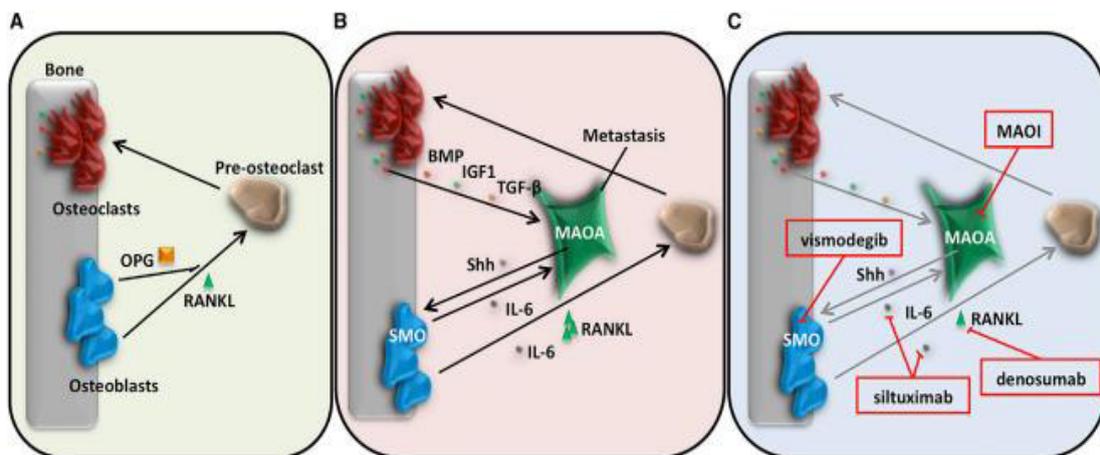
Os cânceres malignos podem ter tumores primários ou secundários metastatizados. O sistema RANK/ RANKL/OPG também exerce um papel importante em muitas malignidades em condições de metastatizar. Cânceres como o de mama, próstata, pulmão e outros. A tríade encontra-se, de longe, muito envolvida na fisiologia do crescimento de cânceres. A função do RANK/RANKL/OPG tem sido

implicada na patogênese de diversos tumores malignos raros, como o câncer de pulmão, carcinoma renal, hepatocelular e melanoma (ALBANY, 2014).

Os tipos de câncer, que preferencialmente metastatizam ao osso, incluem câncer de próstata e câncer de mama. O RANKL é altamente expresso no ambiente da medula óssea, ideia de que o RANKL poderia servir como um quimio-atrativo para células de câncer de mama e células de câncer de próstata. Esses dados identificaram RANKL como fator dentro do microambiente ósseo que favorece a disseminação de certas células cancerígenas para o osso (NAGY; PENNINGER, 2015).

As células tumorais metastáticas atuam interrompendo a homeostase metabólica do osso com consequentes fenótipos osteolíticos ou osteoblásticos, dependendo das combinações de citocinas e fatores de crescimento de interações tumorais e ósseas (NYQUIST; NELSON, 2017).

**Figura 9** – Direcionando o microambiente da metástase óssea da próstata



Legenda: (A) O osso normal é continuamente remodelado através de uma interação dinâmica entre osteoclastos, osteoblastos e outros constituintes ósseos residentes. (B) As células tumorais metastáticas interrompem a homeostase normal das interações das células ósseas e estabelecem novas relações através de fatores de ação parácrina como Shh e IL6 que resultam na liberação de fatores de crescimento sequestrados, como BMPs, IGF e TGFb, capazes de promover a progressão tumoral. (C) Vários medicamentos aprovados - incluindo inibidores da MAOA, o antagonista da via Shh, vismodegib, o anticorpo anti-IL6 siltuximab e o anti-RANKL o anticorpo denosumabe - tem o potencial de interromper as interações patogênicas entre as células tumorais e os componentes do microambiente ósseo. Fonte: Nyquist; Nelson (2017).

A atividade da monoamina oxidase A (MAOA), pode sequestrar os processos dinâmicos de remodelação óssea para iniciar um intercâmbio recíproco de fatores secretados que aumentam o crescimento tumoral (Wu et al., 2017). As células tumorais metastáticas interrompem a homeostase normal das interações das células

ósseas e estabelecem novas relações através de fatores de ação parácrina como Hedgehog Sônico Sérico (Shh) que funciona de um modo autócrino ou parácrino para promover a tumorigênese e a sobrevivência dos tumores e IL6 que resultam na liberação de fatores de crescimento, como BMPs, IGF e TGF $\beta$ , proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) e fator de crescimento transformador beta-beta (TGF  $\beta$ 2) capazes de promover a progressão tumoral. Vários anticorpos com função de interromper as interações patogênicas entre as células tumorais e os componentes do microambiente ósseo já foram aprovados, entre eles denosumabe (NYQUIST; NELSON, 2017).

Levando em consideração a função da tríade RANK/RANKL/OPG no desenvolvimento de células cancerígenas e metástases, a comunidade científica está se esforçando para descobrir sua associação com o câncer de pênis, e de ações terapêuticas direcionados ao TNF (SISAY; MENGISTU; EDESSA, 2017).

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Geral**

Avaliar o envolvimento do eixo RANK/RANKL/OPG no carcinoma peniano e sua associação com o comportamento tumoral.

### **3.2. Específicos**

- Caracterizar os indivíduos com câncer de pênis de acordo com seu perfil clínico, epidemiológico e histopatológico;
- Avaliar a prevalência da infecção pelo HPV nas amostras de carcinoma peniano;
- Analisar os tipos mais prevalentes de HPV nos tumores de pênis
- Determinar possíveis associações existentes entre a infecção pelo HPV e os aspectos histopatológicos;
- Avaliar os níveis de RANK/RANKL/OPG nas amostras de carcinoma peniano;
- Comparar os níveis de RANK/RANKL/OPG em tecidos tumorais e não tumorais;
- Comparar a expressão dos genes RANK/RANKL/OPG com os aspectos clínicos, histopatológicos e estadiamento baseados na classificação TNM;
- Correlacionar a expressão dos genes RANK/RANKL/OPG com o HPV;

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Tipo de estudo**

Trata-se de um estudo quantitativo com recorte transversal.

### **4.2 Período e local de estudo**

A pesquisa foi realizada no período de março de 2018 a abril de 2019 no laboratório multiusuário do Biobanco de Tumores e DNA do Maranhão (BTMA) com todas as amostras armazenadas no BTMA que foram coletadas em 3 hospitais de referência em oncologia no estado do Maranhão, Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Belo (IMOAB), Hospital Geral Tarquíneo Lopes Filho e Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (HU-UFMA).

### **4.3 Critérios de inclusão/amostra**

Foram incluídas nesta pesquisa todas as amostras biológicas de pacientes com câncer de pênis, que fizeram opção em conceder para utilização em pesquisas futuras sem novo contato; mas apenas condicionado à aprovação pelas instâncias éticas. O método de amostragem foi por conveniência. A amostra foi de 59 pacientes.

### **4.4 Critérios de exclusão**

Pacientes que não aceitaram participar da pesquisa.

### **4.5 Coleta de dados**

Os dados relacionados à investigação através do questionário sócio demográfico foram coletados nos arquivos do Biobanco de Tumores e DNA do Maranhão. Os dados clínicos e patológicos do paciente e do tumor (regiões

acometidas, estadiamento clínico, tipo histológico) foram obtidos diretamente do prontuário.

#### 4.5.1 Coleta das amostras

As amostras utilizadas estavam armazenadas no Banco de Tumores e DNA do Maranhão, essas amostras foram coletadas em 3 (três) hospitais de referência em Oncologia no Maranhão. O mapa de cirurgia dos hospitais era fornecido um dia antes da cirurgia para o BTMA. Antes de realizar o procedimento, a equipe convidava o paciente a participar da pesquisa e somente após assinar o termo de consentimento livre-esclarecido TCLE (Anexo A) e responder o questionário (Anexo B), que ele era encaminhado para a sala de operação. Para a pesquisa, foi coletado 1(um) fragmento de tecido sadio e 1(um) fragmento de tecido tumoral de tamanho mínimo 0,5 x 0,3 x 0,3cm colocados em um eppendorff contendo RNA later (Life Technologies®) à 4°C. O material coletado era armazenado em freezer -20° durante 24 horas e após 24 horas em freezer a -80°C até o uso.

#### 4.5.2 Extração e quantificação do DNA

O DNA das amostras foi extraído como descrito pelo manual de uso da Purelink Genomic DNA Kit (Invitrogen). O DNA extraído foi quantificado através do espectrofotômetro Nanovue (GE® USA). A pureza do DNA foi verificada a partir da leitura a 280nm, para a detecção de uma eventual contaminação da amostra por proteínas. Quando as relações entre as densidades ópticas, A260/280 foi entre 1,6 e 1,9 o material foi considerado puro.

#### 4.5.3 PCR *Nested*

O DNA do HPV foi identificado através da técnica de amplificação PCR-*Nested* utilizando o termocicler Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Thermo Fischer Scientific, Califórnia, USA).

Os *primers* utilizados foram os PGMY 09 e PGMY11 amplificando sequências de 450pb da região L1 do DNA viral no primeiro round e os *primers* GP+5 e GP+6 no segundo round que amplificam as sequências de 190pb da região L1 do DNA do vírus (VIDAL et al., 2012).

**Tabela 4** – Sequência de nucleotídeos dos *primers* utilizados na pesquisa.

<b>Primer</b>		<b>Sequência 5' - 3'</b>
<b>PGMY11</b>	PGMY11-A	GCA CAG GGA CAT AAC AAT GG
	PGMY11-B	GCG CAG GGC CAT AAT AAT GG
	PGMY11-C	GCA CAG GGA CAT AAT AAT GG
	PGMY11-D	GCC CAG GGC CAC AAC AAT GG
	PGMY11-E	GCT CAG GGT TTA AAC AAT GG
<b>PGMY09</b>	PGMY09-F	CGT CCC AAA GGA AAC TGA TC
	PGMY09-G	CGA CCT AAA GGA AAC TGA TC
	PGMY09-H	CGT CCA AAA GGA AAC TGA TC
	PGMY09-Ia	G CCA AGG GGA AAC TGA TC
	PGMY09-J	CGT CCC AAA GGA TAC TGA TC
	PGMY09-K	CGT CCA AGG GGA TAC TGA TC
	PGMY09-L	CGA CCT AAA GGG AAT TGA TC
	PGMY09-M	CGA CCT AGT GGA AAT TGA TC
	PGMY09-N	CGA CCA AGG GGA TAT TGA TC
	PGMY09-Pa	G CCC AAC GGA AAC TGA TC
	PGMY09-Q	CGA CCC AAG GGA AAC TGG TC
	PGMY09-R	CGT CCT AAA GGA AAC TGG TC
	HMB01b	GCG ACC CAA TGC AAA TTG GT
	<b>GP+5/6</b>	GP+5
GP+6		GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C

Fonte: autor próprio.

#### 4.5.4 Visualização dos produtos amplificados

A visualização dos produtos amplificados foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE1X. Uma alíquota de 5µL de DNA foi homogeneizada em uma solução de tampão de carregamento (Sigma-Aldrich, USA) e corante 0,1% de Gel Red sendo toda a mistura aplicada no gel. A eletroforese foi realizada por 30 minutos a 5V/cm<sup>2</sup> em cuba horizontal (Life Technologies, EUA). Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta (BIO-RAD Laboratories, EUA).

#### 4.5.5 Purificação dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram purificados com Purelink Kit de Purificação de DNA Genômico de acordo com o protocolo do fabricante (Invitrogen).

#### 4.5.6 Sequenciamento pelo método de Sangers

Para genotipagem dos subtipos virais foi realizado o sequenciamento pelo método de Sangers no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Estadual do Maranhão localizado no Centro de Estudos Superiores de Caxias- CESC-UEMA.

O kit utilizado foi o Big Dye ® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit de acordo com protocolo do fabricante.

#### 4.6 Avaliação da expressão gênica do eixo RANK/RANKL/OPG

Para isolamento da molécula de Ácido Ribonucleico foi utilizado o Rneasy Plus Micro kit (Qiagen) seguindo o seguinte protocolo:

1. Após a retirada do tecido da refrigeração a  $-80^{\circ}\text{C}$ , as amostras de trabalho foram cortadas e pesadas no máximo 30 mg e armazenadas em um tubo estéril;
2. Para cada amostra foi utilizado 600 $\mu\text{l}$  de buffer RLT e em seguida, utilizou-se o homogeneizador cerca de 20-40s, até a solução ficar homogênea, posteriormente, o material foi centrifugado por 3 minutos a 10.000 rpm para a retirada dos debrís insolúveis;
3. Após esse processo, o lisado foi centrifugado por 3 minutos e transferido para um novo tubo estéril e foi adicionado 450  $\mu\text{l}$  de isopropanol.
4. Em seguida, preparou-se o conjunto de uma coluna (RNeasy spin column), 2 tubos coletores e 1 tubo de eluição para cada amostra. Em sequência, foram adicionados 700  $\mu\text{l}$  do lisado para a coluna e centrifugou-se por 15 segundos a 10.000 rpm. Repetiu-se essa etapa em função do volume do lisado, descartando-se o volume residual entre cada etapa;
5. Após esse processo, foi adicionado 500  $\mu\text{l}$  de buffer RW1 à coluna, centrifugou-se por 15 segundos a 10.000 rpm.
6. Em seguida, adicionou-se 500  $\mu\text{l}$  de buffer RPE à coluna, centrifugou-se por 15 segundos a 10.000 rpm. Adicionou-se novamente 500  $\mu\text{l}$  de buffer RPE à coluna e centrifugou-se por 2 minutos.
7. A coluna foi colocada em um novo tubo de 1.5ml e adicionou-se 40  $\mu\text{l}$  de água RNase-free diretamente na coluna. Foi centrifugado por 1 minuto a 10.000 rpm.
8. O RNA extraído foi quantificado e armazenado a  $-80^{\circ}$  para posterior

conversão em Ácido Desoxirribonucléico Complementar. Para avaliação da pureza do RNA utilizou-se a relação A260/280, a qual foi considerada aceitável se estivesse entre 1,7 a 2,1.

Para a reação de transcriptase reversa utilizou-se o Kit SuperScript® IV First-Strand Synthesis System da Thermo Fisher Scientific®, seguindo o seguinte protocolo:

Inicialmente, o tampão 5x SSIV Buffer foi pré-aquecido a temperatura ambiente e reservado para utilização posterior;

1) Em seguida, preparou-se o mix de anelamento, ao combinar-se, nessa ordem, 1 µl de Random hexamers, 1 µl de dNTP mix a 10 mM, 13 µl de DEPC – água tratada e 11 µl de RNA purificado para cada amostra;

2) Após essa etapa, aqueceu-se o mix por 5 minutos a 65°C e, em seguida, incubou-se no gelo por pelo menos 1 minuto;

3) Em seguida, preparou-se o mix de transcrição reversa, ao combinar-se, nessa ordem, 4 µl do tampão 5x SSIV Buffer, 1 µl de DTT a 100 mM, 1 µl de inibidor de ribonuclease e 1 µl da SuperScript™ IV Reverse Transcriptase (200 U/µl) para cada amostra;

4) Após essa etapa, adicionou-se 7 µl do mix de transcrição reversa para cada amostra ao mix de anelamento, em incubou-se a reação por 10 minutos a 23°C, por 10 minutos a 55°C e por 10 minutos a 80°C. Em seguida armazenou-se o Ácido Desoxirribonucleico Complementar em refrigeração a - 20°C.

#### 4.6.1 qPCR

Para a Reação de Cadeia de Polimerase quantitativa em tempo real utilizou-se o Kit Power SYBR Green Master Mix da Thermo Fisher Scientific®, seguindo o seguinte protocolo:

1) Inicialmente, para a reação de cadeia de polimerase, preparou-se o mix Power Syber Green, contendo 6 µl de Power Syber Green, e o primer R e primer F a uma concentração de 0,3 µM e 4,5 µl de água ultrapura para cada gene alvo;

2) Após essa etapa, homogeneizou-se e distribuiu-se 11 µl do mix em cada poço da placa, de acordo com o número de reações;

3) Em seguida, acrescentou-se 1 µl de Ácido Desoxirribonucleico

Complementar das amostras em cada poço da placa, após esse processo, vedou-se a placa, tendo como volume final de 12 µl. Após preparação prévia, colocou-se a placa no aparelho StepOne e iniciou-se a reação;

Utilizou-se a seguinte ciclagem: 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C a 5 segundos, 54°C a 10 segundos, 95°C a 15 segundos, 60°C a 1 minuto e 95°C a 15 segundos.

A Reação em Cadeia de Polimerase em tempo real foi realizada no Sistema de Detecção de Sequência StepOne para os seguintes *primers*:

- GAPDH *forward*, 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGT-3', e *reverse*, 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'. O GAPDH foi utilizado como gene de referência;

- RANK *forward*, 5'-AGGGAAAGCACTCACAGCTAAT-3', e *reverse*, 5'-ACATGCTCCCTGCTGACC-3';

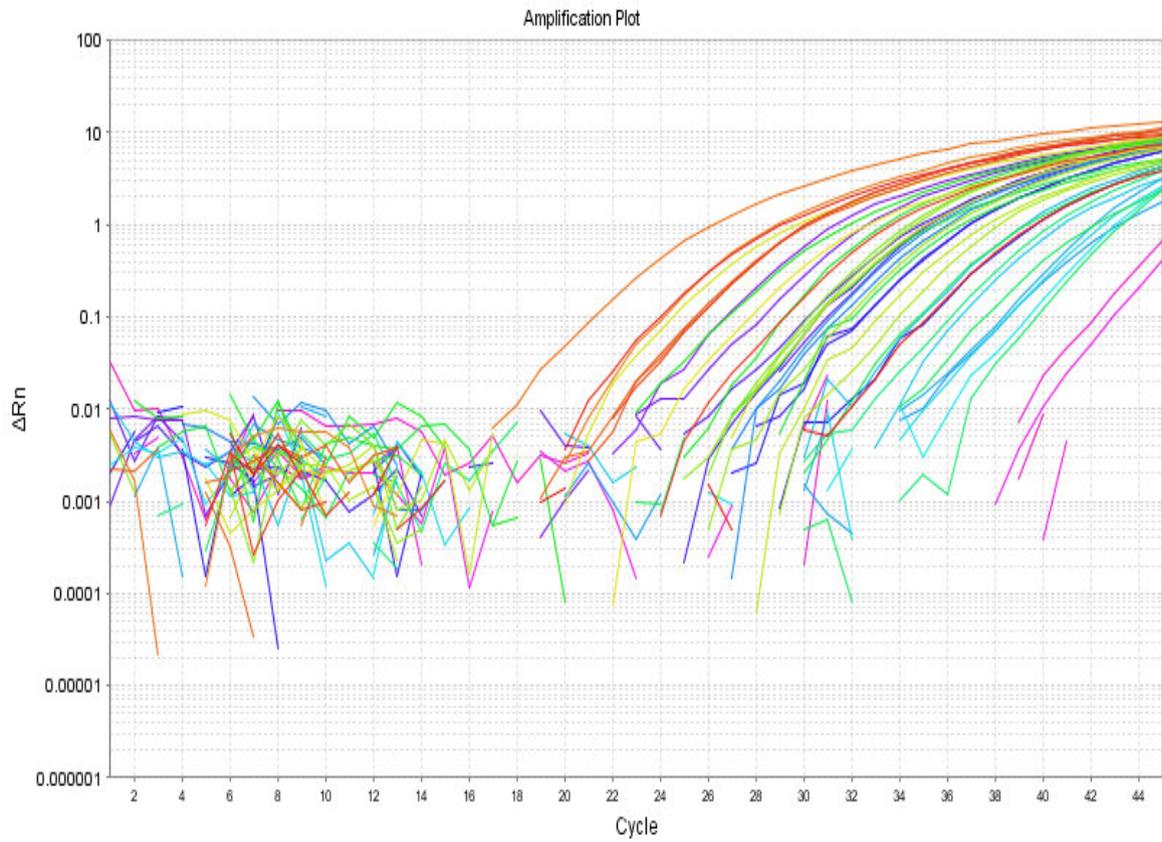
- RANKL *forward*, 5'-ACTTTATGGGAACCAGATGGG-3', e *reverse*, 5'-CGAAAAGGAATTACAACATATCGTT-3' e;

- OPG *forward*, 5'-GAAGCTGGAACCCAGAG-3', e *reverse*, 5'-GTGTTGCATTTCTTTCTGAGTTA-3' (XIONG, 2016).

O resultado da reação é expresso em valor de CT, que se refere ao número de ciclos de PCR necessários para que o sinal fluorescente atinja o limiar de detecção. À medida que se inicia a reação o programa gera um gráfico onde é realizada a quantificação da intensidade de fluorescência a cada novo ciclo de reação. Ao final da reação, é estabelecido o limiar de detecção denominado *threshold*. A quantificação do material genético é estabelecida no ponto onde ocorre a intersecção do *threshold* com a curva de amplificação, estes valores são expressos em CT (*Cycle threshold*) e se referem à quantidade de ciclos necessários para que a amostra atinja o limiar de detecção na fase exponencial da amplificação. Desta forma, quanto maior a quantidade de material genético presente na reação, menor é o número de ciclos necessários para a detecção da intensidade de fluorescência (Figura 10).

A expressão de RANK/RANKL/OPG foi analisada partir dos valores obtidos de CT da reação e utilizando o cálculo de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . A expressão de cada gene alvo foi normalizada de acordo com o gene de referência (GAPDH) (XIONG, 2016). Os resultados foram transferidos para planilhas e agrupados de acordo com o tecido analisado para realização da análise estatística.

**Figura 10** – Curva de amplificação de uma reação de qPCR.



Fonte: elaborado pela autora

## **5 ASPECTOS ÉTICOS**

O seguinte estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HUUFMA com parecer de nº 2.546.916, de acordo com as normas para pesquisa envolvendo seres humanos (Resolução CNS nº466/12).

## 6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados foram armazenados num banco de dados no programa excel e foi realizada a análise descritiva das variáveis em estudo. As variáveis categóricas foram analisadas utilizando o teste qui- quadrado de Pearson ou o teste exato de Fisher. As variáveis contínuas tiveram sua normalidade testada através do teste Shapiro-Wilk. Em seguida, diferenças entre os grupos foram investigadas utilizando o teste de Mann-Whitney ou Kruskal–Wallis e o teste de Dunn para comparações pairwise. Um nível de significância de 5% foi adotado e as análises realizadas com o *software* Statistical Package for Social Sciences, SPSS® versão 24.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## 7 RESULTADOS

Foram analisados os dados de 59 homens que realizaram penectomia parcial ou total. O maior quantitativo de homens estavam com idade superior a 60 anos (63,0%), sendo a idade média de 65 anos de idade e a maior e menor idade foram respectivamente, 97 e 23 anos, declararam ser de cor não branca (73,0%), relataram ter união conjugal estável (61,0%), recebem até 1 salário mínimo como renda (51,0%), analfabetos (42,0%) e residentes em municípios do interior do Estado do Maranhão (59,0%). Quanto aos hábitos de vida, verificou-se que 47% dos participantes já usaram tabaco e 58% já consumiram álcool.

**Tabela 5** – Perfil sociodemográfico e hábitos de vida de 59 pacientes diagnosticados com câncer de pênis no Estado do Maranhão em 2017/2018.

Variáveis	Frequência	
	n	%
<b>Faixa etária</b>		
Até 60 anos	19	(32,0)
Maiores que 60 anos	37	(63,0)
Sem informação	3	(5,0)
<b>Cor da pele</b>		
Branca	13	(22,0)
Não branca	43	(73,0)
Sem informação	3	(5,0)
<b>Estado civil</b>		
Com união estável	36	(61,0)
Sem união estável	11	(19,0)
Outro	8	(14,0)
Sem informação	4	(7,0)
<b>Renda</b>		
> 1 salário	18	(31,0)
≤ 1 salário	30	(51,0)
Sem informação	11	(19,0)
<b>Escolaridade</b>		
Analfabeto	25	(42,0)
Até 8 anos de estudo	22	(37,0)
Mais de 8 anos de estudo	7	(12,0)
Sem informação	5	(8,0)
<b>Local de residência</b>		
São Luís	16	(27,0)
Interior do Maranhão	35	(59,0)
Outro estado	5	(8,0)
Sem informação	3	(5,0)
<b>Tabagismo</b>		
Não	19	(32,0)
Ex-tabagista	28	(47,0)
Atual tabagista	8	(14,0)
Sem informação	4	(7,0)
<b>Etilismo</b>		
Não	9	(15,0)

Continuação

Continuação

Ex-etilista	34 (58,0)
Atual etilista	11 (19,0)
Sem informação	5 (8,0)

A tabela 6 expressa os fatores de risco e hábitos de vida dos participantes da pesquisa. A maioria dos homens informou ter realizado o primeiro coito com menos de 18 anos (58,0%), 32,0% tiveram mais de 10 parceiras sexuais durante a vida, 61,0% relataram ter parceiro sexual fixo, 68,0% não realizaram circuncisão, 44,0% nunca utilizaram preservativo durante a vida sexual e 61,0% relataram não praticar sexo anal. Notou-se também que 59,0% sempre realizavam a higiene após a relação sexual e 44% sinalizaram a ocorrência de alguma Infecção sexualmente transmissível (IST) prévia.

**Tabela 6** – Características associadas a fatores de risco e hábitos de vida de 60 pacientes diagnosticados com câncer de pênis no Estado do Maranhão em 2017/2018.

Variáveis	Frequência	
	n	%
<b>Idade do 1º coito</b>		
< 18 anos	34	(58,0)
≥ 18 anos	7	(12,0)
Sem informação	18	(31,0)
<b>Número de parceiros sexuais durante a vida</b>		
Até 10	14	(24,0)
Mais que 10	19	(32,0)
Sem informação	26	(44,0)
<b>Parceiro sexual fixo</b>		
Não	12	(20,0)
Sim	36	(61,0)
Sem informação	11	(19,0)
<b>Circuncisão</b>		
Não	40	(68,0)
Sim	6	(10,0)
Sem informação	13	(22,0)
<b>Uso de preservativo</b>		
Sempre	2	(3,0)
Às vezes	20	(34,0)
Nunca	26	(44,0)
Sem informação	11	(19,0)
<b>Prática de sexo anal</b>		
Não	36	(61,0)
Sim	8	(14,0)
Sem informação	15	(25,0)
<b>Higiene genital após relação sexual</b>		
Não	10	(17,0)
Sim	35	(59,0)
Sem informação	14	(24,0)
<b>Relato de IST prévia</b>		
Não	18	(31,0)
Sim	26	(44,0)
Sem informação	15	(25,0)

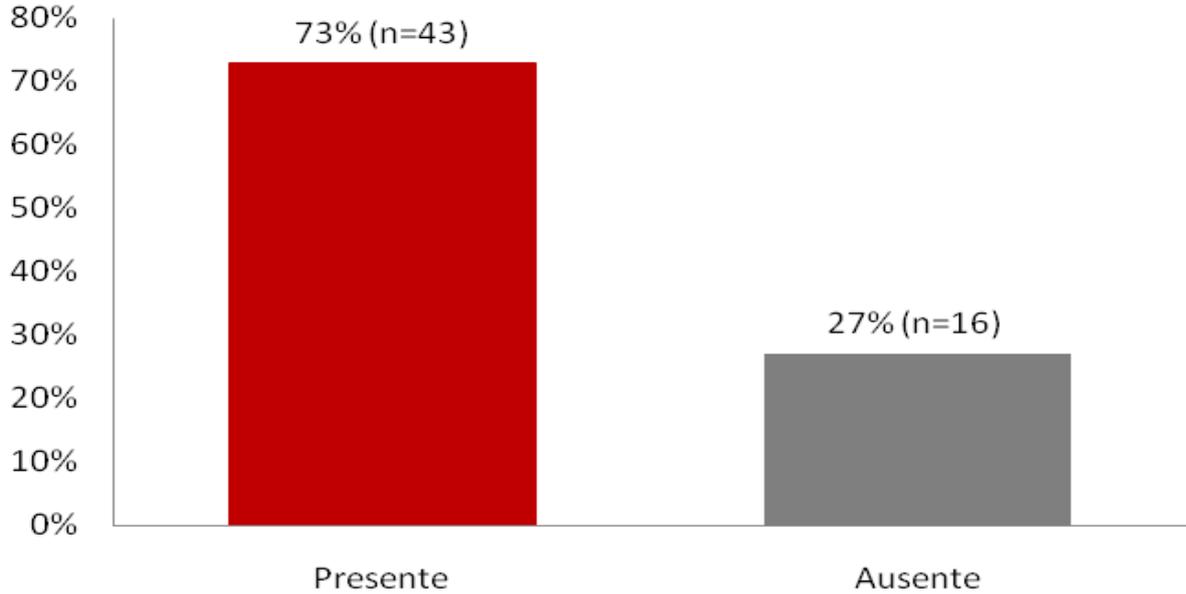
Na tabela 7, observa-se que 54,0% dos homens informaram não existir outros casos de câncer na família, embora 8,0% relataram que outros membros da família já tiveram câncer de pênis. Observou-se que 3 homens (5,0%) já haviam sido diagnosticados com câncer anteriormente. No que se refere a região anatômica afetada pela lesão, a glândula ocupa 81,0% dos casos, seguido pelo prepúcio (39,0%) e haste do pênis (10,0%).

**Tabela 7** – Características associadas aos antecedentes pessoais, familiar de Câncer de pênis e características clínicas de 59 pacientes diagnosticados com câncer de pênis no Estado do Maranhão em 2017/2018.

Variáveis	Frequência	
	n	%
<b>Relatos de câncer na família</b>		
Sem relatos	32	(54,0)
Câncer de pênis	5	(8,0)
Outros tipos de câncer	10	(17,0)
Sem informação	12	(20,0)
<b>Câncer prévio</b>		
Não	46	(78,0)
Sim	3	(5,0)
Sem informação	10	(17,0)
<b>Glândula afetada</b>		
Não	9	(15,0)
Sim	48	(81,0)
Sem informação	2	(3,0)
<b>Prepúcio afetado</b>		
Não	30	(51,0)
Sim	26	(39,0)
Sem informação	6	(10,0)
<b>Haste do pênis afetada</b>		
Não	47	(80,0)
Sim	6	(10,0)
Sem informação	6	(10,0)

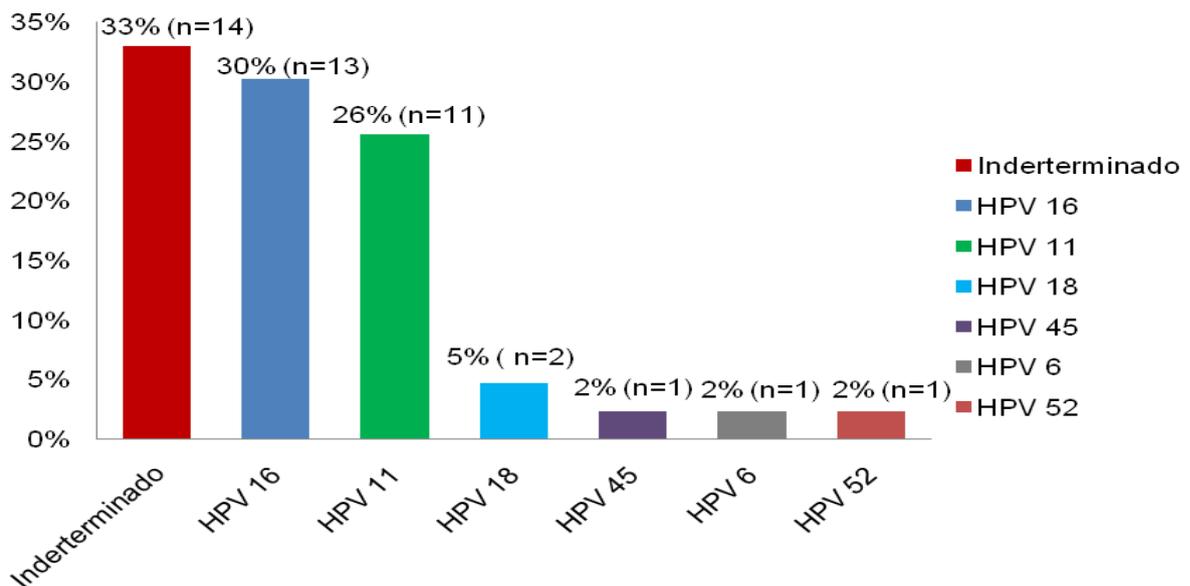
Em relação à análise do tipo histológico das 59 amostras da pesquisa, 100% foram identificadas como carcinoma epidermóide invasivo. A presença do vírus HPV foi detectada na maioria dos casos em 43 (73%) das 59 amostras que foram analisadas (Figura 11).

**Figura 11** - Distribuição da detecção de HPV na amostra de pacientes diagnosticados com câncer de pênis no Estado do Maranhão em 2017/2018.



Através da técnica de sequenciamento pelo método de Sangers foi possível identificar os tipos virais em 67% (n=29) das 43 amostras positivas para HPV. O HPV 16 estava presente em 30% (n=13), o HPV 11 em 26% (n=11) das amostras, seguidos do HPV 18 com 5% (n=2), e o HPV 45, 6 e 52 ambos com 2% (n=1) Em 33% das amostras o HPV foi indeterminado (Figura 12).

**Figura 12** - Distribuição dos tipos de HPV de pacientes diagnosticados com câncer de pênis no Estado do Maranhão em 2017/2018.



A Tabela 8 expressa dados histopatológicos das lesões penianas e sua associação com o vírus HPV. Não houve diferença estatisticamente significativa, entre a presença do HPV e as características histopatológicas da lesão. Observou-se a frequência mais elevada de lesão ulcerada (36,0%) quando comparado a lesão verrucosa (8,4%), a invasão perineural em 15,2% da amostra e a invasão angiolinfática em 18,6%. Quanto ao subtipo histológico, o usual apresentou a maior prevalência com 33,9%. Em relação à classificação do câncer de pênis através do grau de Broders, 32,2% das amostras foram classificadas como grau I. De acordo com o estadiamento TNM, 25,5% das amostras foram classificadas como T2 e 23,7% nos estádios II e III. As amostras também foram analisadas quanto à classificação de Jackson, onde constatou-se que a maior parte das amostras estavam no estágio II (10,2%). Nesta pesquisa, apenas seis pacientes apresentaram metástase.

**Tabela 8** – Associação entre o HPV e as variáveis histopatológicas da lesão e o estadiamento tumoral de 59 pacientes diagnosticados com câncer de pênis no Estado do Maranhão em 2017/2018.

Variáveis	Total n (%)	HPV		Valor de P
		Ausente n (%)	Presente n (%)	
<b>Lesão ulcerada</b>				0,778
Ausente	13(22,0)	3 (42,9)	10 (37,0)	
Presente	21(36,0)	4 (57,1)	17 (63,0)	
Sem informação	25 (42,0)	-	-	
<b>Lesão verrucosa</b>				0,972
Ausente	29 (49,2)	6 (85,7)	23 (85,2)	
Presente	5 (8,4)	1(14,3)	4 (14,8)	
Sem informação	25 (42,4)	-	-	
<b>Subtipo histológico</b>				0,737
Condilomatoso	11 (18,6)	4 (40,0)	7 (29,2)	
Verrucoso	1 (1,7)	0 (0,0)	1(4,2)	
Usual	20 (33,9)	5 (50,0)	15 (62,5)	
Misto	2 (3,4)	1 (10,0)	1 (4,2)	
Sem informação	25 (42,4)	-	-	
<b>Invasão perineural</b>				0,547
Ausente	30 (50,8)	7 (70,0)	23 (79,3)	
Presente	9 (15,2)	3 (30,0)	6 (20,7)	
Sem informação	20(34,0)	-	-	
<b>Invasão angiolinfática</b>				0,705
Ausente	29 (49,1)	8 (66,7)	21(70,0)	
Presente	11 (18,6)	4 (33,3)	9 (30,0)	
Sem informação	19 (32,2)	-	-	
<b>Classificação de Broders</b>				0,726
Grau I	19 (32,2)	7 (50,0)	12 (42,9)	

Continuação

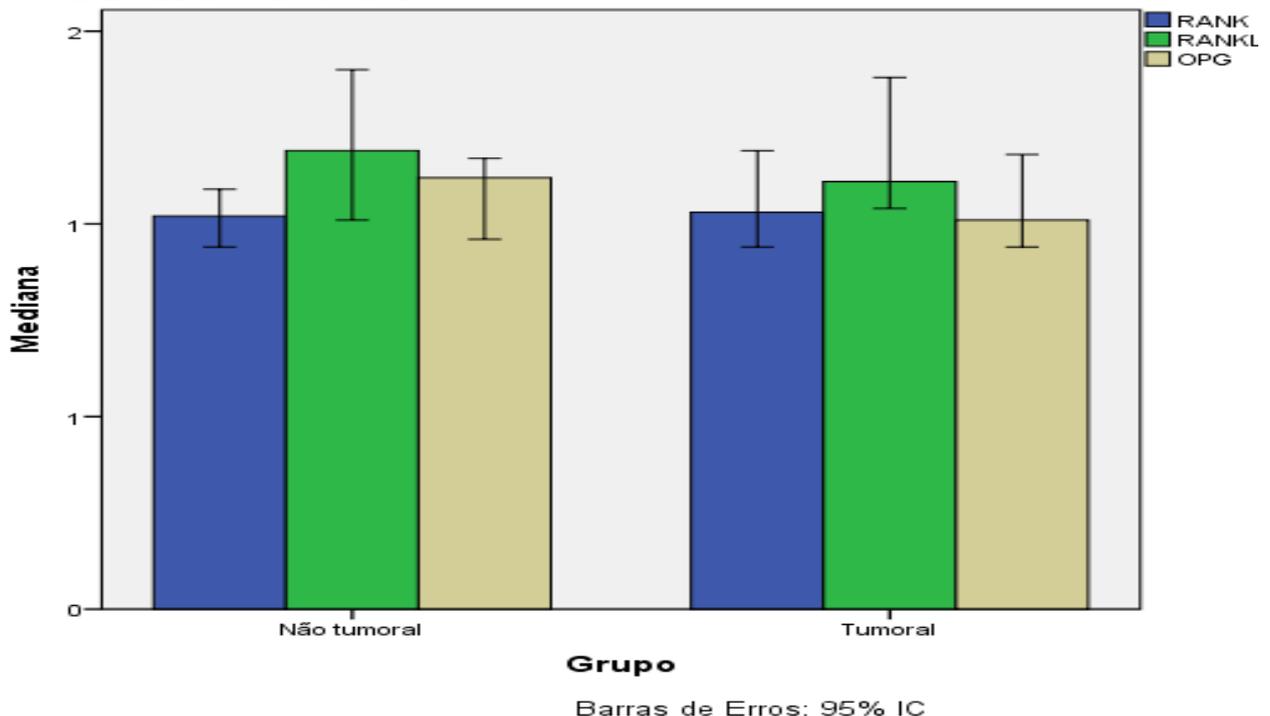
Continuação

Grau II	14 (23,7)	5 (35,7)	9 (32,1)	
Grau III	9 (15,3)	2 (14,3)	7 (25,0)	
Sem informação	17 (28,8)	-	-	
<b>Componente T (TNM)</b>				0,346
T1	13 (22,0)	2 (20,0)	11 (35,5)	
T2	15 (25,5)	3 (30,0)	12 (38,7)	
T3	13 (22,0)	5 (50,0)	8 (25,8)	
Sem informação	18(30,5)	-	-	
<b>Classificação de Jackson</b>				0,727
Estágio I	5 (8,4)	1 (25,0)	4 (44,4)	
Estágio II	6 (10,2)	2 (50,0)	4 (44,4)	
Estágio III	2 (3,4)	1 (25,0)	1(11,1)	
Sem informação	46 (78,0)	-	-	
<b>Estádio TNM</b>				0,447
Estádio I	13 (22,0)	2 (20,0)	11(35,5)	
Estádio II	14 (23,7)	3 (30,0)	11(35,5)	
Estádio III	14 (23,7)	5 (50,0)	9 (29,0)	
Sem informação	18 (30,6)	-	-	

Valor de probabilidade calculado através do teste exato de Fischer ou Qui-quadrado.

Para análise da expressão gênica do eixo RANK/RANKL/OPG realizou-se a comparação as medianas do eixo em tecidos não tumorais e tumorais que estão ilustradas na figura 13, não se observou diferença estatisticamente significativa em relação à expressão de RANK ( $p = 0,238$ ), RANKL ( $p = 0,763$ ) ou OPG ( $p = 0,711$ ).

**Figura 13** - Expressão gênica de RANK, RANKL E OPG de tecidos não tumorais e tumorais de pacientes diagnosticados com câncer de pênis (n=26) no Estado do Maranhão em 2017/ 2018.



A tabela 9 mostra a comparação da expressão de RANK, RANKL E OPG de acordo com parâmetros clínicos. Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão dos mediadores avaliados para as variáveis idade, cor da pele, procedência, tabagismo, circuncisão, uso de preservativo e relato de IST prévia ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 9-** Comparação das medianas da expressão gênica de RANK, RANKL e OPG em tecidos tumorais de acordo com os parâmetros clínicos de pacientes diagnosticados com câncer de pênis (n=26) no Estado do Maranhão em 2017/2018

Tecido	Variáveis	N	RANK	P*	RANKL	P*	OPG	P*
<b>Total=26</b>								
<b>Idade</b>								
<b>Tumoral</b>	Até 60	9	1,03	<b>0,559</b>	1,08	<b>0,610</b>	0,99	<b>0,559</b>
	Maiores que 60	16	1,10		1,12		1,09	
	Sem informação	1	-	-	-	-	-	
<b>Tabagismo</b>								
<b>Tumoral</b>	Não	10	1,10	<b>0,056</b>	1,13	<b>0,933</b>	0,99	<b>0,598</b>
	Ex-tabagista	3	0,90		1,11		0,99	
	Atual tabagista	13	1,09		1,10		1,14	
	Sem informação		-	-	-			
<b>Circuncisão</b>								
<b>Tumoral</b>	Não	24	1,09	<b>0,880</b>	1,10	<b>0,583</b>	1,04	<b>0,320</b>
	Sim	1	-		-		-	
	Sem informação	1	-	-	-			
<b>Uso de preservativo</b>								
<b>Tumoral</b>	Sempre	2	1,14	<b>0,878</b>	1,04	<b>0,759</b>	1,05	<b>0,977</b>
	Às vezes	12	1,06		1,12		1,01	
	Nunca	11	1,01		1,12		1,18	
	Sem informação	1	-	-	-			
<b>Relato de IST prévia</b>								
<b>Tumoral</b>	Não	11	1,10	<b>0,552</b>	1,38	<b>0,442</b>	1,04	<b>0,710</b>
	Sim	9	1,03		1,11		1,01	
	Sem informação	6	-	-	-			

\* Mann-Whitney \*P<0,05

A tabela 10 mostra a comparação da expressão de RANK/RANKL/OPG em tecidos tumorais de acordo com as características histopatológicas e estadiamento da lesão. Nota-se que houve a associação entre os níveis de expressão de RANK com a ocorrência de lesão ulcerada e invasão perineural. Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão de RANKL E OPG entre as variáveis ilustradas na tabela 10 ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 10-** Comparação das medianas da expressão gênica de RANK, RANKL e OPG em tecidos tumorais de acordo com as características histopatológicas e estadiamento da lesão em pacientes diagnosticados com câncer de pênis (n = 26) no Estado do Maranhão em 2017/2018.

Tecido	Variáveis	N Total=26	RANK	P*	RANKL	P*	OPG	P*
<b>Lesão ulcerada</b>								
<b>Tumoral</b>	Ausente	5	1,39	<b>0,045*</b>	1,44	<b>0,214</b>	1,47	<b>0,354</b>
	Presente	8	1,01		1,12		0,97	
	Sem informação	13	-		-		-	
<b>Subtipo histológico</b>								
<b>Tumoral</b>	Condilomatoso	7	1,19	<b>0,122</b>	1,38	<b>0,715</b>	1,14	<b>0,464</b>
	Usual	5	0,98		1,13		1,04	
	Sem informação	14	-		-		-	
<b>Invasão Perineural</b>								
<b>Tumoral</b>	Ausente	17	1,09	<b>0,039*</b>	1,15	<b>0,398</b>	1,03	<b>0,762</b>
	Presente	5	0,89		1,10		1,04	
	Sem informação	4	-		-		-	
<b>Invasão angiolinfática</b>								
<b>Tumoral</b>	Ausente	15	1,03	<b>0,497</b>	1,11	<b>0,530</b>	0,99	<b>0,230</b>
	Presente	5	1,32		1,11		1,18	
	Sem informação	6	-		-		-	
<b>Classificação de Broders</b>								
<b>Tumoral</b>	Grau I	10	0,99	<b>0,133</b>	1,05	<b>0,318</b>	1,06	<b>0,316</b>
	Grau II	8	1,07		1,38		1,07	
	Grau III	3	1,39		1,14		1,39	
	Sem informação	5	-		-		-	
<b>Estadiamento TNM</b>								
<b>Tumoral</b>	Estádio II	16	1,02	<b>0,634</b>	1,11	<b>0,118</b>	1,04	<b>0,712</b>
	Estádio III	3	1,37		1,80		1,46	
	Sem informação	7	-		-		-	

\* Mann-Whitney \*P<0,05

A tabela 11 mostra a comparação da expressão do eixo RANK, RANKL e OPG em tecidos tumorais com o HPV. Observa-se que houve associação de subtipos de HPV entre os níveis de expressão de RANKL. ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão dos mediadores avaliados entre tumores positivos e negativos para HPV ( $p > 0,05$ ). Não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa na expressão de OPG entre as variáveis ilustradas na tabela 11 ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 11-** Comparação das medianas da expressão gênica de RANK, RANKL e OPG em tecidos tumorais com o HPV em pacientes diagnosticados com câncer de pênis no Estado do Maranhão em 2017/2018.

Tecido	Variáveis	N Total=26	RANK	P*	RANKL	P*	OPG	P*
<b>HPV</b>								
<b>Tumoral</b>	Positivo	19	1,10	<b>0,073</b>	1,13	<b>0,534</b>	1,07	<b>0,611</b>
	Negativo	7	1,13		1,08		1,01	
<b>Risco</b>								
<b>Tumoral</b>	Alto risco	7	1,36	<b>0,230</b>	1,50	<b>0,016*</b>	1,37	<b>0,088</b>
	Baixo risco	10	1,10		1,09		0,95	
	Sem informação	9	-		-		-	

\*Mann Whitney \*P<0,05

## 8 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo revelam que 63% dos pacientes analisados possuíam idade maior que 60 anos, sendo a idade média de 65 anos de idade e a maior e menor idade foram respectivamente, 97 e 23 anos. Os dados encontrados fortalecem o que está descrito na literatura que afirma que a incidência de penectomia é mais prevalente em homens sexagenários (CHAUX et al., 2013). A cirurgia de penectomia nesta faixa etária é observada também nos trabalhos de Fay (2014); Chaux e col. (2013); Sousa (2015) e Ramos (2017).

Ainda segundo a idade, é válido lembrar que o carcinoma peniano pode acontecer também em homens jovens, no entanto, acontece predominantemente em idosos, assim como o diagnóstico é mais comum aos 60 anos. Apesar da idade média encontrada neste estudo, maior que 60 anos, pacientes no estudo de Lobrigatte (2014) foram diagnosticados aos 80 anos. Situações como essa sugerem hipóteses como: demora em buscar assistência médica, medo ou falta de conhecimento do paciente e dificuldade de acesso ao sistema de saúde.

Segundo Koifman (2011), o número de casos com câncer de pênis pode variar de acordo com a região, e essa ocorrência está mais ligada ao local onde o paciente mora, do que a sua localidade de origem. Neste estudo, 59% dos indivíduos possuíam residência em localidades do interior do estado do Maranhão. Estes dados estão em conformidade com os resultados de Ramos (2017), onde 79,3% dos participantes residiam no interior do Maranhão. Da mesma forma, o estudo de Chaux (2013) revelou a incidência de 83% dos participantes residindo em áreas afastadas dos grandes centros urbanos. Os resultados de ambos os trabalhos pode ser explicado pela demora por parte dos pacientes em procurar ajuda médica logo que se deparam com os primeiros sintomas, devido a falta de acesso ao atendimento médico nessas áreas.

No levantamento feito por este estudo, fatores como escolaridade, renda familiar e o estado civil também foram avaliados. Foram detectados a existência predominante de homens analfabetos e com renda familiar de até um salário mínimo. Estes resultados encontram-se em concordância com os achados na literatura que afirma que o câncer de pênis acomete homens com baixo nível social e de instrução (HERNADEZ, 2008; RAMOS, 2017; COSTA, 2013; TORBRAND et

al., 2017). Torbrand (2017) alude que homens com um baixo nível de escolaridade estão mais suscetíveis ao desenvolvimento do carcinoma peniano. No estudo de Ramos (2017), o câncer de pênis estava presente em 55,2% dos homens analfabetos e que apresentavam uma renda familiar de até um salário mínimo, 75,9% dos participantes.

A maioria dos casos de CP envolve homens com baixa ou nenhuma escolaridade. A escola é um local de construção de indivíduos críticos e autossuficientes, sendo importante para a promoção da saúde, pois dentro do ambiente escolar garante-se a oportunidade de todos realizarem uma escolha favorável a sua saúde, logo, pessoas com baixa instrução estão vulneráveis por não terem a ideia de quando precisam buscar ajuda médica (BRASIL, 2011).

No estudo de Allebrant (2013), os indivíduos mais acometidos pelo carcinoma peniano, além de possuírem baixas condições socioeconômicas, eram de cor/raça parda e preta, o que ficou evidente neste, onde a neoplasia peniana foi maior em homens não brancos.

Quanto aos hábitos de vida, neste trabalho grande parte dos pacientes (47%) já fizeram uso de tabaco. Daling (2014) identificou a ligação entre o uso de tabaco e o desenvolvimento da neoplasia peniana, tanto fumante, quanto ex-fumante possuem chances de desenvolver o câncer peniano, 2,3 e 1,9 razões de chance, respectivamente. Ramos (2017) demonstrou em seu estudo que 62% dos pacientes diagnosticados com câncer de pênis faziam, ou fizeram, uso do tabaco. No estudo realizado por Wanick (2015), o tabagismo foi detectado em 75% dos casos com a neoplasia invasiva no pênis. Chaux et al. (2013) revelou em sua pesquisa que 76% dos casos de paciente com CP também fizeram uso do tabaco em algum momento da sua vida.

O uso do tabaco, apontado aqui por diversos autores como um fator etiológico, ratifica ainda mais a hipótese de que o fumo provoca câncer, não só no pênis, mas em todo o epitélio malpighiano (não-queratinizado, estratificado, pavimentoso), mesmo que não haja contato direto do tecido com as substâncias do fumo. Existem relatos, inclusive, de que se trata de um agente dose dependente, embora essa ligação ainda necessite de estudos mais aprofundados (PAULA et al., 2012). Segundo Wünsch Filho (2010), desde a associação ao câncer de pulmão de Doll e Hill em 1957, o tabagismo foi associado como principal causa em mais de 20 tipos de tumores malignos, incluindo o câncer de ovário e o de cólon.

Neste estudo, foi constatado que 68% dos homens diagnosticados com câncer de pênis nunca foram submetidos a uma cirurgia de circuncisão. Koifman (2011) em seu estudo, realizado no Rio de Janeiro, a não circuncisão também foi comum entre os casos de câncer peniano diagnosticados. Afirma Chaux et al. (2013) que o prepúcio avantajado, a fimose, a falta de higiene adequada das partes íntimas, que nesse estudo 38% não faziam higiene após as relações sexuais, enquanto que no de Ramos (2017) 24,1% também não faziam a devida higiene, podem influenciar no desenvolvimento do carcinoma peniano. No estudo de Guimarães et al. (2017), realizado na cidade Caxias- Ma, sobre o conhecimento dos homens acerca do CP, constatou-se que 53,1% dos homens entrevistados revelaram ter bons hábitos higiênicos algumas vezes, 20,8% afirmaram nunca ter bons hábitos, e apenas 12,5% muito frequentemente buscavam ter bons hábitos de higiene na região peniana.

A circuncisão peniana pode ser realizada por diversos motivos (culturais, religiosos, motivos médicos ou medidas profiláticas). No Brasil, raramente são feitas circuncisões por razões profiláticas ou religiosas, e estas, nunca são realizadas pelo sistema público de saúde. Segundo dados do sistema público de saúde- DATASUS (2011) é possível observar uma taxa de 47,8 circuncisões/100 mil homens por ano, sendo a maioria dos procedimentos feito em crianças de 1 a 9 que necessitavam de circuncisão, ou seja, por razões médicas. Sabe-se que existem inúmeras dificuldades e limitações para que as pessoas encontrem um atendimento adequado pelo SUS. No Brasil, é possível que existam diversos homens que necessitam realizar uma circuncisão, dessa forma, pessoas de baixo poder aquisitivo dependem exclusivamente do sistema, e este, uma vez falho, é possível que muitos destes homens não consigam ter um atendimento adequado e muitos menos o encaminhamento para a cirurgia caso seja necessário. Uma vez com fimose, os pacientes possuem uma dificuldade para realizar a limpeza da área peniana, e com a falta de higiene, sendo este um dos fatores de risco do carcinoma peniano, venha a desenvolver o CP.

A neoplasia peniana é considerada rara em indivíduos que realizaram a circuncisão peniana ao nascer. Uma revisão feita por Larke et al. (2011) a cerca da circuncisão do pênis revelou que a cirurgia é benéfica quando feita antes dos 18 anos em acareação com um risco de desenvolver o CP quando a cirurgia acontece na fase adulta. O efeito contrário da circuncisão durante a fase adulta pode ser em

decorrência do desenvolvimento da cicatrização e a presença de lesões no pênis antes da cirurgia (CHAUX et al., 2013).

Sobre a região anatômica afetada pela lesão, observou-se que em 81% dos casos, a glândula foi mais afetada, seguido pelo prepúcio (39,0%) e haste do pênis (10,0%).

No estudo de Ramos (2017), realizado no Maranhão, 57,1% dos casos haviam mais de uma lesão, e em 93,1% das lesões foi observada lesões na região da glândula. Estes resultados encontram-se em concordância com a pesquisa de Wanick (2011), onde a região da glândula foi a mais afetada, 55,5%, em pacientes diagnosticados com CP e 91,1% dos casos em outras regiões do pênis.

O pênis é formado por tecidos que incluem vasos sanguíneos, musculatura, nervos e pele, com isso, grande parte dos carcinomas que surgem no epitélio escamoso que recobre a glândula, prepúcio e sulco coronal. A variação do padrão de crescimento dá seguimento a diferentes aspectos micro e macroscópicos, influenciados especialmente pela área de origem. Os indícios mais frequentes são úlceras, secreções fétidas e nódulos. Contudo, segundo Rajaian (2010), apesar de ocorrer em qualquer local da área epitelial escamosa do pênis, normalmente as lesões primárias acontecem principalmente na glândula, seguida do prepúcio, o corpo e sulco coronal que possuem acometimentos menos frequentes (PAIVA, 2010).

Quanto à presença do HPV, o vírus foi encontrado em 73% das amostras analisadas. A título de comparação, no estudo de Ramos (2017), o HPV foi detectado em 69% das amostras analisadas. Em um estudo realizado por Vyas (2016) com amostras de lesão peniana de 355 pacientes residentes no Brasil, Estados Unidos e México, 88% estavam infectados pelo HPV (VYAS et al., 2016). Não se sabe ao certo se a diferença em prevalência entre estudos se deve a uma real variação entre populações ou se isso se deve a diferenças no tipo de amostra ou metodologia usada (ALEMANY et al., 2016; WEI et al., 2016).

Um estudo conhecido por HIM (HPV infection in men), financiado pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, no Brasil foi realizado pela FAPESP, gerou vários artigos publicados entre 2015 e 2017, revelou uma análise mais detalhada da infecção por HPV. No início dos estudos, nenhum homem estava contaminado pelo vírus do HPV. Com o passar do tempo, uma parte adquiriu o vírus, estes foram identificados por meio de testes genéticos realizados no material coletado da bolsa escrotal e do pênis, neste, 72% dos brasileiros estavam infectados em algum

momento da pesquisa, uma porcentagem bem maior quando comparados aos estudos realizados no México (62%) e nos EUA (61%). No estudo, dos 3.033 participantes cerca de 1.788 tiveram infecção por pelo menos um tipo de HPV. Destes, 5% dos infectados (86 indivíduos) desenvolveram condiloma e 9 dos participantes com o vírus tiveram neoplasias intraepiteliais penianas (lesões pré-tumorais) (ZORZETTO, 2017).

Neste estudo, das amostras que foram submetidas ao sequenciamento automatizado, 30% apresentaram HPV 16, seguido dos tipos 11 (26%), 18 (5%), 45 (2%) 6 (2%), 52 (2%) e 33% foram indeterminadas. Em conformidade com os achados de Sudenga et al. (2016), que verificaram a presença de vários subtipos de HPV, sendo o HPV 6, 11 e 16 os tipos virais mais frequentes. Durante os primeiros seis meses de acompanhamento do estudo, 0,5% dos homens com infecção genital por HPV16 desenvolveram neoplasia intra-epitelial peniana (PeIN) positiva para HPV16 e, após 24 meses de acompanhamento, 2,1% dos homens com infecção genital por HPV16 desenvolveram PeIN. Após 24 meses de acompanhamento, 0,9% dos homens com infecção genital por HPV6 desenvolveram um PeIN positivo para HPV6 e 1,4% dos homens com infecção genital por HPV11 desenvolveram um PeIN positivo para HPV11.

Recentemente, em uma revisão sistemática e metanálise realizada com 22 estudos, foi identificado que os três subtipos mais comuns de HPV foram HPV 16 (28,5%), HPV 18 (2,3%) e HPV 4 (2,3%), embora houvesse a presença de outros subtipos como o HPV 6 e o HPV 11. Portanto, os autores relatam que a presença de HPV de baixo risco contribui para o câncer de pênis em menor grau (YU et al., 2019).

Afonso et al. (2012) avaliaram 135 amostras de pênis fixados em formalina e em blocos de parafina quanto à presença do HPV usando amplificação pela PCR seguida de RFLP (do inglês, Restriction fragment length polymorphism) e detectaram 104 amostras positivas para DNA viral em 60,7% dos tumores. Desse total, 69,5% das amostras apresentaram HPV de alto risco, com maior prevalência para HPV16 (29,7%), seguido por HPV45 (23,0%). Além disso, os autores detectaram HPV6, 11, 18, 26, 28, 31, 33, 35, 53, 62, 70, 71 e 73 em menores frequências.

Todavia, o estudo de Araújo et al. (2018), verificaram que a prevalência de genótipos oncogênicos foi de 30,6% e a prevalência para o HPV de alto risco foi de

24,9%. O tipo mais encontrado foi o HPV 16, sendo este presente em 62,5% das amostras positivas para a presença do DNA viral.

A caracterização do genótipo do HPV no câncer de pênis é de grade valia, uma vez que podemos conhecer mais os tipos mais prevalentes em nossa comunidade. Desta forma, poderemos propor ações eficazes na prevenção do HPV que possam contribuir para uma melhor qualidade de vida do homem. A vacina quadrivalente previne as lesões dos HPVs 6, 11, 16 e 18 em homens, mostrando que a vacina é uma medida de prevenção para esta neoplasia (Araújo et al., 2018).

O Estado do Maranhão é considerado o estado brasileiro com um alto índice de câncer de pênis. No Brasil, os tipos virais mais prevalentes são 16 e 18. Dados da literatura, como os evidenciados anteriormente, colaboram para confirmar a associação do HPV com casos de câncer de pênis, no entanto, em decorrência da existência de vários subtipos virais, propõe-se que outros tipos de HPVs devem ser analisados para que haja um esclarecimento da patogênese nos carcinomas penianos, além de outros mediadores carcinogênicos.

Em relação as características das lesões, a mais prevalente foi a lesão ulcerada, 36% dos casos, seguida da lesão verrucosa, 8,4%. Este trabalho entra em concordância com o de Ramos (2017), onde a autora detectou a presença de lesão ulcerativa predominante, em 51,7% dos casos, e lesão verrucosa em 24,1% dos casos. Foi identificado ainda a invasão perineural em 15,2% das amostras analisadas, e a angiolinfática em 18,6% destas. No estudo de Ramos (2017), a invasão perineural foi observada em apenas 3,4% das amostras, enquanto a invasão angiolinfática em 13,8% das amostras, revelando uma prevalência maior, em ambos os estudos.

Quanto à classificação do carcinoma peniano, pela classificação do grau de Broders, observou-se uma prevalência nas amostras de câncer tipo Grau I (32,2%), este tipo de câncer foi detectado também em grande predominância (41,4%) no estudo de Ramos (2017). Pela classificação TMN, 25,5% das análises foram classificadas como T2, no entanto, diverge do estudo de Ramos (2017), que teve maior prevalência para componentes T do tipo T1 (27,7%). Ainda sobre o estadiamento TNM 23,7% das amostras estavam nos estádios II e III. Em um estudo realizado por Wanick et al. (2011) com 23 casos de câncer de pênis, a maioria (56,5%) encontrava-se no estágio I e o restante, distribuído nos estádios II (13%), III (17,4%) e IV (13%). Segundo Lobrigatte et al. (2014) em seu estudo com 11 casos

de CP, seis pacientes (55%) foram classificados como estágio II. As diferenças quanto o estadiamento TNM podem ser divergentes em alguns estudos devido à demora na procura por assistência médica. A classificação de Jackson também foi usada nas amostras, tendo um maior número de amostras no estágio II (10,2%). Nesta mesma classificação as amostras analisadas por Ramos (2017), o estágio I e o estágio II obtiveram a mesma porcentagem (27,6%).

Sobre a histopatologia do carcinoma peniano, mais de 95% corresponde ao carcinoma de células escamosas, também conhecido como carcinoma epidermóide ou espinocelular. Outras formas histológicas como carcinoma, sarcoma e melanoma maligno, demonstraram 5% do câncer de pênis (LOBRIGATTE et al., 2014). No presente estudo, segundo a análise histológica, 100% das amostras, 59 no total, foram classificadas como sendo carcinoma epidermóide invasivo. Da mesma forma acontece no estudo de Ramos (2017), onde das 29 amostras do estudo, todas foram classificadas com carcinoma epidermóide invasivo. Com relação ao subtipo histológico, houve predominância do usual em 33,9% dos casos. Outros estudos também encontraram dado semelhante. Em um estudo com 121 casos de câncer peniano houve a prevalência do subtipo usual em 52% dos casos (VELAZQUEZ; CHAUX; CUBILLA, 2012). Um estudo retrospectivo de 61 pacientes com câncer epidermóide de pênis realizado por Cubilla (2001) identificou o subtipo usual em 59% dos casos, o subtipo basalóide e condilomatoso em 10% dos casos, cada (CUBILLA et al., 2001). Apesar de o subtipo basalóide estar mais associado à infecção por HPV, o mesmo não foi identificado em nosso estudo.

Várias pesquisas têm sido realizadas para compreender a função do eixo RANK/RANKL/OPG na etiopatogênese de algumas doenças. Este eixo desempenha um papel na promoção da diferenciação e ativação dos osteoclastos, levando à reabsorção óssea. Alguns estudos indicam que a rede de sinalização RANKL/RANK/OPG também está envolvida na tumorigênese e metástase específica de tecido em vários tipos de câncer, como de próstata e de mama. A expressão de RANK e RANKL é caracterizada como preditiva de prognóstico ruim (LI et al., 2014). Entretanto, nenhuma análise comparativa da expressão gênica desse sistema havia sido estabelecida no câncer de pênis.

Neste estudo, buscamos avaliar a expressão gênica de RANK/RANKL/OPG em tecidos não tumorais e tumorais de pacientes com câncer de pênis, onde se observou que não houve associação significativamente estatística na comparação

dos tecidos com o eixo, dado que todas as amostras utilizadas neste estudo foram obtidas por amputação parcial ou total, suas características semelhantes podem ter obscurecido quaisquer diferenças.

Conforme Li et al. (2014), a análise morfométrica da coloração imunohistoquímica mostrou que a expressão de RANK, OPG e RANKL em lesões de câncer de próstata não foram expressas significativamente na hiperplasia de próstata, embora seus níveis de expressão aumentaram para 50%, 45% e 52,5% respectivamente, nos tecidos de câncer de próstata. Ainda de acordo com o mesmo estudo, foi observado que houve uma correlação positiva entre a expressão de RANK, RANKL E OPG com a agressividade do tumor e que a frequência de expressão do eixo nos casos metastáticos com câncer de próstata foi significativamente maior nos casos localizados e avançados (LI et al., 2014).

Entretanto, em um estudo realizado por Ohtaka et al. (2017), com 115 amostras de prostatectomia, encontraram que os níveis de expressão dos genes RANK e RANKL nos tecidos do câncer de próstata foram significativamente mais altos do que aqueles nos tecidos não-cancerígenos. Os mesmos resultados encontraram Shang et al. (2015) em tumores cervicais, onde avaliaram a expressão de RANKL e RANK nas linhas celulares de câncer cervical SiHa e HeLa em doze tecidos, e detectaram mancha de membrana mais forte para RANKL e RANK nas linhas celulares e nas células cancerígenas em comparação com as células pré-cancerosas.

Ao compararmos a expressão do sistema com variáveis como idade e hábitos sexuais não observamos associação significativa. Estando em conformidade com o estudo de Chen et al. (2006) onde a expressão de RANK/RANKL/OPG também não foi associada com idade. Conforme Peng (2013), ao correlacionar a expressão de RANKL, RANK e OPG com parâmetros clínico-patológicos a expressão de OPG não foi associada à idade, sexo e tipo histológico. Contudo, correlações claras foram estabelecidas entre expressão de RANKL e OPG e tumor metástase linfonodal e metástase distante. No entanto, ao analisar parâmetros clínicos, Chirstoph et al. (2018) encontraram resultados comparáveis com maior expressão de todos os três genes em amostras de câncer de próstata.

A comparação das medianas na expressão do eixo RANK/RANKL/OPG com as variáveis histopatológicas e estadiamento da lesão mostra que houve uma significância na expressão de RANK na lesão ulcerada e invasão perineural, mas

não houve correlação com o estadiamento da lesão. Este dado corrobora com o estudo de Ohtaka et al (2017) com câncer de próstata, onde também não foram observadas correlações entre a expressão do gene RANK ou RANKL e estágio pT ou metástase linfonodal. Entretanto, uma correlação entre a expressão do gene RANKL e características patológicas foi demonstrada no carcinoma de células renais (MIKAMI et al., 2009). A expressão de RANKL e RANK foi observada no câncer renal metastático no osso e em outros órgãos, sugerindo que eles desempenham um papel importante, onde elevada expressão de RANKL e RANK com baixa expressão de OPG foi preditor significativo e independente de recorrência, metástase óssea e um mau prognóstico.

Embora o eixo RANK esteja associado com metástase óssea, não foi possível identificar entre os seis participantes deste estudo que apresentaram metástase. Vale ressaltar que, dados sugerem que o eixo não está envolvido apenas nas metástases ósseas, mas também nas metástases de outros órgãos, através da estimulação da migração de células cancerígenas. De acordo com Li et al. (2014) por ser fator crítico de diferenciação dos osteoclastos, o RANKL pode desencadear alterações citoesqueléticas e promover a invasão de vários tipos de células tumorais epiteliais humanas que expressam RANK. No estudo de Chaux et al. (2018), sobre autopsia em pacientes que tinham câncer de pênis, foi possível observar metástase para outros tecidos, como fígado, pulmões e cérebro.

Além de correlacionar fatores clínicos e patológicas buscamos associar o eixo com o Papilomavírus Humano, onde obtivemos uma correlação de RANKL e os subtipos virais do HPV, alto e baixo risco. Em um conjunto de experimentos, Demoulin et al. (2015) identificaram RANK/RANKL sinalizando como um provável candidato a conduzir as alterações no órgão genital. Eles mostraram que a expressão de RANKL aumenta fortemente durante a progressão em tumores cervicais e é secretado diretamente pelas células cancerígenas, porém, essa expressão não estava relacionada à indução de oncoproteínas virais do HPV.

A identificação dos fatores envolvidos na progressão tumoral pode oferecer oportunidades para melhorar o tratamento do câncer. A sinalização de RANKL/RANK/OPG provavelmente pode ter um efeito direto na proliferação e no comportamento das células tumorais. No entanto, mais pesquisas são necessárias para aumentar nosso conhecimento nesse campo e, particularmente, para que possamos compreender o envolvimento do sistema na carcinogênese do pênis.

## 9 CONCLUSÃO

O perfil dos pacientes foram homens acima de 60 anos de idade, de baixa renda, de baixa escolaridade e que residiam em municípios do interior do estado do Maranhão. A maioria dos pacientes não havia realizado circuncisão durante a vida aumentando o surgimento de lesões que causam CP.

Neste estudo, a lesão ulcerativa foi a mais encontrada e tipo o histológico predominante foi o epidermóide, sendo o subtipo usual o mais encontrado. Conforme o estadiamento TMN houve maior prevalência nos estádios II e III. A falta de informação e a dificuldade de acesso aos serviços de saúde sugerem a demora na busca de tratamento, dificultando o diagnóstico precoce do câncer de pênis.

A alta prevalência de infecção por HPV nas amostras e a maior prevalência do HPV 16 considerado de alto risco oncogênico pode estar associado ao baixo nível socioeconômico e aos hábitos sexuais. Não houve diferença estatisticamente significativa que relacionasse a presença do HPV com os dados histopatológicos.

A expressão do receptor RANK esteve associada com a ocorrência de invasão perineural, um marcador de agressividade tumoral, o qual pode estar associado também com a presença de HPV. Maiores estudos devem ser realizados investigando o papel do eixo RANK, RANKL e OPG no carcinoma peniano, preferencialmente utilizando outras técnicas como imunohistoquímica.

## REFERÊNCIAS

- AFONSO, L. A. et al. Prevalence of human papillomavirus and Epstein-Barr virus DNA in penile cancer cases from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 1, p. 18-23, 2012.
- ALBANY, C.; HAHN, N.M. Novos agentes de direcionamento ósseo no câncer de próstata. **Câncer de próstata e doenças prostáticas**, v. 17, n. 2, p. 112, 2014.
- ALEMANY, L. et al. Role of human papillomavirus in penile carcinomas world wide. **European urology**, v. 69, n. 5, p. 953-961, 2016.
- ALLEBRANDT, A. P. et al. Caracterização dos pacientes com câncer de pênis em um hospital filantrópico/Characterization of patients with cancer of the penis in a charity hospital. **Revista Multiprofissional em Saúde do Hospital São Marcos**, v. 1, n. 2, p. 14-25, 2013.
- ANDRADE, F. R. et al. Expression of bone resorption regulators (RANK, RANKL, and OPG) in odontogenic tumors. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 106, n. 4, p. 548-555, 2008.
- ARMSTRONG, A. P. et al. A RANK/TRAF6-dependent signal transduction pathway is essential for osteoclast cytoskeletal organization and resorptive function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 46, p. 44347-44356, 2002.
- ASHKENAZI, A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. **Nature reviews cancer**, v. 2, n. 6, p. 420, 2002.
- BAGO-HORVATH, Z. et al. Impact of RANK signalling on survival and chemotherapy response in osteosarcoma. **Pathology**, v. 46, n. 5, p. 411-415, 2014.
- BANSAL, A.; SINGH, M. P.; RAI, B. Human papillomavirus-associated cancers: A growing global problem. **International Journal of Applied and Basic Medical Research**, v. 6, n. 2, p. 84, 2016.
- BAUD'HUIN, M.; et al. RANKL, RANK, osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases. **Cell Mol Life Sci**, v.64, p.2334-2350, 2007.
- BLEEKER, M.C. et al. Penile cancer: epidemiology, pathogenesis and prevention. **World J Urol**, v. 27, n. 2, p. 141- 150, 2009.
- BOYCE, B. F.; XING, L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. **Arch Biochem Biophys**, v. 473, p. 139–146, 2008.
- BRAGA, F. et al. Squamouscell carcinoma ofthepenis : clinicopathologic. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 6, p. 1082–1091, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Câncer de pênis: causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção**. 2017. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/cancer-de-penis>>. Acesso em: jan. 2019.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas e Estratégicas. **Instrutivo PSE**. Ministério da Saúde, 2011.

BURK, R. D.; CHEN, Z.; VAN DOORSLAER, K. Human papillomaviruses: Genetic basis of carcinogenicity. **Public Health Genomics**, v. 12, n. 5–6, p. 281–290, 2009.

CARVALHO N.S. et al. Associação entre HPV e câncer peniano: revisão de literatura. **J Bras Doenças Sex Transm**, v.19, n. 2, p.92-95, 2007.

CARVALHO, Maria Odete de Oliveira. **Identificação da presença de células de Langerhans e a ativação de linfócitos T nos diferentes estágios das lesões do colo uterino associada à infecção causada pelo Vírus do Papiloma Humano**. 2016. 89 f. Tese (Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas)-Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2016.

CHAUX, A. et al. Epidemiologic Profile, Sexual History, Pathologic Features, and Human Papillomavirus Status of 103 Patients with Penile Carcinoma. **World Journal of Urology**, v. 31, n. 4, p. 861–867, 2013.

CHAUX, Alcides et al. Autopsy findings in 14 patients with penile squamous cell carcinoma. **International journal of surgical pathology**, v. 19, n. 2, p. 164-169, 2011

CHEN, G. et al. Expression of RANKL/RANK/OPG in primary and metastatic human prostate cancer as markers of disease stage and functional regulation. **Cancer**, v. 107, n. 2, p. 289-298, 2006.

CHRISTOPH, Frank et al. RANKL/RANK/OPG cytokine receptor system: mRNA expression pattern in BPH, primary and metastatic prostate cancer disease. **World journal of urology**, v. 36, n. 2, p. 187-192, 2018

COELHO, R. W. P. et al. Penile cancer in Maranhão, Northeast Brazil: the highest incidence globally? **BMC Urology**, 2018. Disponível em: <<https://bmcurol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12894-018-0365-0>>. Acesso em: 28 maio 2019.

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

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

CUBILLA, A. L. 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, n. 2, p. 111–120, 2001.

CUBILLA, A. et al. A célula basalóide é o melhor marcador de tecido para papilomavírus humano em carcinoma invasivo de células escamosas do pênis: um estudo de 202 casos do Paraguai. **Am J Surg Pathol**, v.34, p. 104-114, 2010.

CUBILLA, B. A. L.; SANCHEZ, D. F.; JOSE, M. The Variegated Morphology of HPV-Related Neoplasms of the Penis. **Cancer Network**, v. 30, n. 3, p. 2–6, 2016.

DATASUS. Departamento de Informação do SUS. Ministério da Saúde, 2011. Disponível em: <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php>> . Acesso em: jun. 2019.

DALLIN JR. Penile cancer: importance of circumcision, human papillomavirus and smoking in situ and invasive disease. **International Journal of Cancer**, 2005.

DE ARAUJO, L. A. et al. Human papillomavirus (HPV) genotype distribution in penile carcinoma: Association with clinic pathological factors. **PloS one**, v. 13, n. 6, p. e0199557, 2018.

DE LIMA, M. A. P.; DA SILVA, C. G. L.; RABENHORST, S. H. B. Papel das Proteínas Precoces do Papilomavírus Humano na Carcinogênese. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 59, n. 4, p. 565–573, 2013.

DEMOULIN, Stéphanie A. et al. Cervical (pre) neoplastic microenvironment promotes the emergence of tolerogenic dendritic cells via RANKL secretion. **Oncoimmunology**, v. 4, n. 6, p. e1008334, 2015.

DIAS, Julia Maria Goncalves. **Prevalência de lesões epiteliais penianas e infecção pelo papilomavírus humano (HPV) em parceiros de mulheres com lesões epiteliais cervicais**. 2013. 176 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, 2013.

DIORIO, G. J.; LEONE, A. R.; SPIESS, P. E. Management of Penile Cancer. **Urology**, v. 96, p. 15–21, 2016.

DOORBAR, J. et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. **Vaccine**, v. 30, p. F55-F70, 2012.

DOORBAR, John. Model systems of human papillomavirus-associated disease. **The Journal of pathology**, v. 238, n. 2, p. 166-179, 2016.

FAVORITO, L.A. et al. Epidemiologic Study on Penile Cancer in Brazil. **International Braz J. Urol.**, v. 34, n. 5, p. 587-593, 2008.

FAY, C.E.S. **Avaliação da expressão imunoistoquímica do fator tecidual no carcinoma de pênis**. 2014. 89 f. Dissertação (Mestrado)- Potifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2014.

FORMAN, D. et al. Cancer Incidence in Five Continent Lyon, **IARC**; vol. X, 2014.

GEORGES, S. et al. Proteases and bone remodelling. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 20, n. 1, p. 29-41, 2009.

GUIMARÃES, G. C. et al. Penile cancer: epidemiology and treatment. **Current oncology reports**, v. 13, n. 3, p. 231-239, 2011.

GUIMARÃES, J. T. F. et al. Avaliação do conhecimento de homens acerca do câncer de pênis e práticas preventivas. **Revista Eletrônica Acervo Saúde/Electronic Journal Collection Health ISSN**, v. 2178, p. 2091, 2017.

HANADA R, et al: Central control of fever and female body temperature by RANKL/RANK. **Nature**, 462: 505–509, 2009.

HARARI, A.; CHEN, Z.; BURK, R. D. Human papillomavirus genomics: past, present and future. In: **Human Papillomavirus**. Karger Publishers,. v. 45, p. 1–18, 2014.

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

HEYNS, C. F.; MENDOZA-VALDÉS, A.; POMPEO, A. C.L. Diagnosis and staging of penile cancer. **Urology**, v. 76, n. 2, p. S15-S23, 2010.

HIKITA, A. et al. Negative regulation of osteoclastogenesis by ectodomain shedding of receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 48, p. 36846-36855, 2006.

HOLEN, I. et al. Osteoprotegerin (OPG) is a survival factor for human prostate cancer cells. **Cancer research**, v. 62, n. 6, p. 1619-1623, 2002.

HONG, Shiyuan; LAIMINS, Laimonis A. Manipulation of the innate immune response by human papillomaviruses. **Virus research**, v. 231, p. 34-40, 2017.

HUBBERS, C. U.; AKGÜL, B. HPV and cancer of the oral cavity. **Virulence**, v. 6, n. 3, p. 244-248, 2015.

IKEDA, T. et al. Determination of Three Isoforms of the Receptor Activator of Nuclear Factor- $\kappa$ B Ligand and Their Differential Expression in Bone and Thymus. **Endocrinology**, v. 142, n. 4, p. 1419-1426, 2001.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. **Câncer de pênis**. 2018. Disponível em:<<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-penis>>. Acesso em: 07 jan. 2019.

KARTSOGIANNIS, V. et al. Localization of RANKL (receptor activator of NF $\kappa$ B ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskelatal tissues. **Bone**, v. 25, n. 5, p. 525-534, 1999.

KHOSLA, S. Minireview: The opg/rankl/rank system. **Endocrinology**, v. 142, n. 12, p. 5050-5055, 2001.

KOIFMAN, L. Epidemiological aspects of penile cancer in Rio de Janeiro: evolution of 230 cases. **Internacional Braz J Urol**, 2011.

KUMAR, V.; FAUSTO, N.; ABBAS, A.K. **Robbins e Cotran. Bases patológicas das doenças**. 7. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

LACEY, D. L. et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. **cell**, v. 93, n. 2, p. 165-176, 1998.

LARKE, N. L. et al. Male circumcision and penile cancer: a systematic review and meta-analysis. **Cancer causes & control**, v. 22, n. 8, p. 1097-1110, 2011.

LEE, J. A. et al. RANKL expression is related to treatment outcome of patients with localized, high-grade osteosarcoma. **Pediatric blood & cancer**, v. 56, n. 5, p. 738-743, 2011.

LETO, Maria das Graças Pereira et al. Infecção pelo papilomavírus humano: etiopatogenia, biologia molecular e manifestações clínicas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 2011.

LI, X. et al. Potential role of the OPG/RANK/RANKL axis in prostate cancer invasion and bone metastasis. **Oncology reports**, v. 32, n. 6, p. 2605-2611, 2014.

LOURENÇO, S. de Queiroz Chaves et al. Classificações histopatológicas para o carcinoma de células escamosas da cavidade oral: revisão de sistemas propostos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 325-333, 2007.

LOBRIGATTE, M. F. P. et al. Clinical and epidemiological profile of penile cancer in regional referral service, campo mourão, paraná. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research – BJSCR**, Vol.9,n.1,p.20-23, 2014.

MANSUR, C. P. Molecular mechanisms of HPV- associated oncogenesis  
STERLING J.C. & TYING, S.K. (org.). **Human Papillomaviruses Clinical and Scientific Advances, Arnold, London**, p. 24-32, 2001.

MARTINS, T. R. et al. HPV genotype distribution in Brazilian women with and without cervical lesions : correlation to cytological data. **Virology Journal**, v. 13, n. 138, p. 1–9, 2016.

MENDES, Juliana Melo Macedo et al. **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**. 2017. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, 2017.

MIKAMI, S. et al. Increased RANKL expression is related to tumour migration and metastasis of renal cell carcinomas. **The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland**, v. 218, n. 4, p. 530-539, 2009.

MINHAS, S. et al. Penile cancer—prevention and premalignant conditions. **Urology**, v. 76, n. 2, p. S24-S35, 2010.

MOSCONI A.M. et al. Cancer of the penis. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v.53, p.165-177, 2005.

NAGY, Vanja; PENNINGER, Josef M. Therankl-rank story. **Gerontology**, v. 61, n. 6, p. 534-542, 2015.

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

NUNES, Denise Strassburger et al. Diagnóstico clínico e histopatológico do câncer de pênis: a importância da biópsia pelo cirurgião geral. **Rev. Med Minas Gerais**, v. 13, n. 4, p. 248-50, 2003.

NYQUIST, M. D.; NELSON, P. S. Anti-Depressant Therapy Brightens the Outlook for Prostate Cancer Bone Metastases. **Cancer Cell**, 2017.

OHTAKA, M. et al. RANK/RANKL expression in prostate cancer. **International journal of surgery case reports**, v. 30, p. 106, 2017.

ONCOGUIA. **Tipos de estadiamento**. Equipe oncoguia, 2017. Disponível em: <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/tipos-de-estadiamento4900/725/>>. Acesso em: 20 maio 2019.

PAIVA, G. R. **Carcinoma de pênis: panorama da doença no estado da Bahia: considerações epidemiológicas e histopatológicas** [manuscrito], 2010.

PAPANASTASIOU, A. D.; SIRINIAN, C.; KALOFONOS, Haralabos P. Identification of novel human receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B isoforms generated through alternative splicing: implications in breast cancer cell survival and migration. **Breast Cancer Research**, v. 14, n. 4, p. R112, 2012.

PAULA, S.H. B.; SOUZA, M. J.L.; ALMEIDA, J.D. Câncer de pênis, aspectos epidemiológicos e fatores de risco: tecendo considerações sobre a promoção e prevenção na Atenção Básica. **BIS. Boletim do Instituto de Saúde**, v. 14, n. 1, p. 111-118, 2012.

PENG, Xi et al. Differential expression of the RANKL/RANK/OPG system is associated with bone metastasis in human non-small cell lung cancer. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e58361, 2013.

PFITZNER, B. M. et al. RANK expression as a prognostic and predictive marker in breast cancer. **Breast cancer research and treatment**, v. 145, n. 2, p. 307-315, 2014.

POMPEO, Antonio Carlos Luis. Câncer de pênis. Penilecancer-update. **Urology** (Ridgewood, N.J.), v.76, p.1-1, 2010.

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

PROWSE, D.M. et al. Human papillomavirus-associated increase in p16INK4A expression in penile lichen sclerosus and squamous cell carcinoma. **Br J Dermatol**. v.158, n.2, p.261-265, 2008.

RAJAIAN, S; GOPALAKRISHNAN, G; KEKRE, N.S. Auto amputation of penis due to advanced penile carcinoma. **Urol.**, v. 75, n.2, feb, p. 253-254. 2010.

RAJU, R. et al. A comprehensive manually curated reaction map of RANKL/RANK-signaling pathway. **Database**, v. 2011, 2011.

RAMOS, Walna Luisa Barros et al. **Prevalência e genotipagem do papilomavírus humano em carcinomas epidermóides penianos de pacientes do Estado do Maranhão**. 2017. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Saúde do Adulto/CCBS, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2017.

RAO, Shuan et al. RANKL and RANK: from mammalian physiology to cancer treatment. **Trends in cellbiology**, v. 28, n. 3, p. 213-223, 2018.

RAPÔSO, Maria do Carmo de Lima et al. A educação em saúde e a prevenção do câncer de pênis. **Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde-UNIT- Alagoas**, v. 3, n. 3, p. 177, 2017.

REIS, A. A. DA S. et al. Aspectos clínico-epidemiológicos associados ao câncer de pênis Clinico-epidemiological aspects associated with penile cancer. **Ciencia & Saude Coletiva**, v. 15, n. 1, p. 1105–1111, 2010.

RENEMA, N. et al. RANK–RANKL signalling in cancer. **Bioscience reports**, v. 36, n. 4, p. e00366, 2016.

SCHIFFMAN, M. et al. Human papillomavirus and cervical cancer. **The Lancet**, v. 370, n. 9590, p. 890-907, 2007.

SHANG, Wen-Qing et al. RANKL/RANK interaction promotes the growth of cervical cancer cells by strengthening the dialogue between cervical cancer cells and regulation of IL-8 secretion. **Oncology reports**, v. 34, n. 6, p. 3007-3016, 2015

SHIMAMURA, M et al. O.PG/RANKL/RANK axis is a critical inflammatory signaling system in ischemic brain in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 22, p. 8191-8196, 2014.

SIGL, V.; PENNINGER, J. M. RANKL/RANK—from bone physiology to breast cancer. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 25, n. 2, p. 205-214, 2014.

SILVA, R. S. et al. Aspectos demográficos e epidemiológicos da mortalidade por câncer no pênis. **ActaPaulista de Enfermagem**, v. 27, n. 1, p. 44–47, 2014.

SISAY, M; MENGISTU, G; EDESSA, D. The RANK/RANKL/OPG system in tumorigenesis and metastasis of cancer stem cell: potential targets for anticancer therapy. **OncoTargets and therapy**, v. 10, p. 3801, 2017.

SONPAVDE, G. et al. Penile cancer: Current therapy and future directions. **Annals of Oncology**, v. 24, n. 5, p. 1179–1189, 2013.

SOUSA, I.D. B. Prevalence of human papillomavirus in penile malignant tumors:viral genotyping and clinical aspects. **BMC Urology**, 2015.

SPIESS, P. E. et al. Pathophysiological basis of human papillomavirus in penile cancer: Key to prevention and delivery of more effective therapies. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 66, n. 6, p. 481-495, 2016.

SUDENGA, S. L. et al. Genital human papillomavirus infection progression to external genital lesions: the HIM study. **European urology**, v. 69, n. 1, p. 166-173, 2016.

TORBRAND, C. et al. Socioeconomic factors and penile cancer risk and mortality; a population-based study. **Bju international**, v. 119, n. 2, p. 254-260, 2017.

TRIEB, K; WINDHAGER, R. Receptor activator of nuclear factor κB expression is a prognostic factor in human osteosarcoma. **Oncology letters**, v. 10, n. 3, p. 1813-1815, 2015.

TYROVOLA, J. B. et al. Root resorption and the OPG/RANKL/RANK system: a mini review. **Journal of oral science**, v. 50, n. 4, p. 367-376, 2008.

VELAZQUEZ, E. F.; CHAUX, A.; CUBILLA, A. L. Histologic classification of penile intraepithelial neoplasia. **Seminars in Diagnostic Pathology**, v. 29, n. 2, p. 96–102, 2012.

VIDAL, F. C. B. Análise crítica dos métodos moleculares para detecção do papilomavírus humano: revisão da literatura. **Femina**, v.40, n.5, p. 264-267, 2012

VYAS, N. S. et al. Role of Histological Findings and Pathologic Diagnosis for Detection of Human Papillomavirus Infection in Men. **Journal of Medical Virology**, v. 87, n. 10, p. 1777– 1787, 2016.

XIONG, Ming-Yue et al. Effects of osteoprotegerin, RANK and RANKL on bone destruction and collapse in avascular necrosis femoral head. **American journal of translational research**, v. 8, n. 7, p. 3133, 2016.

WALHART, T. Human papillomavirus biology, pathogenesis, and potential for drug discovery: a literature review for HIV nurse clinical scientists. **Journal of the Association of Nurses in AIDS Care**, v. 26, n. 6, p. 693-702, 2015.

WANICK, F.B.F. Carcinomaepidermoide do pênis: estudo clínico-patológico de 34 casos. **An. Bras.Dermatologico**, 2011.

WEI, Feixue et al. Human papillomavirus prevalence and associated factors in women and men in south China: a population-based study. **Emerging microbes & infections**, v. 5, n. 1, p. 1-8, 2016.

WOODMAN, C. et al. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues - ProQuest. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. January, p. 11–22, 2007.

WU, J. B. et al. MAOA-dependent activation of Shh-IL6-RANKL signaling network promotes prostate cancer metastasis by engaging tumor-stromal cell interactions. **CancerCell**, v. 31, n. 3, p. 368-382, 2017.

WÜNSCH FILHO, V.; MIRRA, A. P. Tabagismo e câncer no Brasil: evidências e perspectivas. **Rev. Bras. Epidemiologia**. Vol. 13;n.2; p. 175-85, 2010.

YU, Yong-Bo et al. The relationship between human papillomavirus and penile cancer over the past decade: a systematic review and meta-analysis. **Asian journal of andrology**, v. 21, n. 4, p. 375, 2019.

ZHANG, L. et al. Receptor activator for nuclear factor  $\kappa$  B expression predicts poor prognosis in breast cancer patients with bone metastasis but not in patients with visceral metastasis. **Journal of clinical pathology**, v. 65, n. 1, p. 36-40, 2012

ZOZERTTO, R. HPV e o câncer masculino. **Revista Pesquisa FAPESP**, Ed. 257, julho, 2017. Disponível em:<<https://revistapesquisa.fapesp.br/2017/07/18/hpv-e-cancer-masculino/>>. Acesso em: jun. 2019.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342–350, 2002.

## **ANEXOS**

### **Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

#### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Você está sendo convidado (a) como voluntário (a) para o armazenamento (guarda) do seu material biológico no Biobanco de Tumores do Maranhão, que poderá ser utilizado em pesquisas futuras. O motivo de estudarmos esse assunto é que muitas pessoas sofrem por causa desta doença, por isso faz-se necessário investigar sobre os fatores que facilitam seu desenvolvimento, novas possibilidades de diagnóstico e tratamentos melhores.

Se você aceitar participar com o armazenamento de seu material biológico neste Biobanco, parte do material retirado para seus exames de diagnóstico e/ou tratamento (tais como cirurgia, biópsia, coleta de sangue, etc.) serão encaminhados e guardados no Biobanco de Tumores do Maranhão para as análises necessárias. É importante ressaltar que somente será guardado o material excedente, ou seja, aquele que sobrar dos procedimentos realizados pela instituição hospitalar responsável pelo seu diagnóstico e/ou tratamento, não sendo necessário que você seja submetido a outro procedimento para coleta do material.

A pesquisa apresenta um desconforto mínimo, pelo possível constrangimento em consentir parte de seu material biológico para ser analisado, não havendo riscos adicionais, pois o Biobanco ficará responsável apenas pelo armazenamento do material já coletado. Como direito seu destacamos a possibilidade de esclarecimento de suas dúvidas de acordo com seu questionamento. Você tem assegurado o direito a ressarcimento ou indenização no caso de quaisquer danos eventualmente produzidos pela pesquisa. Não haverá remuneração ou ajuda de custo (ressarcimento) pela sua participação e o Biobanco não intervirá em seu tratamento atual, contudo a pesquisa realizada por meio de sua concessão beneficiará de forma significativa o crescimento científico da área estudada, contribuindo para o desenvolvimento futuro de novos tratamentos.

A sua participação é voluntária, você poderá recusar ou sair da pesquisa em qualquer momento, bastando para isso, comunicar aos responsáveis pela investigação, sem prejuízo algum para você. Caso você recuse ou decida retirar-se da pesquisa, o material será descartado conforme as normas da legislação sanitária.

Todas as informações coletadas serão estritamente confidenciais e utilizadas somente para fins de estudo. Os seus dados serão identificados em um código e, não, com o nome. Apenas os membros da pesquisa terão conhecimento dos dados, assegurando assim a sua privacidade. Os resultados deste estudo podem ser publicados, mas sua identificação não será revelada. Você tem o direito de conhecer os resultados obtidos com a utilização de seu material biológico, contatando a gerente do Biobanco pelo telefone abaixo.

Se você concordar, seu material poderá ser utilizado para pesquisas futuras, caso algum pesquisador com projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário – UFMA queira utilizar esse material. Pelo contrário, caso deseje, você poderá optar pela necessidade de ser contatado a cada novo projeto de pesquisa que utilize o material armazenado para permitir ou não a sua utilização. No final desse documento você poderá escolher umas dessas opções.

Sempre que tiver dúvidas ou necessitar de esclarecimentos sobre a pesquisa, você poderá contatar a Gerente do Biobanco de Tumores do Maranhão, Profa. Luciane Maria Oliveira Brito, pelo número (98) 2109-1000, ou sobre os aspectos éticos, contatar a Coordenação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário, situado à Barão de Itapary, nº227, Centro ou pelo telefone (98) 2109-1242. Em caso de denúncias ou questões éticas relativas à pesquisa, o CEP também deverá ser contatado.

Os Comitês de Ética em Pesquisa são colegiados interdisciplinares e independentes, de relevância pública, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, criados para garantir a proteção dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos.

Se concordar em participar, você deverá assinar este termo de consentimento em duas vias e rubricar em todas as páginas juntamente com o pesquisador responsável. Uma cópia fica com você e a outra com o Pesquisador.

Eu, \_\_\_\_\_, fui informado (a) dos objetivos da presente pesquisa, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da minha participação. Estou ciente que minha participação é isenta de despesas ou ganhos financeiros e que isto não irá interferir no meu tratamento. Ficou claro que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo neste serviço.

( ) Caso necessário, as minhas amostras armazenadas no Biobanco de Tumores e DNA do Maranhão podem ser utilizadas para pesquisas futuras aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário/UFMA.

( ) Desejo ser contatado para autorizar a utilização ou descarte das amostras cada vez que seja necessário e se no futuro não tiver condições de consentir na utilização ou descarte de meu material biológico armazenado, solicito que a autorização seja fornecida por algum familiar com contato prévio.

Nome do familiar:

Endereço:

Fone:

São Luís, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante ou responsável

\_\_\_\_\_  
Entrevistador responsável

**Dados da Instituição Responsável pelo Biobanco de Tumores e DNA do Maranhão:** Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão- HU/UFMA. Unidade Presidente Dutra. Endereço: *Rua* Barão de Itapary, nº 227, Centro - São Luis-MA. CEP: 65020-070. E-mail: huufma@huufma.br. Fone: (98) 2109-1000.

**Coordenadora do Biobanco de Tumores do Maranhão:** Profa. Dra. Luciane Maria Oliveira Brito

Endereço: Rua Coelho Neto, nº311, Centro - São Luís - MA. CEP: 65020-560

Fone: (98) 2109-1273 / E-mail: btma@ufma.br

**Endereço do CEP-HUUFMA:** *Rua* Barão de Itapary, nº 227, Centro - São Luis-MA. CEP: 65020-070, Comitê de Ética em Pesquisa do HUUFMA, 4º andar. E-mail : cep@huufma.br fone: (98) 2109-1250

**Endereço do CONEP-** Conselho Nacional de Ética em Pesquisa- Conselho Nacional de Saúde - Esplanada dos Ministérios, Bloco "G" - Edifício Anexo, Ala "B" - 1º andar - Sala 103B - 70058-900 - Brasília, DF.

## Anexo B – Questionário sociodemográfico

### QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO CARCINOMA PENIANO

Data da coleta \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

1 - INSTITUIÇÃO: 1-HUUFMA ( ) 2-IMOAB ( ) 3-HG ( )

2 - FICHA DE REGISTRO

3 - Nº PRONTUÁRIO

4 - NOME DO PACIENTE: _____		
5 - DATA DE NASCIMENTO ____/____/____.		
6 - Cor/Raça: 1-branca ( ) 2-parda ( ) 3-preta ( ) 4-amarela( ) 5-indigena ( )		
7 - Naturalidade:		
8 - Residência:		9 - Telefone:
10 - Endereço:		
11 - Estado civil: 1-casado ( ) 2-solteiro ( ) 3-união consensual ( ) 4-viuvo ( ) 5-divorciado( )		
12 - Renda familiar 1ª Pessoa _____ 2ª pessoa _____ 3ª pessoa _____ 4ª pessoa _____ Renda Total: _____	13 - Nível de instrução: 1 - Sem instrução/fundamental incompleto ( ) 2 - Fundamental completo/médio incompleto ( ) 3 - Médio completo/superior incompleto ( ) 4 - Superior completo( )	
	14 - Nº de cômodos na casa:	
	15 - Água encanada na residência: 1-sim ( ) 2-não( )	
	16 - Tratamento de Esgoto: 1-sim ( ) 2-Não( )	
<b>HÁBITOS DE VIDA</b>		
17 - Tabagismo: 1-sim ( ) Tempo de tabagismo: _____ 2-não ( ) 3-ex- Tabagismo ( ) Há quanto tempo parou: _____ 4-passivo ( ) 18 - Tipo: _____ 19 - Cigarros/dia: _____	20 - Etilismo: 1-sim ( ) Frequência /sem _____ 2-não ( ) 3-Ex.Etilista( ) Há quanto tempo parou: _____ 21 - Tipo _____ 22 - Dose/dia _____	23 - Higiene da parte Genital: 1-não Realiza ( ) 2-água e sabão ( ) 24 - Expõem a Glande: 1-parcial ( ) 2-total ( ) 3-não ( )
<b>HÁBITOS SEXUAIS</b>		
25 - Idade da primeira relação: _____		26 - Atividade sexual atual: 1-sim ( ) 2-não ( )

<b>27 - Nº de parceiros durante a vida</b> _____.		
<b>28 - Parceiros fixos:</b> 1-sim ( )      2-não ( )		<b>29 - Circuncisão:</b> 1-sim ( ) 2-não ( )
<b>30 - Idade da circuncisão:</b> _____		
<b>31 - Orientação Sexual:</b> 1-homossexual ( )      2-heterossexual ( )      3-bissexual ( )      4-Zoofilia ( )		
<b>32 - Já teve relação homossexual:</b> 1-sim ( )      2-não ( )		<b>33 - Penetração Anal:</b> 1-sim ( )      2-não ( )
<b>34 - Frequência de uso de camisinha:</b> 1-nunca ( )      2-as vezes ( )      3- sempre ( )		
<b>35 - Usou camisinha na última relação vaginal:</b> 1-sim ( )      2-não ( )		
<b>36 - Usou camisinha na última relação anal:</b> 1-sim ( )      2-não ( )		
<b>37 - Usa camisinha com parceira fixa:</b> 1-sim ( )      2-não ( )		
<b>38 - Usa camisinha com parceiras extraconjugais:</b> 1-sim ( )      2-não ( )		
<b>39 - Lava-se após as relações sexuais:</b> 1-sim ( )      2-não ( )		
<b>ANTECEDENTES MÓRBIDOS PESSOAIS E FAMILIARES</b>		
<b>40 - Verrugas genitais:</b> 1-sim ( ) 2-não ( )		<b>41 - Idade do aparecimento:</b> _____
<b>42 - HPV diagnosticado:</b> 1-sim ( ) quando: _____ 2-não ( )		<b>43 - Tratamento:</b> 1-sim ( ) quando: _____ 2-não ( )
<b>44 - Parceira com HPV diagnost:</b> 1-sim ( ) quando: _____ 2-não ( )		<b>45 - Tratamento:</b> 1-sim ( ) quando: _____ 2-não ( )
<b>46 - DST prévia</b> 1-sim ( ) 2-não ( )		<b>47 - Idade do aparecimento:</b> _____
<b>48 - Tipo de DST previa:</b> 1-cancro mole ( ) 2-condiloma acuminado ( ) 3- Gonorreia /esquentamento ( ) 4-herpes ( ) 5-linfogranuloma venéreo ( )      6-sífilis ( ) <b>outras :</b> _____		
<b>49 - Tratamento das DS'(s):</b> 1-sim ( ) Qual ? _____ 2-não ( )		
<b>50 - Balanite:</b> 1-sim ( ) Quando? _____ 2-não ( )		<b>51 -Trauma de pênis anteriormente:</b> 1-sim ( ) Quando? _____ 2-não ( )
<b>52 - Câncer prévio:</b> 1-sim( ) Quando? _____ 2-não ( )		<b>53 - Câncer na família:</b> 1-sim( ) Quando? _____ 2-não ( )
<b>54 - grau de parentesco:</b> _____		
<b>HISTÓRIA DA DOENÇA ATUAL</b>		
<b>55 - Data do aparecimento da lesão:</b> ____/____/____.		
<b>56 - Local do aparecimento da lesão inicial:</b>		

1-glande ( ) 2-prepúcio ( ) 3-haste do pênis ( ) 4-base do pênis ( )	
<b>57 - Tipo de lesão inicial:</b> 1-perda de pigmentação ou manchas esbranquiçadas ( ) 2-feridas e caroço no pênis ( ) 3-tumoração no pênis e /ou virilha ( ) 4-inflamação de longo período com vermelhidão e coceira ( ) 5-secreção e odor fétido ( )	
<b>58 - Auto conduta prévia:</b> 1-sim ( ) Qual ? _____ 2-não ( )	<b>59 - Evolução:</b> 1-piora ( ) 2-melhora ( ) 3-inalterado ( )
<b>60 - Tratamento prévio:</b> 1-sim ( ) Qual ? _____ 2-não ( )	<b>61 - Evolução:</b> 1-piora ( ) 2-melhora ( ) 3-inalterada ( )
<b>62 - Procura ao centro de saúde:</b> _____/_____/_____	<b>63 - Data do diagnóstico:</b> _____/_____/_____
	<b>64 - Tipo de atendimento:</b> _____/_____/_____.
<b>65 - Estadiamento ao diagnóstico:</b> _____	<b>66 - Grau histológico:</b> _____
<b>67 - Tratamento:</b> 1-Penectomia ( ) 2-Quimioterapia ( ) 3-Radiologia ( ) outros ( )	
<b>68 - Data do início do tratamento:</b> ____ / ____ / ____	<b>69 - Depressão:</b> 1-sim ( ) 2-não ( )
<b>70 - Recidiva:</b> 1-não ( ) 2-local ( ) 3-regional ( ) 4-á distancia ( )	<b>71 - Data da recidiva:</b> ____/____/_____.
<b>ANEXO C – TESTE DE FAGERSTROM</b>	
<b>72 - Quanto tempo depois de acordar você fuma o primeiro cigarro?</b> 0-mais de 60 min ( ) 1-entre 31 e 60 min ( ) 2-entre 6 e 30 min ( ) 3-menos de 6 min ( )	
<b>73 - Você tem dificuldade de ficar sem fumar em locais proibidos?</b> 0-não ( ) 1-sim ( )	
<b>74 - O primeiro cigarro da manhã é o que traz mais satisfação?</b> 0-não ( ) 1-sim ( )	
<b>75 - Você fuma mais nas primeiras horas da manhã do que no resto do dia?</b> 0-não ( ) 1-sim ( )	
<b>76 - Você fuma mesmo quando acamado por doença?</b> 0-não ( ) 1-sim ( )	
<b>77 - Quantos cigarros você fuma por dia?</b> 0-menos de 11 ( ) 1- de 11 a 20 ( ) 2- de 21 a 30 ( ) 3- mais de 30 ( )	<b>Grau de dependência:</b> 0-2 pontos- muito baixo; 3-4 pontos-baixo; 5 pontos-médio; 6-7 pontos-elevado; 8-10 pontos-muito elevado.
<b>78 - TOTAL DE PONTOS – ( )</b>	

Entrevistador: \_\_\_\_\_.

## Anexo C – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em pesquisa – CEP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ENVOLVIMENTO DO EIXO RANK ( Receptor ativador do fator nuclear kappa B)/RANKL (Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B) EM TUMORES PENIANOS E SUA CORRELAÇÃO COM O COMPORTAMENTO TUMORAL.

**Pesquisador:** JHESSICA IVANILDE SILVA GOMES

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 83652518.7.0000.5086

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

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.546.916

#### Apresentação do Projeto:

##### INTRODUÇÃO:

O câncer de pênis é um tumor raro, com maior incidência em homens a partir dos 50 anos, embora possa atingir também os mais jovens (Favorito et al., 2008). O Brasil é um país com uma das maiores incidências de câncer de pênis no mundo, com frequência variável, esse tipo de tumor representa 2% de todos os tipos de câncer que atingem o homem, sendo mais frequente nas regiões norte e nordeste do país, apresentando também um elevado índice de mortalidade (Bleeker et al., 2009). Segundo Bleeker et al. (2009), a etiologia do câncer de pênis ainda é incerta, porém está diretamente relacionado com a presença de fimose, baixas condições socioeconômicas, déficit de higiene, tabagismo, multiplicidade de parceiros e ausência de circuncisão. A infecção por certos subtipos de papilomavírus humano (HPV), principalmente dos grupos 16, 18, 31 e 33, também tem sido implicada na gênese tumoral (Paw-Sang, 2010). O tipo histológico mais frequente de câncer de pênis é o carcinoma epidermóide, também denominado espinocelular ou escamoso (CEC), que representa 95% dos tumores malignos do pênis. O carcinoma in situ, também conhecido como eritroplasia de Queyrat e doença de Bowen, apresentam uma incidência considerável e manifestam-se na forma de modificações celulares epiteliais não invasiva (Mosconi et al., 2005). O diagnóstico de câncer peniano é feito por meio de biópsia incisional da lesão, cujos principais diagnósticos diferenciais são cancro sifilítico, cancro mole e condiloma

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

**Bairro:** CENTRO

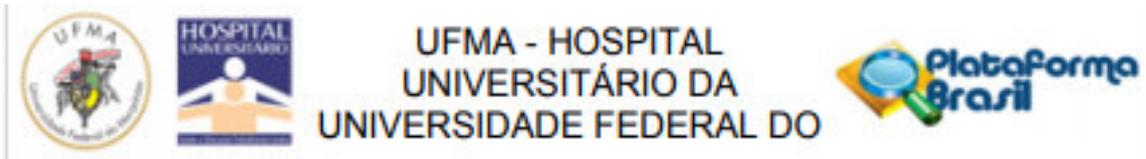
**UF:** MA

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

**Município:** SAO LUIS

**CEP:** 65.020-070

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



Continuação do Parecer: 2.548.918

Eventuais modificações ao protocolo devem ser inseridas à plataforma por meio de emendas de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Relatórios parcial e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente após a coleta de dados e ao término do estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_993338.pdf	18/02/2018 20:42:15		Aceito
Outros	decrespfinancelra.pdf	18/02/2018 15:09:29	JHESSICA IVANILDE SILVA	Aceito
Outros	termodecompromisso.pdf	18/02/2018 15:08:42	JHESSICA IVANILDE SILVA	Aceito
Outros	termoanuencia.pdf	18/02/2018 15:08:00	JHESSICA IVANILDE SILVA	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	18/02/2018 14:52:47	JHESSICA IVANILDE SILVA	Aceito
Outros	AceiteHospitalGeral.pdf	04/01/2018 20:40:17	JHESSICA IVANILDE SILVA	Aceito
Outros	aceiteaidenorabelo.pdf	04/01/2018 20:38:13	JHESSICA IVANILDE SILVA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.docx	04/01/2018 20:36:17	JHESSICA IVANILDE SILVA GOMES	Aceito
Outros	autorizacaobiobanco.pdf	20/12/2017 15:01:58	JHESSICA IVANILDE SILVA	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	20/12/2017 14:59:00	JHESSICA IVANILDE SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	dispensatcle.pdf	20/12/2017 14:58:00	JHESSICA IVANILDE SILVA GOMES	Aceito
Outros	PARECER.pdf	20/12/2017 14:11:40	JHESSICA IVANILDE SILVA	Aceito
Outros	conep.pdf	13/11/2017 16:45:36	JHESSICA IVANILDE SILVA	Aceito
Outros	autorizacao.pdf	13/11/2017 16:45:10	JHESSICA IVANILDE SILVA	Aceito

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

CEP: 65.020-070

UF: MA Município: SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

E-mail: cep@huufma.br



Continuação do Parecer: 2.548.918

Outros	regimento_biobanco.pdf	13/11/2017 16:43:41	JHESSICA IVANILDE SILVA	Aceito
Orçamento	Orçamento.docx	03/10/2017 11:23:24	JHESSICA IVANILDE SILVA	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO LUIS, 16 de Março de 2018

---

**Assinado por:**  
Rita da Graça Carvalho Frazão Corrêa  
(Coordenador)

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

**Bairro:** CENTRO

**CEP:** 65.020-070

**UF:** MA **Município:** SAO LUIS

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

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

## Anexo D- Normas da Revista

International Brazilian Journal of Urology

Classificação Webqualis: Medicina II-B2

Os manuscritos devem ser escritos em inglês ou português atual. Uma carta de submissão assinada por todos os autores deve acompanhar cada manuscrito.

O International Braz J Urol contém seis seções: artigos originais, artigos de revisão, seção de vídeo, página de radiologia, técnicas cirúrgicas e casos clínicos Desafiadores. Os artigos devem ser escritos em ortografia oficial em português ou inglês. Um dos autores deve ser designado como correspondente e o endereço de correspondência completo, números de telefone e fax e e-mail devem ser fornecidos.

**International Braz J Urol** requer uma lista de verificação PRISMA completa e fluxograma como uma condição de submissão ao relatar descobertas de uma revisão sistemática ou meta-análise. Modelos para estes podem ser encontrados aqui ou no site PRISMA, que também descreve várias extensões PRISMA para diferentes projetos e tipos de dados além das revisões sistemáticas convencionais que avaliam ensaios randomizados. No mínimo, seu artigo deve relatar o conteúdo abordado por cada item da lista de verificação. O atendimento desses requisitos básicos de relatórios melhorará muito o valor de sua análise e poderá aumentar suas chances de publicação.

### Estrutura dos artigos

O número de autores deve ser limitado a três. Resumo (máximo de 200 palavras) e deve conter principais achados: Relato caso (s) relevante (s) - Hipótese (s) do caso: Premissa proposta que substancia a descrição do (s) caso.

-Implicações futuras promissoras: Delinear brevemente o que poderia acrescentar? Linhas de pesquisa que podem ser abordadas. Texto completo (máximo de 2000 palavras):

- Cenário: Descrição do (s) caso (s) relevante (s) anterior (es) e existente (s);

- Hipótese e racionalidade de caso (s): preceitos, raciocínio clínico e básico que sustentam a hipótese do caso e o cenário levantado. Por que é importante e está sendo relatado?

- Discussão e perspectivas futuras: o que poderia acrescentar e como isso se relaciona com a literatura atual. 'Mensagem para levar para casa' - lições aprendidas;
- Limites de tabelas e / ou figuras: 2 (placas de agregação de múltiplas imagens são encorajadas) cada tabela ou figura excedente irá diminuir 250 palavras do texto completo;
- Número de referências: 10-15.

### **ILUSTRAÇÕES:**

- 1) O número de ilustrações não deve exceder 10 por manuscrito.
- 2) Verifique se cada figura é citada no texto.
- 3) As legendas devem ser enviadas em uma página separada.
- 4) As legendas das ilustrações histológicas devem conter a técnica histológica e a ampliação final.
- 5) A International Braz J Urol incentiva a reprodução de cores de ilustrações, sempre que apropriado.
- 6) Todas as ilustrações histológicas devem ser fornecidas em cores.

**REFERÊNCIAS:** As referências devem ser numeradas seguindo a sequência em que são mencionadas no texto. As referências não devem ser alfabetizadas. Eles devem ser identificados no texto com algarismos arábicos entre parênteses. Não inclua material não publicado e comunicações pessoais na lista de referências. Se necessário, mencione isso no corpo do texto. Para abreviações de nomes de periódicos, consulte a "Lista de periódicos indexados no Index Medicus" (<http://www.nlm.nih.gov>). Os autores devem apresentar as referências de acordo com os exemplos a seguir; os nomes de todos os autores devem ser incluídos; quando existem mais de seis autores, liste os seis primeiros autores seguidos de et al. As páginas inicial e final da referência devem ser fornecidas:

### **Trabalhos publicados em periódicos:**

- Paterson RF, Lifshitz, Kuo RL, Siqueira Jr., Lingeman JE: monoterapia com litotripsia por ondas de choque para cálculos renais. Int Braz J Urol. 2002; 28: 291-301.
- Holm NR, Trompa T, Smedts F, Nordling J, de laRossete J: A morfologia ultraestrutural das células musculares lisas do detrusor humano caracteriza a retenção urinária aguda? J Urol. 2002; 167: 1705-9.

**Livros:**

- Sabiston DC: Livro de Cirurgia. Filadélfia, WB Saunders. 1986; vol. 1, p. 25

**Capítulos em livros:**

- Penn I: Neoplasias no receptor de aloenxerto. Em: Milford EL (ed.), Transplante Renal. Nova Iorque, Churchill Livingstone. 1989; pp. 181-95.

O Int Braz J Urol tem o direito de rejeitar manuscritos inadequados (apresentação, número de cópias, assuntos, etc.), bem como propor modificações no texto original, de acordo com a opinião do árbitro e do conselho editorial.

## ASPECTOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS DO CARCINOMA DE PÊNIS: UMA ANÁLISE DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA

GOMES, Jhessica Ivanilde Silva; BRITO, Haissa Oliveira; BRITO, Luciane Maria Oliveira.

### RESUMO

**INTRODUÇÃO:** O carcinoma peniano pode acarretar grande morbidade, tanto pela doença quanto pelo tratamento, que inclui amputação parcial ou total do órgão. **OBJETIVO:** Avaliar as evidências disponíveis na literatura a respeito das características clínicas e epidemiológicas do câncer de pênis. **MÉTODOS:** Trata-se de um estudo de revisão integrativa. Foram selecionados 40 artigos, destacando aqueles que responderam ao objetivo proposto por este estudo. Segundo os critérios de inclusão 24 foram selecionados para análise. **RESULTADOS:** No Brasil, contabiliza para 2% de todos os tumores em homens, alcançando 10% em algumas regiões (Norte e Nordeste), e é uma das nações com maior incidência desta doença totalizando 8,3 casos por 100.000 habitantes. Os fatores de risco são múltiplos como: falta de higiene, fimose, HPV, baixas condições socioeconômicas e de instrução e à má higiene íntima. O tipo histológico mais frequente de câncer de pênis é o carcinoma epidermóide, também denominado espinocelular ou escamoso e representa 95% dos tumores malignos do pênis. **CONCLUSÃO:** Fatores como os dados clínicos e histopatológicos, idade avançada e a classificação do tumor em T2 ou T3 de alguns pacientes, podem sugerir demora na procura por assistência médica ou dificuldade de acesso à saúde.

**Descritores:** Câncer. Pênis. Epidemiologia.

### INTRODUÇÃO

O câncer de pênis é uma neoplasia rara cuja incidência está relacionada às condições socioeconômicas locais, acometendo principalmente homens de países em desenvolvimento. As lesões na glândula usualmente são as precursoras do carcinoma peniano que, gradativamente, estende-se para envolver todo o pênis. A apresentação clínica pode variar, sendo a ulceração do prepúcio e da glândula os achados clínicos mais prevalentes (1).

A incidência de câncer de pênis é de 22.000 casos novos por ano em todo o mundo, sendo a maior taxa visualizada na África, América do Sul e Ásia (2 a 4/100.000 habitantes). No Brasil, representa de 5% a 16% dos tumores que atingem a população masculina, variando conforme o perfil socioeconômico de cada região (2).

O carcinoma peniano pode acarretar grande morbidade, tanto pela doença em si quanto pelo tratamento, que inclui a amputação parcial ou total do órgão. A taxa de mortalidade relacionada a esta neoplasia varia de 26,7 a 41%. O diagnóstico precoce reduz estas taxas e possibilita tratamentos menos agressivos, contribuindo para uma melhor qualidade de vida destes homens. Capacitar os médicos para o reconhecimento precoce deste tipo de câncer e, por outro lado, alertar a população leiga, certamente poderá melhorar este cenário (3).

A etiologia do câncer de pênis ainda não foi completamente esclarecida podendo ser associada a diversos fatores como: déficit de higiene, presença de fimose, tabagismo, ausência de circuncisão, baixas condições socioeconômicas, elevado número de parceiros sexuais e a infecções por Papilomavírus Humano(4).

Considerando o carcinoma de pênis como problema de saúde pública, este estudo teve como objetivo avaliar as evidências disponíveis na literatura a respeito das características clínicas e epidemiológicas do câncer de pênis.

## **METODOLOGIA**

Trata-se de um estudo descritivo/exploratório, documental e retrospectivo, do tipo revisão integrativa. O estudo descritivo visa descrever as características de determinada população ou fenômeno ou o estabelecimento de relações entre variáveis. A Revisão Integrativa configura-se, portanto, como um tipo de revisão da literatura que reúne achados de estudos desenvolvidos mediante diferentes metodologias, permitindo aos revisores sintetizar resultados de maneira, organizada, lógica e rigorosa sem ferir a filiação epistemológica dos estudos empíricos incluídos.

Obedeceu-se às seguintes etapas para sua elaboração: Identificação do tema e seleção da questão de pesquisa; estabelecimento de critérios para inclusão de estudos ou busca na literatura; definição das informações a serem extraídas dos estudos selecionados e categorização dos estudos; avaliação dos estudos incluídos na revisão, interpretação dos resultados e apresentação da revisão final.

Para obtenção das publicações a serem incluídas na revisão, o levantamento bibliográfico foi realizado por meio das publicações veiculadas em periódicos científicos disponíveis online, no LILACS (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde), SciELO (Scientific Electronic Library Online) e PUBMED

sobre o tema: aspectos clínico-epidemiológicos do carcinoma de pênis. Os critérios para seleção dos artigos foram: todas as categorias de artigo (original, revisão de literatura, relato de caso), artigos com textos completos disponíveis; os que foram publicados nos idiomas inglês e português entre os anos de 2007 a 2017. Foram excluídos os estudos publicados anteriores ao período estabelecido no estudo, os que não estavam indexados nas bases de dados selecionadas ou estavam em forma de teses, dissertações e monografia.

Dessa maneira, a presente revisão foi organizada seguindo a recomendação Prisma (Preferred Reporting Items for Systematic Review sand Meta-Analyses), com elaboração de um fluxograma em quatro etapas que estão descritas a seguir e ilustradas na Figura 1. A recomendação Prisma consiste em um *checklist* com 27 itens e um fluxograma de quatro etapas, permitindo tanto melhorar o relato das revisões sistemáticas e meta-análises como auxiliar na crítica de revisões sistemáticas publicadas (5).

Etapa 1 – a busca pelos artigos foi realizada nas seguintes bases de dados: Scielo, LILACS e PUBMED, com os seguintes descritores: Penile Cancer OR Penile Cancer AND (Sexually Transmitted Infection OR HPV OR Treatment), que deveria estar presente no corpo do texto, sem restrição de ano.

Etapa 2 – foi feita a leitura dos títulos para verificar sobreposição dos estudos entre os levantamentos das três bases de dados e para exclusão dos artigos anteriores a 2007.

Etapa 3 – em seguida, foi realizada a leitura dos títulos e dos resumos para verificar se os estudos se enquadravam no escopo de análise. Os critérios de exclusão foram: trabalhos que não estivessem em forma de artigo; estudos que não tinham como temática do câncer de pênis; estudos que não envolviam exclusivamente indivíduos com câncer de pênis e artigos em outro idioma sem ser o português e inglês.. Foram incluídos artigos que abordavam a temática da proposta, bem como suas características na população, formas de prevenção e tratamento.

Etapa 4 – por fim, foi realizada a leitura na íntegra dos artigos selecionados para posterior categorização e análise quanto ao ano, base de dados, abordagem da temática e tipo de estudo, após terem sido aplicados todos os critérios de elegibilidade.



No Brasil, ele contabiliza para 2% de todos os tumores em homens, alcançando 10% em algumas regiões (Norte e Nordeste), e é uma das nações com maior incidência desta doença totalizando 8,3 casos por 100.000 habitantes(6).O Maranhão apresenta o maior número de casos de câncer de pênis, causado principalmente pelo baixo índice de desenvolvimento humano (7).

O estudo realizado pela Sociedade Brasileira de Urologia em 2007 mostrou as taxas de incidência de câncer de pênis invasivo no Brasil, onde o estado do Maranhão (10,66%) aparece em 3º lugar, ficando atrás de São Paulo (24,26%) e Ceará (12,87%). Segundo a mesma sociedade, são realizadas cerca de 1000 amputações penianas por ano(8).

Segundo Lobrigatte, et al. (2015)(9), em seu estudo a idade média dos pacientes com CP foi de 67 anos, onde a menor e a maior idade foram, respectivamente, 39 e 89 anos, sendo a raça branca a mais acometida.

Os fatores de risco para câncer de pênis são múltiplos como: falta de higienização, presença de fimose, infecção pelo HPV, às baixas condições socioeconômicas e de instrução, à má higiene íntima, aos homens que não se submeteram à circuncisão e apresentam resistência em procurar assistência médica (4). Existem outros fatores relacionados ao câncer de pênis como: o número elevado de parceiros sexuais; tratamento com fotoquimioterápico, com psoraleno e radiação ultravioleta; balanopostite e líquen escleroso; início precoce de vida sexual e o tabagismo (10).

A higiene adequada e a circuncisão precoce previnem a ocorrência da neoplasia na fase adulta. A fimose é encontrada em aproximadamente 85% dos pacientes com câncer de pênis, estando relacionada às lesões pré-cancerígenas(11).

O HPV é um grande fator de risco para câncer de pênis, porém seu papel no desenvolvimento da patologia ainda não está claro. Prowse et al. (2008) (12) encontraram o DNA do HPV em 54% dos tumores de pênis. O HPV atinge o epitélio escamoso do órgão genital masculino da mesma forma que atinge o feminino, com formação de condilomas e alteração neoplásica, sendo os tipos 16, 18,31 e 33 relacionados com carcinoma in situ e invasivo, tendo o HPV 16 como o tipo o mais frequente (12).

Estudos epidemiológicos demonstram uma correlação forte entre o câncer de pênis e o câncer de colo do útero. Mulheres cujos parceiros apresentam câncer de

pênis possuem risco de 2,8 a 3,2 maior para o desenvolvimento de câncer de colo do útero. Tais achados apresentam o HPV como um dos agentes do câncer de colo do útero, tornando provável a associação entre o HPV e câncer de pênis(8).

## **APRESENTAÇÃO CLÍNICA**

Em sua apresentação inicial a alteração celular ocorre nos tecidos da glândula e prepúcio. A velocidade de crescimento dos tumores papilares e ulcerativos é semelhante e ambos, quando não tratados, podem evoluir para amputação peniana. A fáscia de Buck age como uma barreira natural temporária a invasão tumoral, protegendo os corpos cavernosos do acometimento neoplásico. A penetração da fáscia de Buck e da túnica albugínea permite invasão do espaço vascular intracorpóreo e estabelece o potencial de disseminação hematogênica da doença (12).

Os tumores penianos são classificados em: carcinoma in situ, carcinoma epidermóide de células escamosas (CEC), carcinoma sarcomatoso, carcinoma verrucoso, carcinoma epidermóide de variante verrucosa, carcinoma basaloide, carcinoma papilar e adenocarcinoma(12). O tipo histológico mais frequente de câncer de pênis é o carcinoma epidermóide, também denominado espinocelular ou escamoso (CEC), que representa 95% dos tumores malignos do pênis (10).

Microscopicamente, carcinoma epidermoide de pênis (CEP) é constituído por células escamosas e forma tumorações exofíticas ou ulceradas que infiltram em diferentes profundidades os tecidos vizinhos. Sua graduação histológica é estabelecida de acordo com grau de diferenciação celular, número relativo de mitoses e presença de “pontes” intercelulares, agregados queratínicos e necrose tecidual(11).

No que diz respeito à metástase, a disseminação do câncer de pênis advém geralmente por linfonodos da região ilíaca e femoral, podendo apresentar comprometimento unilateral ou bilateral. Estudos afirmam que neste tipo de tumor ocorre invasão óssea(13).

O sistema de classificação e estadiamento do câncer foi instituído devido à necessidade de padronizar a terminologia utilizada. Dois sistemas são utilizados em câncer de pênis, a classificação de Jackson e o sistema TNM. O estadiamento de Jackson classifica a doença em quatro estágios clínicos e é representado por meio

de números romanos de I a IV (Tabela 1). O sistema TNM classifica conforme o tamanho, grau e infiltração em profundidade (T), quantidade e tamanho dos nódulos regionais acometidos (N) e presença de metástase à distância (M) (Tabela 2)(11).

**Tabela 1 - Classificação de Jackson**

<b>Estágio I</b>	Encontra-se circunscrito à glândula e ao prepúcio, sem envolvimento do corpo do pênis ou do corpo cavernoso
<b>Estágio II</b>	Ocorre invasão de corpos cavernosos ou haste peniana, mas sem disseminação para linfonodos.
<b>Estágio III</b>	Apresenta disseminação clínica nos linfonodos regionais da virilha. A possibilidade de cura depende do número e da extensão dos linfonodos envolvidos.
<b>Estágio IV</b>	Tumor invadindo estruturas adjacentes, presença de massas pélvicas, ou metástase à distância.

Fonte: adaptado de Reis et al. (2010)

**Tabela 2 - Estadiamento TNM**

<b>T – Tamanho do tumor e grau de Infiltração</b>	
<b>Tx</b>	Tumor não definido.
<b>T0</b>	Sem evidências de tumor primário.
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ (doença de Bowen ou Eritroplasia de Queyrat)
<b>Ta</b>	Carcinoma verrucoso não-invasivo.
<b>T1</b>	Tumor invadindo tecido conjuntivo sub-epitelial.
<b>T2</b>	Tumor invadindo corpo esponjoso ou cavernoso.
<b>T3</b>	Tumor invadindo uretra ou próstata.
<b>T4</b>	Tumor invadindo outras estruturas adjacentes.
<b>N – Situação dos linfonodos</b>	
<b>Nx</b>	Linfonodos regionais não podem ser avaliados.
<b>N0</b>	Ausência de metástase em linfonodos regionais.
<b>N1</b>	Metástase em um único linfonodo regional superficial.
<b>N2</b>	Metástase em linfonodos múltiplos ou bilaterais inguinais superficiais.
<b>N3</b>	Metástase em linfonodos regionais inguinais profundos ou pélvicos, uni ou bilaterais.
<b>M – Metástases</b>	
<b>Mx</b>	Presença de metástase à distância não pode ser avaliada.
<b>M0</b>	Ausência de metástase à distância.
<b>M1</b>	Presença de metástase à distância.

<b>M1a</b>	Metástases ocultas.
<b>M1b</b>	Metástases únicas em um único órgão.
<b>M1c</b>	Metástases múltiplas em um único órgão.
<b>M1d</b>	Metástases em múltiplos órgãos.

Fonte: adaptado de Reis et al. (2010)

O diagnóstico do carcinoma de pênis é realizado por meio de biópsia incisional da lesão, cujos principais diagnósticos diferenciais são cancro sífilítico, cancro mole e condiloma simples ou gigante<sup>13</sup>. Na maioria dos casos a doença é diagnosticada tardiamente, em decorrência da demora dos pacientes em procurarem atendimento, pela inexperiência dos médicos em diagnosticarem lesões precursoras de câncer de pênis ou pela dificuldade de acesso aos serviços de saúde(8).

De acordo com o tamanho e a profundidade da lesão, o tratamento do câncer de pênis é realizado através de aplicação tópica de creme de fluorouracil, radiação externa ou laser ou por meio de amputação parcial ou total do órgão. O tratamento do câncer de pênis consiste na abordagem da lesão primária e das regiões inguinais, sendo que a lesão primária deve ser tratada, preferencialmente, por cirurgia, cuja extensão varia desde prostatectomia, amputações parcial, total e até emasculação(11).

Os tumores superficiais pequenos podem ser tratados por meio de excisão cirúrgica local, quimioterapia, cirurgia a laser ou terapia de radiação superficial, os tumores com extensão maior e invasão de nódulos regionais são controlados com cirurgia ou radioterapia, porém, aqueles tumores mais invasivos são tratados por penectomia parcial ou total, variando de acordo com a região acometida. Os pacientes que apresentam metástase inguinal devem realizar a linfadenectomia(11). A abordagem radioterápica, por não permitir o correto estadiamento e por implicar em pior controle local da doença, fica reservada aos pacientes que recusam cirurgia (5).

Segundo o INCA, um terço dos casos de câncer no mundo poderia ser evitado através de métodos preventivos e formulação de campanhas de conscientização da população, diminuindo assim a incidência da doença e favorecendo diagnóstico nos estágios iniciais. A limpeza com água e sabão do órgão genital masculino, o uso de preservativo em todas as relações sexuais, a cirurgia de fimose e o autoexame do órgão são práticas que podem ser adotadas para redução da doença(6).

Diante da importância em desenvolver políticas públicas voltada a saúde do homem, foi instituído em 2009 a Política Nacional de Atenção Integral a Saúde do Homem (PNAISH) com o objetivo de implantar ações serviços de promoção, prevenção, assistência e recuperação da saúde. Considerando-se o aumento da incidência de câncer de pênis a PNAISH vem adotando medidas voltadas para a prevenção e diagnóstico precoce dessa patologia (15).

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Diante disso, conclui-se que fatores como: os dados clínicos e histopatológicos, idade avançada e a classificação do tumor em T2 ou T3 de alguns pacientes, podem sugerir demora na procura por assistência médica ou dificuldade de acesso à saúde. Dessa forma tornam-se necessárias ações para a detecção precoce da doença na população masculina.

A construção de políticas públicas voltadas para a população masculina constitui-se uma medida para incentivar a busca regular por cuidados de saúde por parte do homem. Tabagismo, infecção por HPV, déficit de higiene, ausência de circuncisão são os principais fatores de risco dessa patologia. O tipo histológico mais comum de câncer de pênis é o carcinoma epidermóide. O diagnóstico e o tratamento precoce reduzem consequências físicas, psicológicas e sexuais nos pacientes com CP. Por fim, torna-se necessário investir na produção de conhecimento científico sobre o câncer de pênis, enfatizando a promoção da saúde e a mobilização do homem para ações de prevenção dessa doença.

## **REFERÊNCIAS**

1. Favorito LA, Nardi AC, Ronalsa M, Zequi SC, Sampaio FJ, Glina S: Epidemiologic study on penile cancer in Brazil. *International braz j urol*, 2008;34:587-593.
2. Fernández-Nestosa MJ, Guimerà N, Sanchez DF, Cañete-Portillo S, Velazquez, EF, Jenkins D, Cubilla, AL Human Papillomavirus (HPV) Genotypes in Condylomas, Intraepithelial Neoplasia, and Invasive Carcinoma of the Penis Using Laser Capture Microdissection (LCM)-PCR. *The American journal of surgical pathology*, 2017;41: 820-832.

3. Teles ATT: Câncer de pênis: sentimentos e percepções de pacientes diagnosticados para amputação. Web ciência., disponível em: <webciencia.com/câncer-de-pênis diag-amputação,2011.
4. Bleeker MCG, Heideman DAM, Snijders PJF, Horenblas S, Dillner J, Meijer CJLM: Penile cancer: epidemiology, pathogenesis and prevention. World journal of urology,2009; 27: 141.
5. Wanick FBF, Teichner TC, Silva R, Magnanini MMF, Azevedo LMSD: Carcinoma epidermoide do pênis: estudo clínico-patológico de 34 casos. An. bras. Dermatol,2011; 86:1082-1091.
6. INCA, Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde. Câncer de pênis, 2016. Disponível em:<<http://www.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/penis>>. Acesso em: 7 agost 2017.
7. Coelho RWP, Pinho JD, Moreno JSN, AMT, Larges JS, Calixto JRR, Silva GEB: Penile cancer in Maranhão, Northeast Brazil: the highest incidence globally? BMC urology,2018;18: 50. Disponível em: <<https://bmcurol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12894-018-0365-0>>. Acesso em: 28 maio 2019.
8. Costa S, Rodrigues R, Barbosa L, Silva J C. B, J. OMCSQ: Câncer de pênis: epidemiologia e estratégias de prevenção. Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde-FACIPE, 2013;1: 23-33.
9. Lobrigatte MFP, Pereira EO, Saqueti E: Perfil clínico e epidemiológico do câncer de pênis em um serviço de referência regional, Campo Mourão, Paraná. Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research – BJSCR.2014; 9:20-23.
10. Pizzocaro G, Algaba F, Horenblas S, Solsona E, Tana S, Van Der Poel H, Watkin NA: EAU penile cancer guidelines. European urology, 2009; 57:1002-1012.
11. Reis AADS, Paula LBD, Paula AAPD, Saddi VA, Cruz ADD: Aspectos clínico-epidemiológicos associados ao câncer de pênis. Ciência & Saúde Coletiva, 2010;15:1105-1111.
12. Prowse DM, Ktori EN, Chandrasekaran D, Prapa A, Baithun S: Human papillomavirus-associated increase in p16INK4A expression in penile lichen sclerosus and squamous cell carcinoma. British Journal of Dermatology, 2008;158: 261-265.
13. Chaux A, Caballero C, Soares F, Guimarães GC, Cunha IW, Reuter V, et al: The prognostic index: a useful pathologic guide for prediction of nodal metastases and survival in penile squamous cell carcinoma. The American journal of surgical pathology, 2009; 33: 1049-1057.

14. Barros EM, Melo MCB: Câncer de pênis: perfil sócio-demográfico e respostas emocionais à penectomia em pacientes atendidos no serviço de Psicologia do Hospital de Câncer de Pernambuco. Rev. SBPH, 2009; 12: 99-111,

15. Martins AM, Moraes CALD, Ribeiro RBN, Almeida SSLD, Schall VT, Modena CM. A produção científica brasileira sobre o câncer masculino. Revista Brasileira de Cancerologia, 2013; 59: 105-112