

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ANÁLISE GENÔMICA GLOBAL DE CARCINOMAS PENIANOS DE
PACIENTES DO ESTADO DO MARANHÃO POR ARRAY-CGH
(*COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION*)**

ANTONIO AUGUSTO LIMA TEIXEIRA JÚNIOR

São Luís

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ANÁLISE GENÔMICA GLOBAL DE CARCINOMAS PENIANOS DE
PACIENTES DO ESTADO DO MARANHÃO POR ARRAY-CGH**
(COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION)

ANTONIO AUGUSTO LIMA TEIXEIRA JÚNIOR

Monografia apresentada ao Curso de
Ciências Biológicas da Universidade
Federal do Maranhão para obtenção do
grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Silma Regina Ferreira Pereira

Co-orientadora: Msc. Jaqueline Diniz Pinho

São Luís

2017

ANTONIO AUGUSTO LIMA TEIXEIRA JÚNIOR

**ANÁLISE GENÔMICA GLOBAL DE CARCINOMAS PENIANOS DE
PACIENTES DO ESTADO DO MARANHÃO POR ARRAY-CGH
(*COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION*)**

Monografia apresentada ao Curso de
Ciências Biológicas da Universidade
Federal do Maranhão para obtenção do
grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Silma Regina Ferreira Pereira
(Orientadora)

Profa. Dra. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos
(1º Examinador)

Prof. Dr. Gyl Eanes Barros Silva
(2º Examinador)

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

Lima Teixeira Júnior, Antonio Augusto.

ANÁLISE GENÔMICA GLOBAL DE CARCINOMAS PENIANOS DE
PACIENTES DO ESTADO DO MARANHÃO POR ARRAY-CGH COMPARATIVE
GENOMIC HYBRIDIZATION / Antonio Augusto Lima Teixeira
Júnior. - 2017.

99 f.

Coorientador(a): Jaqueline Diniz Pinho.

Orientador(a): Silma Regina Ferreira Pereira.

Monografia (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2017.

1. Alteração no número de cópias. 2. Câncer de Pênis.
3. HPV. I. Diniz Pinho, Jaqueline. II. Ferreira
Pereira, Silma Regina. III. Título.

A Deus, pelo milagre da vida.

Aos pacientes, razão principal dessa pesquisa.

Aos meus pais, Aldenir (*in memoriam*) e Antonio.

A minha irmã Ana Patrícia e ao meu cunhado Kerly.

Aos meus amigos e família pelo amor e cuidado.

Dedico este trabalho.

Agradecimentos

A Deus, pelo milagre da vida e por todos os momentos em que Ele me ajudou, mantendo minhas forças para continuar e revigorando meu coração sonhador dia após dia.

Aos pacientes, que em um momento tão delicado se dispuseram a participar dessa pesquisa. A eles dedico todos os resultados deste trabalho.

A minha mãe, Aldenir Rodrigues Teixeira (*in memoriam*), que nunca mensurou esforços para me ver feliz, contribuindo para que hoje eu possa trilhar os caminhos que a vida me tem proporcionado. Sua dedicação, amor e carinho me fazem todos os dias refletir sobre a vida e me estimulam a prosseguir ainda que os obstáculos tentem me desestimular. Amor de mãe é único, e em meu coração guardo o seu olhar, a sua voz e o seu sorriso, que todos os dias tanto me inspiram.

A minha irmã, Ana Patrícia Rodrigues Teixeira dos Reis, pelo duplo lugar em minha vida (mãe e irmã). É impossível relatar com palavras o quão importante foi o seu papel para que hoje eu estivesse aqui, buscando meus sonhos e crescendo. Agradeço a Deus pelo seu amor e cuidado.

Ao meu pai, Antonio Augusto Lima Teixeira, pelo amor e carinho dedicado a mim todos esses anos. No pai buscamos exemplo, garra e determinação para combatermos as batalhas da vida e apesar de todos os contratempos vividos, em você vejo afeto e cuidado por mim. Você é um dos maiores fertilizadores de sonhos que tenho na vida, o teu entusiasmo diante das minhas conquistas me faz querer enfrentar cada vez mais novos desafios.

Ao meu cunhado, Kerly dos Reis, por ser um segundo pai para mim. Agradeço pelo cuidado, amor e carinho dedicados em todos os momentos.

A Professora Silma Regina Ferreira Pereira, minha orientadora e amiga, pela oportunidade de ingressar no Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LabGeM), onde nasci, cresci e amadureci cientificamente. Agradeço pelos conselhos, críticas (gráficos) e momentos de amizade que tivemos durante os 3 anos (e muitos que virão) de LabGeM. A sua confiança em meu trabalho foi essencial para a execução dessa pesquisa.

Ao Grupo de Estudos em Câncer Peniano (GECAP), pelo suporte dado a realização desse trabalho. Tenho muita gratidão e carinho por todos os profissionais atuantes no grupo. Aos médicos que contribuíram desde o diagnóstico ao seguimento de todos os pacientes, Prof. Dr. José Calixto, Dr. Leudivan, Dr. Ronald, e em especial ao Prof. Dr. Gyl Eanes Barros

Silva, pela amizade e por sempre me incentivar e me fazer acreditar no meu potencial como profissional.

A Santana (Santinha), pelo amor e cuidado por mim em toda minha estadia no Laboratório de Genética e Biologia Molecular. Agradeço pelo carinho de mão dado a mim em diversos momentos de minha trajetória.

Ao Prof. Dr. Edvaldo Herculano, coordenador do Laboratório de Cultura de Tecidos do Instituto Evandro Chagas (Belém – PA), pela oportunidade de realizar meus ensaios de array-CGH no Instituto e pela disponibilidade em ajudar na pesquisa.

A Carolina Nassar, técnica do Laboratório de Cultura de Tecidos do Instituto Evandro Chagas, pela amizade e por disponibilizar dias de sua rotina contribuindo com a realização dos experimentos dessa pesquisa.

A Mc. Jaqueline Diniz Pinho, doutoranda em Genética na UFPA, pela amizade, companheirismo e trabalhos conjuntos desenvolvidos neste e em outros projetos na área. Agradeço por ver em mim o potencial que eu não via, e por sempre se dispor a ouvir minhas ideias mirabolantes com muita seriedade, mas sem nunca perder o senso de humor. Agradeço também pela ajuda salvadora em diversos momentos difíceis, com certeza sem você eu não teria chegado até aqui, sua amizade é preciosa para mim.

A Marta Regina de Castro Belfort e Juliana Melo, mestrandas em Ciências da Saúde na UFMA, colegas de Laboratório e amigas de vida. Agradeço por todo o suporte dado a realização desse trabalho, sem vocês nada disso seria possível.

Aos amigos do Laboratório de Genética e Biologia Molecular da UFMA, em especial ao Grupo de Pesquisa em Genética Humana e Médica, Israel Higino, Hugo Alves, Jenilson Mota, Patrícia Valéria, Raissa Lacerda, Vera Maciel, Vanessa Ribeiro, David Leite, Ana Laura e Diogo. E aos egressos do Laboratório que de alguma forma contribuíram com a minha jornada, Perla Lopes, Ana Carolina e Luís Lima.

Ao doutorando em Ciências da Saúde, Rossy-Eric Pereira Soares, por ser meu tutor logo que iniciei minhas atividades no LabGeM e por todas as várias conversas de corredor geradas por minhas dúvidas e suposições neste e em outros trabalhos. Agradeço pela sua disponibilidade em me ouvir e por ser para mim um exemplo de amor pela pesquisa.

Aos amigos da Liga Acadêmica de Genética Médica da UFMA, pelos trabalhos desenvolvidos e pela troca de experiências durante os três últimos anos.

Ao Programa de Educação Tutorial (PET) do curso de Biologia da UFMA, pela experiência indescritível de participar desse grupo. Agradeço a tutora egressa, Profa. Dra. Gisele Garcia Azevedo, e aos meus antigos companheiros de PET, Thalita Moura, Emilly Moraes, Mairla Colins, Igor Vinícius, Marco Antonio, Elias Júnior, Thayrine Sardinha, José de Ribamar, Rafael Brandão, Mariana Bonfim, Luciana Lima, André Marques, Liana Trovão, Clarisse Figueiredo, José Willian, Juniele Paulina, Lays Silva, Marlla Arouche, Gabriela Almeida, Greyck Santos, Léo Cruz, Glacyane Moares, Tainá Pinto e Ana Carolina Butarelli,

Aos meus familiares, pelo apoio e por todas as orações para que eu pudesse sempre vencer todos os desafios da vida. Agradeço em especial a minha tia, Tercília Rodrigues, por ter me acolhido como filho em diversos momentos de minha vida, as minhas primas Marília Araújo e Alessandra Costa, por serem irmãs para mim, e as minhas avós Leolete Araújo e Dimaria Teixeira, por todo o amor e carinho.

A minha amiga e irmã, Thalita Moura Silva Rocha, por ter me permitido fazer morada em sua vida e por estar comigo em todos os momentos que vivi durante a graduação, sejam eles bons ou ruins. Agradeço por nossa amizade ter extrapolado as paredes da universidade e se enraizado em todas as áreas de nossas vidas. Por sempre me estimular a não desistir nos momentos de fraqueza, e por se mostrar sempre disponível a me ajudar. Sua amizade é extremamente preciosa para mim.

Aos meus amigos Carlos Monteiro (Vanish) e Vinícius Carvalho, por compartilharem momentos únicos comigo e sempre se disponibilizarem a me ajudar nas mais diversas situações.

As minhas amigas Emilly Caroline e Mairla Colins, pela amizade e por fazerem parte dessa história de lutas. Com certeza em diversos momentos carregar o peso exigido em nosso cotidiano foi mais fácil com a ajuda de vocês. Espero que nossa amizade perdure por anos e anos e que possamos rir e chorar juntos em diversos momentos da vida, seja no âmbito profissional ou pessoal.

A minha amiga e irmã, Nanny Victória, por ser luz na minha vida. Agradeço por todos os momentos em que estive comigo e por ter me mostrado na prática o verdadeiro significado da amizade. Agradeço por sempre me fazer sonhar e por me estimular a correr atrás dos meus sonhos. Seu apoio e motivação foram cruciais para que hoje eu estivesse aqui, concluindo mais uma etapa de minha vida.

A Plínio Bandeira Bastos, pelo amor, cuidado e carinho dados a mim desde o dia em que nos conhecemos. Agradeço também pela paciência comigo durante todas as minhas mudanças de humor repentinas durante o desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus amigos Euzenir e Valquimar, por suas vidas serem para mim um exemplo a ser seguido e por refletirem o amor de Deus na vida daqueles que os rodeiam.

Aos demais amigos pelo carinho e participação em minha vida, seja no âmbito profissional ou pessoal. Agradeço em especial a Ivanilde Santos, Bruno Leite, Juliana Diniz, Julli Karina, Thayza Raquel, Bianca Lucchese, Bárbara Macena, Paula Macena, Lucas Santana, Kevin Toda, Sara Ortiz, Lucas Viana, Thaís Chaves, João Jorge e Adriana Oliveira.

Aos queridos companheiros de todas as manhãs, Dona Ana, Sr. Magno, Cecília, Sr. Ivaldo, Dona Solange e “Tia” Maria, pelos cafés e conversas jogadas fora no Prédio do Departamento de Biologia da UFMA.

A Enfermeira Mayra, do Instituto de Oncologia Aldenora Bello, pelo cuidado aos pacientes desta pesquisa atendidos no hospital e por sempre se mostrar disponível a colaborar para a execução desse projeto.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento desse trabalho e na minha jornada até aqui.

A Universidade Federal do Maranhão, por me proporcionar o tripé ensino-pesquisa-extensão durante minha formação em Ciências Biológicas.

Ao Instituto de Oncologia Aldenora Bello e ao Hospital Universitário Presidente Dutra, por terem contribuído com a realização da pesquisa com os pacientes dos hospitais.

Ao CNPQ e FAPEMA, pelo apoio financeiro concedido para realização dos ensaios aqui descritos.

“E apesar de tudo, o Senhor estava sempre ao meu lado, segurando firme a minha mão”.

(Salmos 73:23)

RESUMO

O câncer de pênis (CaPe) é considerado uma neoplasia rara em países desenvolvidos. No entanto, possui alta incidência em países em desenvolvimento, como os da África, Ásia e América do Sul. Dentre estes, o Brasil possui um dos maiores índices registrados da doença, sendo o estado do Maranhão um dos que apresenta maior incidência da doença.

Alguns fatores de risco têm sido relacionados com o desenvolvimento de CaPe, tais como idade, fimose, má higiene, tabagismo, etilismo, condições de inflamação crônica, infecção pelo papilomavírus-humano (HPV) e número de parceiros sexuais. No entanto, ainda são escassos os trabalhos sobre a biologia do tumor, sobretudo no que diz respeito a sua base genética. Diante da importância das alterações genéticas no estabelecimento e progressão tumoral, neste trabalho foi feita uma análise genômica global de tumores penianos de pacientes do estado do Maranhão. Além disso, foi investigada a presença de HPV e identificados os subtipos virais presentes nos tumores. Para isso, foram coletadas amostras de tecido tumoral fresco de 20 pacientes, cujos dados clínicos, histopatológicos e o perfil sócio-econômico foram disponibilizados. As amostras tumorais foram submetidas a extração de DNA pelo método de fenol/clorofórmio. A detecção e genotipagem de HPV foi feita por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) tipo nested para 40 subtipos virais. O perfil genômico dos tumores foi analisado pela técnica de array-CGH (*Comparative Genomic Hybridization*) utilizando a plataforma *SurePrint G3 Human CGH Microarray Cancer 4x44K* (Agilent Technologies Inc, Ca). A análise dos resultados foi feita no software *Cytogenomics v.4.0* (Agilent Technologies Inc, CA). Os parâmetros clínicos e histopatológicos foram avaliados em relação aos dados genéticos pelo teste exato de Fisher e Teste T de Student. Nossos dados revelaram que 73,7% dos tumores apresentavam o genoma viral. Foram detectados os subtipos virais de baixo risco oncogênico (6, 30, 44 e 74) e alto risco (16, 18, 30, 35, 58, 59, 66 e 73), sendo que 57% dos tumores apresentaram o subtipo 16. A análise genômica global revelou 50 regiões genômicas com alterações no número de cópias presentes em pelo menos 40% dos tumores. Prevaleram ganhos em 1p, 1q, 3q, 7p, 7q, 8q, 9p, 10q, 11q, 14q, 15q, 16p, 18p, 20q, 22q e perdas em 1q, 4q, 8p, 10q, 15q e Yp. Em 100% das amostras foi detectada alteração em 14q32.33, com aumento de cópias dos genes *KIAA0125*, *ADAM6*, *LIC00226*, *LINC00211*, *MIR7641-2*. Quando correlacionadas com parâmetros clínico-histopatológicos e infecção pelo HPV, 13 regiões cromossômicas alteradas associaram-se a variáveis como invasão perineural, estadiamento tumoral, grau histológico, tumor primário, tamanho do tumor e infecção pelo HPV ($p < 0.05$). Essas alterações envolviam ganhos em 1q, 2p, 3q, 7p, 7q, 15q, 16p, 18p e 20q e perdas em 10q, destacando-se genes como *RGS7*, *REG1A*, *NRXN1*, *GNAI1*, *HERC2*, *UBE3A*, *EPB41L3* e *EDN3*. O perfil genômico detectado nesse estudo sugere o envolvimento de alterações em diversos genes na carcinogênese peniana, sendo necessária validação desses marcadores por análises gênica e funcional específicas que determinem quais dessas alterações participam efetivamente da tumorigênese peniana, a fim de que potenciais alvos moleculares possam ser utilizados, futuramente, como ferramenta diagnóstica, prognóstica e terapêutica no câncer peniano.

Palavras-chave: câncer de pênis, alteração no número e cópias, HPV.

ABSTRACT

Penile cancer is considered a rare neoplasm in developed countries. However, its incidence is high in developing ones, as in Africa, Asia and South America. Brazil has one of the highest index registered of the disease, with Maranhão being the highest of the

states. Some risk factors have been related to the development of penile cancer (PeCa), such as age, phimosis, inadequate hygiene, smoking, alcohol consumption, chronic inflammation, human papillomavirus (HPV) infection, and number of sexual partners. Notwithstanding, research regarding the biology of PeCa is rare, specially its genetics base. Considering the importance of mutations in the tumour establishment and progression, this research performed a global genomic analysis of penile tumours in patients in the state of Maranhão. Furthermore, the presence of HPV was investigated and viral subtypes identified. Fresh tumour samples were collected from 20 patients, whose clinic histopathological and socioeconomic profile data were available. DNA extraction from tumour samples were performed using phenol/chloroform method. HPV detection and genotyping was carried out through nested PCR (*Polymerase Chain Reaction*) for the 40 viral subtypes. Tumour genomic profile was analyzed through array-CGH technique (*Comparative Genomic Hybridization*) using *SurePrint G3 Human CGH Microarray Cancer 4x44K* platform (*Agilent Technologies Inc, Ca*). Result analyzes were carried out using *Cytogenomics v.4.0* software (*Agilent Technologies Inc, CA*). Clinical and histopathological parameters were evaluated by Fisher's exact test. Thereby, our data showed that 73.7% of the tumors presented the viral genome. Viral subtypes of low oncogenic risk (6, 30, 44 and 74) and high risk (16, 18, 30, 35, 58, 59, 66 and 73) were detected with 57% of tumors presenting the subtype16. Genomic analyzes revealed 50 genomic regions with copy number alterations in at least 40% of the tumours. Most of the alterations are regarding gains in 1p, 1q, 3q, 7p, 7q, 8q, 9p, 10q, 11q, 14q, 15q, 16p, 18p, 20q, 22q and losses in 1q, 4q, 8p, 10q, 15q and Yp. In 100% of the samples was detected alteration in 14q32.33, with increased copy number of *KIAA0125*, *ADAM6*, *LIC00226*, *LINC00211*, *MIR7641-2* genes. Correlating clinical-histopathological parameters and HPV infection, 13 modified chromosomal regions were associated to variables such as perineural invasion, tumour staging, histological grade, primary tumour, tumour size and HPV infection ($p < 0.05$). These alterations represent gains in 1q, 2p, 3q, 7p, 7q, 15q, 16p, 18p and 20q and losses in 10q, highlighting genes as *RGS7*, *REG1A*, *NRXN1*, *GNAI1*, *HERC2*, *UBE3A*, *EPB41L3* and *EDN3*. The genomic profile detected in this research indicates that alterations in several genes are involved in penile carcinogenesis, being necessary to validate these markers by specific genetic and functional analyzes to identify which of these play a role in penile tumorigenesis. Thereby, potential molecular targets could be used in the future as diagnostic, prognostic and therapeutic tools in penile cancer.

Key-words: Penile cancer, Copy number alteration, HPV.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|-------------------|---|----|
| Figura 1. | Representação esquemática do epitélio estratificado ilustrando o ciclo de vida do HPV | 29 |
| Figura 2. | Esquema ilustrativo demonstrando a heterogeneidade das células tumorais de acordo com a progressão do tumor..... | 32 |
| Figura 3. | Prevalência de HPV nos tumores penianos avaliados (n=19) | 43 |
| Figura 4. | Prevalência de infecções pelo subtipo 16 nos tumores penianos avaliados... | 43 |
| Figura 5. | Imagem representando o intervalo 1q43 com alterações no número de cópias em 60% das amostras. Em vermelho a delimitação indicando a região de interesse com ganhos genômicos..... | 50 |
| Figura 6. | Imagem representando o intervalo 2p12 com alterações no número de cópias em 85% das amostras. Em vermelho a delimitação indicando a região de interesse com ganhos genômicos..... | 50 |
| Figura 7. | Imagem representando o intervalo 2p12-p11.2 com alterações no número de cópias em 70% das amostras. Em vermelho a delimitação indicando a região de interesse com ganhos genômicos..... | 51 |
| Figura 8. | Imagem representando o intervalo 2p16.3 com alterações no número de cópias em 55% das amostras. Em vermelho a delimitação indicando a região de interesse com ganhos genômicos..... | 51 |
| Figura 9. | Imagem representando o intervalo 3q23 com alterações no número de cópias em 40% das amostras. Em vermelho a delimitação indicando a região de interesse com ganhos genômicos..... | 51 |
| Figura 10. | Imagem representando o intervalo 7p13 com alterações no número de cópias em 40% das amostras. Em vermelho a delimitação indicando a região de interesse com ganhos genômicos..... | 51 |
| Figura 11. | Imagem representando o intervalo 7p15 com alterações no número de cópias em 45% das amostras. Em vermelho a delimitação indicando a região de interesse com ganhos genômicos..... | 52 |
| Figura 12. | Imagem representando o intervalo 7q21.11 com alterações no número de cópias em 60% das amostras. Em vermelho a delimitação indicando a região de interesse com ganhos genômicos..... | 52 |

| | |
|---|----|
| Figura 13. Imagem representando o intervalo 10q11.22 com alterações no número de cópias em 75% das amostras. Em vermelho a delimitação indicando a região de interesse com perdas genômicas..... | 52 |
| Figura 14. Imagem representando o intervalo 15q11.1-q13.1 com alterações no número de cópias em 60% das amostras. Em vermelho a delimitação indicando a região de interesse com ganhos genômicos..... | 52 |
| Figura 15. Imagem representando o intervalo 16p11.2-p11.1 com alterações no número de cópias em 40% das amostras. Em vermelho a delimitação indicando a região de interesse com ganhos genômicos..... | 53 |
| Figura 16. Imagem representando o intervalo 18p11.31-p21 com alterações no número de cópias em 40% das amostras. Em vermelho a delimitação indicando a região de interesse com ganhos genômicos..... | 53 |
| Figura 17. Imagem representando o intervalo 20q13.32-q13.3 com alterações no número de cópias em 40% das amostras. Em vermelho a delimitação indicando a região de interesse com ganhos genômicos..... | 53 |
| Figura 18. Imagem representando o intervalo 14q32.33 com alterações no número de cópias em 100% das amostras. Em vermelho a delimitação indicando a região de interesse com ganhos genômicos..... | 54 |
| Figura 19. Imagem representando os genes <i>KIAA0125</i> , <i>ADAM6</i> , <i>LIC00226</i> , <i>LINC00211</i> , <i>MIR7641-2</i> com ganhos no número de cópias em 100% das amostras. Em vermelho a delimitação indicando os genes com ganhos genômicos | 54 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------------|---|----|
| Tabela 1. | Sistema TNM para câncer de pênis de acordo com a <i>AJCC</i> e <i>IUAC</i> | 24 |
| Tabela 2. | Classificação de Jackson para o estadiamento do câncer de pênis..... | 25 |
| Tabela 3. | Classificação de risco oncogênico dos subtipos de HPV..... | 27 |
| Tabela 4. | Características clínicas-histopatológicas das 20 amostras avaliadas no presente estudo..... | 42 |
| Tabela 5. | Associação entre a infecção pelo HPV e os parâmetros clínicos-histopatológicos dos pacientes analisados (n=19)..... | 44 |
| Tabela 6. | Média de CNAs de acordo com subtipo histológico, estadiamento, grau histológico e tamanho tumoral..... | 46 |
| Tabela 7. | Características clínicas-histopatológicas associadas com as alterações detectadas em $\geq 40\%$ dos casos e que foram estatisticamente significativas..... | 49 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | | |
|-------------------|--|----|
| Gráfico 1. | Percentual de alterações detectadas de acordo com o tipo de alteração..... | 45 |
| Gráfico 2. | Percentual de amostras apresentando alterações no número de cópias de acordo com o cromossomo..... | 47 |
| Gráfico 3. | Total de alterações no número de cópias detectadas em cada cromossomo..... | 47 |
| Gráfico 4. | Número de alterações encontradas em $\geq 40\%$ dos casos por cromossomo..... | 48 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------|---|
| AcNa | Acetato de Sódio |
| AJCC | American Joint Committee on Cancer |
| ° C | Graus Celsius |
| CaPe | Câncer de pênis |
| CEC | Carcinoma de células escamosas |
| CGH | Hibridação Genômica Comparativa |
| CHR | Cromossomo |
| CNA | Copy Number Alteration |
| DSTs | Doenças sexualmente transmissíveis |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| EDTA | Etileno diamino tetra acetato |
| FISH | Hibridação in situ fluorescente |
| HCl | Ácido clorídrico |
| HPV | Papilomavírus-humano |
| IARC | International Agency for Research on Cancer |
| InCr | Inflamação crônica |
| IUAC | International Union Against Cancer |
| mL | Mililitro |
| mM | Milimolar |
| NaCl | Cloreto de sódio |
| ORF | Open Reading Frames |
| pb | Pares de bases |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| qPCR | Real time PCR |
| ROS | Reactive oxygen species |
| SDS | Dodecil sulfato de Sódio |
| Seg | Segundos |
| SLD | Sobrevida livre da doença |

| | |
|---------------|-------------------------------|
| TRIS | Tri-hifroxi-metil-aminometano |
| μL | Microlitros |
| URR | Upstream regulatory region |
| USA | United States of American |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 20 |
| 1.1 Epidemiologia do Câncer de Pênis..... | 20 |
| 1.2 Etiologia do Câncer de Pênis | 21 |
| 1.3 Aspectos Clínicos do Câncer de Pênis | 22 |
| 1.4 HPV e Câncer..... | 27 |
| 1.5 Alterações genéticas em Câncer de Pênis | 31 |
| 2 OBJETIVOS | 34 |
| 2.1 Objetivo Geral | 35 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 35 |
| 3 METODOLOGIA | 35 |
| 3.1 Pacientes..... | 36 |
| 3.2 Critérios de Inclusão..... | 36 |
| 3.3 Critérios de não inclusão | 36 |
| 3.4 Amostras..... | 36 |
| 3.5 Tamanho Amostral | 37 |
| 3.6 Extração de DNA | 37 |
| 3.7 Genotipagem do HPV | 38 |
| 3.7.1 PCR Multiplex..... | 38 |
| 3.7.2. PCR Nested Multiplex | 38 |
| 3.7.3. Eletroforese Capilar..... | 39 |
| 3.8 Hibridação Genômica Comparativa (aCGH) | 39 |
| 3.9 Análise Estatística | 40 |
| 4 RESULTADOS | 40 |
| 4.1 Perfil clínico-histopatológico | 41 |
| 4.2 Genotipagem do HPV | 41 |
| 4.3 Análise quantitativa de alterações globais no número de cópias | 45 |
| 4.4 Análise qualitativa de alterações globais no número de cópias | 48 |
| 5. DISCUSSÃO | 54 |
| 6. CONCLUSÃO | 65 |
| REFERÊNCIAS | 66 |
| APÊNDICES | 80 |
| ANEXOS | 93 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do Câncer de Pênis

O Câncer de Pênis (CaPe) é uma neoplasia rara em países desenvolvidos, como os da América do Norte e Europa ocidental, no entanto, possui alta incidência em países em desenvolvimento, como os da África, Ásia e América do Sul (BLEEKER et al., 2009; CHRISTOULIDOU et al., 2015). Nos Estados Unidos, segundo a Sociedade Americana de Câncer, menos de 1 a cada 100.000 homens são afetados pela doença, com estimativas para 2017 de 2.120 novos casos e 360 mortes por CaPe. Em contraste, na África do Sul, a doença é responsável por mais de 10% das neoplasias que afetam os homens (SILVA et al., 2011; OLESEN et al., 2014).

Dentre os países da América do Sul, o Brasil possui um dos maiores índices registrados de CaPe. Nos últimos dez anos, a incidência de CaPe se manteve entre 2,9 a 6,8 afetados por 100.000 homens, de acordo com a região avaliada, correspondendo a 2,1% de todos os cânceres que afetam os homens no país (CURADO et al., 2007; FAVORITO et al., 2008; POW-SANG et al., 2010; INCA, 2017). Os casos de CaPe no Brasil são mais comumente relatados nas regiões Norte e Nordeste, que juntas somam 53,2% dos casos registrados no país (FAVORITO et al., 2008; REIS et al., 2010; SBU, 2011; PAIVA et al., 2015).

O CaPe pode ser considerado um problema de saúde pública, à medida que a disparidade na incidência da doença entre países em desenvolvimento e desenvolvidos evidencia sua associação com fatores socioeconômicos (COSTA et al., 2013; TORBRAND et al., 2016). No Brasil, as variações regionais são ainda mais evidentes, nas quais casos de CaPe correspondem a 5,7% dos cânceres em homens nas regiões Norte e Nordeste e apenas 1,2% na região Sul (FAVORITO et al., 2008).

No *ranking* realizado pela Sociedade Brasileira de Urologia em 2007, o estado de São Paulo liderou a incidência no país, com 24,26% dos casos, seguido do estado do Ceará (12,87%) e Maranhão (10,66%). Um ano depois, no levantamento epidemiológico nacional feito por Favorito e colaboradores (2008), grande parte dos casos foram reportados dos estados de São Paulo e Maranhão. A posição do estado de São Paulo nesses estudos pode ser justificada pelo grande número de cirurgias feitas com pacientes oriundos de outros estados, além de ser a região mais populosa do país (IBGE, 2016).

No Maranhão, a carência de estudos epidemiológicos mascara a real incidência local da doença. Além disso, existem poucos serviços de referência, impossibilitando a triagem efetiva desses pacientes, que em sua maioria são oriundos do interior do estado. Em um levantamento feito em um hospital da capital do estado (São Luís), entre 2004 e 2014 foram diagnosticados 286 novos casos (dados não publicados) evidenciando a alta incidência desse tipo de tumor no estado.

1.2 Etiologia do Câncer de Pênis

A etiologia do CaPe ainda não é totalmente compreendida, havendo poucos trabalhos sobre a doença em comparação a outros tipos de câncer (ROMERO et al., 2013). Alguns fatores de risco têm sido relacionados com o desenvolvimento de CaPe, tais como idade, fimose, má higiene, tabagismo, etilismo, condições de inflamação crônica, infecção pelo papilomavírus-humano (HPV) e número de parceiros sexuais (CARVALHO et al., 2007; SENKOMAGO et al., 2016; RODNEY, 2016). Adicionado a estes fatores, o CaPe parece afetar mais frequentemente homens em condições socioeconômicas e educacionais desfavoráveis (POW-SANG et al., 2010; CHAUX et al., 2011).

A maioria dos homens acometidos com CaPe possuem faixa etária entre 50 e 70 anos. (FONSECA et al., 2010). Em estudos realizados no Brasil, as médias observadas foram de 58 anos no estado do Rio de Janeiro, 60 anos no Maranhão e 68 anos no estado do Pernambuco (COUTO et al., 2014; DE SOUSA et al., 2015). O risco para o desenvolvimento de CaPe parece aumentar de acordo com a idade, porém, indivíduos mais jovens também possuem risco de desenvolver a doença (KOIFMAN et al., 2011; MORRISON, 2014). No Brasil, cerca de 7% dos pacientes possuem idade inferior a 35 anos (FAVORITO et al., 2008; KOIFMAN et al., 2011).

A associação da fimose com o desenvolvimento do CaPe tem sido reportada em diversos trabalhos (KRIEGER et al., 2017). Trata-se de uma condição anatômica do pênis que impossibilita a retração do prepúcio, sendo bastante frequente entre os recém-nascidos (HUANG et al., 2017). É comum que cerca de 90% dos prepúcios estejam completamente retrateis até os 3 anos de idade, e quando não há a realização de cirurgia corretiva (circuncisão), apenas uma pequena parcela persiste com esta condição (SILVA et al., 2006; MORRIS et al., 2016). O acúmulo de esmegma (bioprodruto de ação bacteriana nas células epiteliais), é intensificado na presença de fimose e pode levar a criação de um

ambiente ideal para proliferação de microorganismos (PAULA et al., 2005). Além disso, episódios de inflamações como o líquen escleroso e balanites podem surgir em decorrência de irritações no epitélio, que na presença da fimose tornam-se crônicos (SONPAVDE et al., 2013; HA-NA et al., 2013).

O tabagismo é um fator de risco importante no desenvolvimento de diversos tumores (INCA 2017). Em CaPe, inúmeros trabalhos já relataram maior incidência em homens fumantes quando comparados aos não fumantes (DALING et al. 2005; KOIFMAN et al., 2011; COUTO et al., 2014). A presença de substâncias como a nicotina no cigarro induz a carcinogênese não somente em seus sítios de contato direto, mas em outras partes do corpo via corrente sanguínea, inclusive atuando na ativação fatores pró-inflamatórios (HUANG et al., 2011).

Sabe-se que a presença de infecção por HPV é um fator de risco relacionado ao desenvolvimento de diversas neoplasias e lesões pré-malignas (HAUSEN, 1999; HAUSSEN, 2000; BOCCARDO & VILLA, 2004; DOOBAR et al., 2012; GAO & SMITH, 2016). O vírus é mais comumente associado ao desenvolvimento de câncer do colo do útero, mas também pode contribuir na carcinogênese de vulva, vagina, ânus, orofaringe, boca e pênis (INCA, 2017). Em CaPe, essa relação é evidenciada à medida que se encontra cada vez mais positividade para o vírus nesse tipo de tumor. (STANKIEWICZ et al., 2009; DE SOUSA et al., 2015; AFONSO et al., 2017). O potencial carcinogênico do HPV é majoritariamente atribuído à ação das proteínas virais E6 e E7 (THOMAS et al., 1999; MITTAL & BANKS 2017). A interação dessas proteínas com diversos componentes da célula hospedeira pode levar a desregulação do ciclo celular e início do processo de tumorigênese (ZUR-HAUSEN et al., 2000; PASTREZ et al., 2017).

1.3 Aspectos Clínicos do Câncer de Pênis

Os tipos histológicos mais comuns em CaPe são o carcinoma *in situ*, que possui padrão de células epiteliais não invasivas, e o carcinoma de células escamosas (CEC), este último responsável por 95% dos casos de CaPe (SANCHEZ et al., 2015). O carcinoma *in situ* quando restrito a glândula, prepúcio ou haste do pênis recebe o nome de Eritroplasia de *Queyrat*, e quando há envolvimento da pele da haste do pênis, escroto e períneo é chamado de doença de *Bowen* (BEGLIOMONI, 2000).

Do ponto de vista histológico, o CaPe assemelhasse a carcinomas epidermóides de outras partes do corpo, com perda de diferenciação das células da camada basal em direção a apical e geralmente com característica de células bem ou moderadamente diferenciadas (POMPEO & GIL, 2005; GUIMARÃES et al., 2009). Na maioria dos casos, os CaPe iniciam-se com uma lesão na região da glândula (34,8%) (KOIFMAN et al., 2011) que, quando não tratada, pode acometer o prepúcio e evoluir com infiltrações para os tecidos adjacentes, como os corpos cavernosos, esponjosos e tecido subepitelial conjuntivo (POMPEO et al., 2006).

Diversos subtipos histológicos, com padrões de crescimento e agressividade variáveis tem sido descritos para CaPe, além de tumores que podem apresentar características de mais de um subtipo (mistos). O subtipo histológico mais prevalente é o usual (45-65%), seguido dos subtipos papilífero (5-15%), basalóide (4-10%), condilomatoso (7-10%), verrucoso (3-8%), entre outros (HANKENBER et al., 2014).

Geralmente a avaliação de risco do subtipo usual depende da localização e grau de estadiamento. Os tumores papilíferos na maioria dos casos possuem superfície irregular de caráter papilar ou verruciforme (exofítico), com bom prognóstico e rara ocorrência de metástase (CHAUX & CUBILLA, 2012). Os tumores basalóides geralmente possuem lesões sólidas ulcerativas de padrão inespecífico, com invasão vascular e perineural, metástase linfonodal precoce e prognóstico desfavorável (CUBILLA et al., 2000). Tumores condilomatosos possuem aparência verruciforme e costumam estar associados a presença de HPV (hipergranulose e coilocitose), com bom prognóstico e rara ocorrência de metástase linfonodal (CHAUX et al., 2010). Por outro lado, o carcinoma verrucoso é considerado raro, microscopicamente possui aspecto papilomatoso e altamente diferenciado (JHONSON et al., 1995). Em CaPe, tumores verrucosos costumam ser negativos para HPV, praticamente não há ocorrência de metástase linfonodal e o prognóstico é favorável (LI, 2015).

Os sistemas de classificação utilizados em CaPe são o TNM (Tabela 1) e de estadiamento de Jackson (Tabela 2). O sistema TNM, proposto pela *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* e *International Union Against Cancer (IUAC)* é o mais utilizado e leva em consideração a extensão do tumor (T), o comprometimento de linfonodos regionais (N) e a presença de metástase a distância (M). As informações do tumor primário, linfonodos acometidos e metástase podem ser agrupadas para avaliação do estadiamento (HEYNS et al., 2010; PIZZOCARO et al., 2010).

Tabela 1. Sistema TNM para câncer de pênis de acordo com a AJCC e IUAC.

| | |
|-------------|---|
| (T) | Tumor primário |
| Tx | Tumor primário não pode ser avaliado |
| T0 | Não há evidência de tumor primário |
| Tis | Carcinoma <i>in situ</i> |
| Ta | Carcinoma verrucoso não invasivo, não associado com invasão destrutiva. |
| T1 | Tumor invade tecido conectivo subepitelial T1a. sem invasão linfovascular e bem ou moderadamente diferenciado (T1G1-2) T1b. com invasão linfovascular ou pobremente diferenciado/ indiferenciado (T1G3-4) |
| T2 | Tumor invade corpo esponjoso/corpo cavernoso |
| T3 | Tumor invade a uretra |
| T4 | Tumor invade outras estruturas adjacentes |
| (N) | Linfonodos regionais |
| NX | Linfonodos regionais não podem ser avaliados |
| N0 | Linfonodos inguinais não palpáveis ou sem aumento visível |
| N1 | Linfonodo inguinal unilateral palpável e móvel |
| N2 | Linfonodos inguinais bilaterais ou múltiplos palpáveis e móveis |
| N3 | Massa nodal inguinal fixa ou linfadenopatia pélvica, unilateral ou bilateral |
| (M) | Metástase à distância |
| M0 | Sem evidências de metástase a distância |
| M1 | Metástase à distância |
| | Estadiamento |
| 0 | Tis ou Ta, N0, M0 |
| I | T1a, N0, M0 |
| II | T1b, N0, M0 ou T2, N0, M0 ou T3, N0, M0. |
| IIIa | T1 a T3, N1, M0 |
| IIIb | T1 a T3, N2, M0 |
| IV | T4, qualquer N, M0 ou Qualquer T, N3, M0 ou Qualquer T, qualquer N, M1 |

Tabela 2. Classificação de Jackson para o estadiamento do câncer de pênis

| | |
|--------------------|---|
| Estágio I | Encontra-se circunscrito à glândula e ao prepúcio, sem envolvimento do corpo do pênis. |
| Estágio II | Apresenta invasão do corpo cavernoso do pênis, mas sem disseminação para os linfonodos, |
| Estágio III | Apresenta disseminação clínica dos linfonodos regionais da virilha. A possibilidade de cura depende do número e da extensão dos nodos envolvidos. |
| Estágio IV | É de natureza invasiva, apresentando extenso envolvimento dos linfonodos, sem possibilidade. |

Fonte: Jackson (1966)

Para determinação do padrão histológico de diferenciação é utilizada a graduação de Broders (1941), que varia do grau I (bem diferenciado) ao grau IV (totalmente indiferenciado).

Segundo a Sociedade Americana de Câncer, os principais sinais clínicos que levariam a suspeita de CaPe são alterações na cor e espessura da pele, bem como a presença de nódulos, ferida e úlceras persistentes com ou sem sangramento. Protuberâncias avermelhadas e aveludadas também podem estar presentes, além de secreção persistente, com odor incômodo e feridas indolores. No entanto, é importante salientar que, grande parte desses sintomas também pode ocorrer em decorrência de outras condições que não CaPe.

O diagnóstico de CaPe é geralmente feito pelo exame físico do pênis e análise dos linfonodos, além da realização de biópsia excisional (PIZZOCARO et al., 2010). O diagnóstico histológico e o estadiamento do tumor primário são peças-chaves na escolha da conduta terapêutica, que leva em consideração as características da lesão primária e da região inguinal (PIZZOCARO et al., 2010; NAM et al. 2017). De forma complementar, procedimentos como tomografia computadorizada e/ou ultrassonografia podem ser utilizados para aprimorar a avaliação (MOSCONI et al. 2005).

Os métodos terapêuticos mais utilizados são excisão simples e penectomias parciais ou totais para remoção do tumor primário (ESCANDE et al., 2017; NAM et al., 2017). A braquiterapia e a radioterapia também podem ser adotadas, no entanto, nesta última os

CaPe costumam apresentar resistênica e os casos com boa resposta inicial tem níveis significativos de recidiva local (POMPEO et al., 2010).

Em casos de comprometimento linfonodal, é necessária a realização de linfadenectomia unilateral ou bilateral (LOPES et al., 1996). A linfadenectomia é muitas das vezes adotada como medida profilática, apesar de em 30 a 86% dos casos estar associada à alta morbidade e condições adversas (GUIMARÃES et al., 2011; O'BRIEN et al., 2017). Essa prática é justificada pela possibilidade de linfonodos palpáveis indicarem presença de micrometástase. No entanto, cerca de 20% dos casos clinicamente linfonodos negativos, possuem presença de metástases ocultas, enquanto que em 50% daqueles com linfonodos palpáveis, não possuem histologia positiva para neoplasia quando operados (DE PAULA et al., 2005; CHIPOLLINI et al., 2017).

Em um trabalho realizado por Couto e colaboradores (2014), cerca 31,9% dos casos de CaPe possuíam metástase linfonodal uni ou bilateral. O comprometimento linfonodal configura-se como um importante fator prognóstico em CaPe. Isso devido à sobrevida livre da doença (SLD) ser geralmente de cinco anos em 80,34% dos casos com linfonodos negativos (SHAH et al., 2016; MONTIEL-JARQUÍN et al., 2017). Essa percentagem cai de acordo com o número de linfonodos afetados (40-70% em N1; 33-50% em N2 e 20-35% em N3) (NOVARA et al., 2007), havendo uma correlação negativa entre comprometimento linfonodal (inguinal ou pélvico) e sobrevida livre da doença.

No Brasil, de acordo com o Hospital A.C Carmargo, cerca de 90% dos pacientes procuram atendimento médico somente em estágios mais avançados, e geralmente já possuem comprometimento de linfonodos regionais. O diagnóstico tardio é geralmente atribuído ao receio em procurar diagnóstico médico assim que se iniciam os sintomas (SOUZA & MARQUES, 2015), que são comumente confundidos com sintomas de doenças sexualmente transmissíveis (DSTs). O atraso no diagnóstico limita a conduta terapêutica e a realização de penectomias torna-se o “padrão ouro” no tratamento da doença, gerando consequências físicas e psicológicas danosas aos pacientes (DE LIMA JR., 2016).

1.4 HPV e Câncer

HPV vem sendo associado a diversos processos neoplásicos além de um largo espectro de lesões muco-cutâneas tais como verrugas na pele, genitália, papilomas e o próprio câncer (BOCCARDO & VILLA, 2004; DOOBAR et al., 2012; BANSAL et al., 2016; GAO & SMITH, 2016; INCA, 2017). O HPV pertence à família *Papillomaviridae*, sendo um vírus não envelopado, com DNA fita dupla e circular de aproximadamente 6.800 a 8.400 pb (NEVES et al., 2002). O HPV infecta naturalmente mucosas e tecidos cutâneos, sendo classificados como vírus cutaneotrópicos e mucosotrópicos. O genoma do HPV é constituído basicamente por oito regiões ORF (*open reading frames*), possuindo seis genes que se expressam mais precocemente (E, do inglês *Early*) e dois que são expressos tardiamente, (L, do inglês *Late*), além de uma região regulatório URR (*Upstream regulatory region*) (SOUTO et al., 2005).

Atualmente são descritos mais de 200 subtipos de HPV, dos quais 40 são capazes de infectar o trato ano-genital (BOUVARD et al., 2009; INCA, 2017). De acordo com as características clínicas e filogenéticas é possível classifica-los em dois grandes grupos (Tabela 3), HPV de alto risco (AR-HPV) e HPV de baixo risco (BR-HPV) (SILVA, 2003). Estimasse que cerca de 50 a 75% de homens e mulheres sexualmente ativos possam entrar em contato com o vírus em algum momento de sua vida, porém, apenas 5% desenvolverão infecções persistentes. Em um trabalho realizado por Silva et al. (2017), a prevalência de HPV em homens brasileiros, é de 72,3%, enquanto que nos Estados Unidos essa prevalência foi de 61,3% e no México de 61,9%. Logo, apesar de sua capacidade de induzir anormalidades celulares, principalmente o grupo AR-HPV, a infecção por HPV é uma DST bastante comum em humanos (GININDZA et al., 2017).

Tabela 3. Classificação de risco oncogênico dos subtipos de HPV.

| Risco Oncogênico | Subtipo viral |
|-------------------------|---|
| Baixo risco | 6, 11, 30, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72 e 81 |
| | 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 66, |
| Alto risco | 56, 58, 59, 68 73 e 82, |

Fonte: IARC (2007).

A infecção depende principalmente de fatores como, permissividade celular, subtipo viral e condição imunológica do hospedeiro (BLEEKER et al., 2009; DOOBAR et al., 2012). Estudos sugerem a idade e tabagismo como fatores de risco para infecções

persistentes (ROSITCH et al., 2013). É observado que, em mulheres com menos de 30 anos as infecções regridem, ao ponto que acima dessa idade a persistência da infecção é mais frequente (INCA 2017).

Alguns mecanismos moleculares estão envolvidos no processo de carcinogênese pelo HPV, incluindo genes virais chaves no processo de desregulação celular e multiplicação viral (CAMUS et al., 2007). Após a infecção na região mais basal do epitélio estratificado (Figura 1), o genoma do HPV se estabiliza na célula hospedeira em forma de elementos extracromossômicos (epissomas) ou integrado ao DNA nuclear, levando ao aumento no número de cópias virais para aproximadamente 50-100 por célula (SOUTO et al., 2005).

As proteínas virais atuam de diferentes maneiras na célula hospedeira. Geralmente, o potencial carcinogênico do HPV é atribuído à ação das oncoproteínas E5, E6 e E7, que atuam desregulando a homeostase celular levando a proliferação e transformação das células (ZUR et al., 2000). Essas oncoproteínas podem interagir com proteínas celulares, miRNAs, mRNA, fatores de transcrição, além de outras moléculas celulares. A proteína E6 parece desempenhar papel regulatório sobre a proteína p53 (proteína supressora tumoral) do hospedeiro, enquanto que E7 atua sobre as proteínas da família pRb (regulam o ciclo celular) o que leva a ativação constitutiva de fatores de transcrição que direcionam a célula à progressão de G0/S (CAMUS et al., 2007; KHATTAK et al., 2017).

As proteínas E6 e E7 são expressas preferencialmente na camada basal e supra basal do epitélio, permitindo que o genoma viral seja replicado nas células que estão em constante divisão (PYEON et al., 2009). Nas células mais superficiais são expressos os genes L1 e L2, que codificam proteínas do capsídeo viral, levando a formação de novos vírus (FLORIN et al., 2002). A integração do genoma viral em células do epitélio do cólon do útero parece ser um passo crucial para evolução de neoplasias intraepiteliais para tumores invasivos (PETER et al., 2006). Acredita-se também que as proteínas E6 e E7 cooperem na perturbação dos mecanismos de duplicação e segregação cromossômica durante a mitose, induzindo instabilidade genômica (LIU et al., 2015). Durante a integração ao genoma da célula hospedeira, a região E2 (regulação negativa de E6 e E7) sofre ruptura, levando a uma maior expressão de E6 e E7, levando a um maior descontrole celular e vantagens de crescimento aos tumores (AKAGI et al., 2017).

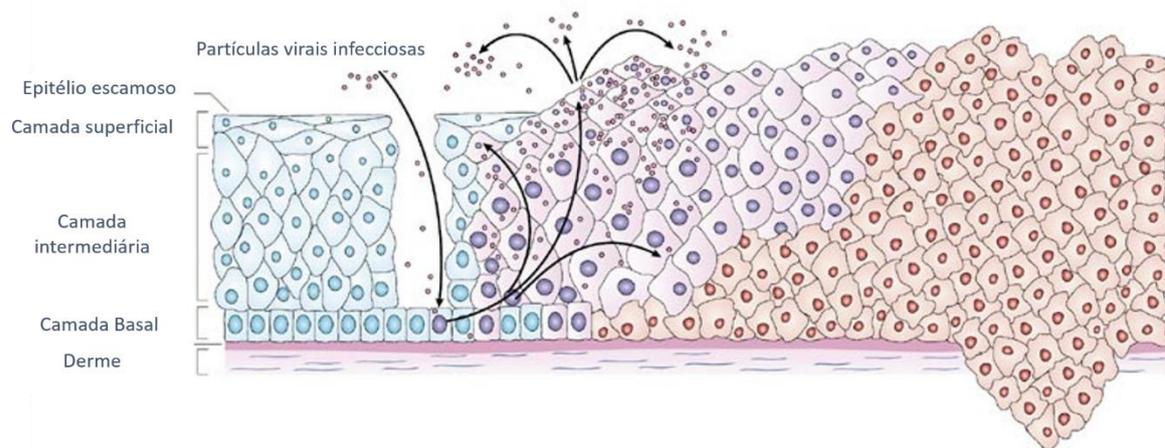


Figura 1. Representação esquemática do epitélio estratificado ilustrando o ciclo de vida do HPV. Fonte: adaptado de WOODMAN (2007).

Sabe-se também que a relação entre o HPV e o desenvolvimento de tumores é ainda mais complexa, inclusive com participação de alterações epigenéticas (FEBER et al., 2015). Em CaPe, a relação do HPV com o desenvolvimento dos tumores tem sido cada vez mais evidenciada (AFONSO et al., 2017). De acordo com o método de detecção, cerca de 60% a 90% dos casos de CaPe são positivos para HPV, sendo os subtipos mais comuns o 16, 18, 31 e 33 (LEBELO et al., 2014; ALEMANY et al., 2016). Alguns subtipos histológicos associam-se mais a presença do vírus. Por exemplo, CaPe condilomatosos tendem a ser positivos para o HPV (THAPA et al., 2017), enquanto os basalóides chegam a 66,3% de positividade e os verrucosos parece não estar associado a infecção pelo vírus, com positividade em 22,4% dos casos (KELLY et al., 2016).

A frequência de HPV em CaPe parece estar diretamente relacionada a prevalência local da infecção pelo vírus. Em uma revisão feita por Backes et al. (2009) a prevalência global de HPV em CaPe foi de 47,9%, variando de 39,7% (América do Sul) a 59,3% (Ásia). Na África, a prevalência de HPV em certas regiões pode chegar a 100% (YANG et al., 2015). Corroborando com os achados de incidência de CaPe, onde países da África, Ásia e América do Sul são os com maior prevalência de infecção pelo vírus (BLEEKER et al., 2009; CHRISTOULIDOU et al., 2015).

Há poucos trabalhos brasileiros relatando a associação do HPV e CaPe. Em estudos realizados no Rio de Janeiro, a positividade para HPV variou de 60,7% a 75%, sendo mais frequente o subtipo 16 (SCHEINER et al., 2008; AFONSO et al., 2012). No estado do Maranhão, de De-Sousa e colaboradores. (2015) identificaram uma prevalência de 63,15% de HPV em CaPe, sendo mais frequentes os subtipos 16, 18, 45 e 69. Porém, mais

recentemente em um trabalho de Pereira et al. (2017), a frequência de HPV em CaPe no Maranhão foi de 91,9%, com principais subtipos o 16 e o 18.

A detecção do genoma viral faz-se necessária para elucidação da etiologia dos tumores, bem como por seu valor prognóstico, visto que subtipos virais de alto risco oncogênico são responsáveis por uma maior agressividade dos tumores (INCA 2007). Em câncer orofaríngeal, pacientes com positividade para o vírus tendem a ter um aumento na sobrevivência de até cinco anos em relação aos casos negativos (ANG et al., 2010; KOERBER et al., 2014), sendo a mesma relação já descrita em pacientes com CaPe (FLAHERTY et al., 2014).

Há diversas metodologias aplicadas à detecção do HPV, que podem ou não variar entre si quanto à sensibilidade. A captura híbrida é o método molecular mais comumente utilizado na detecção do vírus, porém limita-se somente aos subtipos de alto risco oncogênico (RODRIGUES et al., 2009). Além dessa, metodologias como a hibridação *in situ*, Southern blot e citometria de fluxo podem ser empregadas na identificação do HPV (KRIEGSMANN et al., 2017; MILLS et al., 2017).

A PCR (*Polymerase Chain Reaction*) é considerada padrão ouro na detecção do vírus, pois se baseia na amplificação de regiões específicas do genoma viral. A técnica consiste na utilização de oligonucleotídeos iniciadores que franqueiam sequências do genoma do vírus conservadas entre os subtipos. Além disso, é possível a utilização de iniciadores específicos para regiões intrínsecas de cada subtipo. Em grande parte dos trabalhos a PCR e suas variantes, qPCR (*real time PCR*) e *nested* PCR, sobrepõem-se aos demais métodos pois possibilita detecção do vírus em condições de carga viral baixa. (DONG et al., 2017)

A presença do vírus também pode ser detectada através de exames citológicos como a colposcopia ou peniscopia, por meio dos quais é possível detectar alterações típicas de HPV como os coilócitos (PRIGGE et al., 2016). Os coilócitos representam células em replicação do genoma viral, caracterizando-se por vacuolização perinuclear clara, núcleo aumentado e binucleações, frequentemente encontrados em lesões intraepiteliais e tumores do cólon do útero (SILVA et al., 2015).

Os tumores relacionados com HPV têm uma biologia distinta e, muitas vezes, mostram respostas melhores ao tratamento, o que torna a identificação de HPV crítica quanto à eficácia do tratamento (FLAHERTY et al., 2014). Entretanto, a detecção do

genoma do HPV não é suficiente para evidenciar seu envolvimento no desenvolvimento de tumores, visto que a infecção pelo vírus pode também estar presente em células não neoplásicas. Estudos recentes demonstram a eficácia da análise imunohistoquímica da proteína p16 (geralmente superexpressa em casos HPV positivos) como ferramenta para constatação da ação do vírus, além da análise expressão gênica das oncoproteínas virais E6 e E7 (ROMAGOSA et al., 2011; PANNONE et al., 2012).

1.5 Alterações genéticas em Câncer de Pênis

O desenvolvimento de tumores está intrinsecamente relacionado a perturbações genéticas ocasionadas seja por fatores físicos, químicos ou biológicos. Esse desequilíbrio torna-se mais acentuado à medida que essas alterações afetam componentes cruciais para manutenção da homeostase celular (SNUSTAD & SIMMONS, 2013). A dificuldade no estabelecimento de regimes de tratamentos com base nas alterações genéticas de tumores dá-se principalmente devido a heterogeneidade das células neoplásicas (Figura 2). Diante do acúmulo de mutações e das disfunções nos mecanismos normais de divisão, as células tumorais podem apresentar constituição genética e perfis de crescimento variáveis (BRENNAN et al., 2015).

Em CaPe, há poucos trabalhos disponíveis sobre possíveis marcadores genéticos desse tipo de neoplasia quando comparado a outros tipos de câncer. Os trabalhos limitam-se a alterações em genes específicos já relatados em processos tumorigênicos de outros órgãos. Em uma compilação de dados realizada por PROTZEL & SPIESS (2013), alterações envolvendo oncogenes, genes supressores tumorais, proteínas pró-apoptóticas, receptores e fatores de crescimento, proteínas envolvidas no processo inflamatório, dentre outros já foram descritos.

Geralmente o desenvolvimento do CaPe é associado a presença ou ausência de infecção pelo HPV (principais alterações induzidas pelo HPV já descritas no item 1.3). Na via independente do vírus, a inflamação crônica (InCr) desempenha um papel central na tumorigênese (HA-NA et al., 2013). A presença de fimose, balanite e líquen escleroso comumente leva ao quadro de InCr, que conhecidamente causa perturbações as células do epitélio (SONPAVDE et al., 2013).

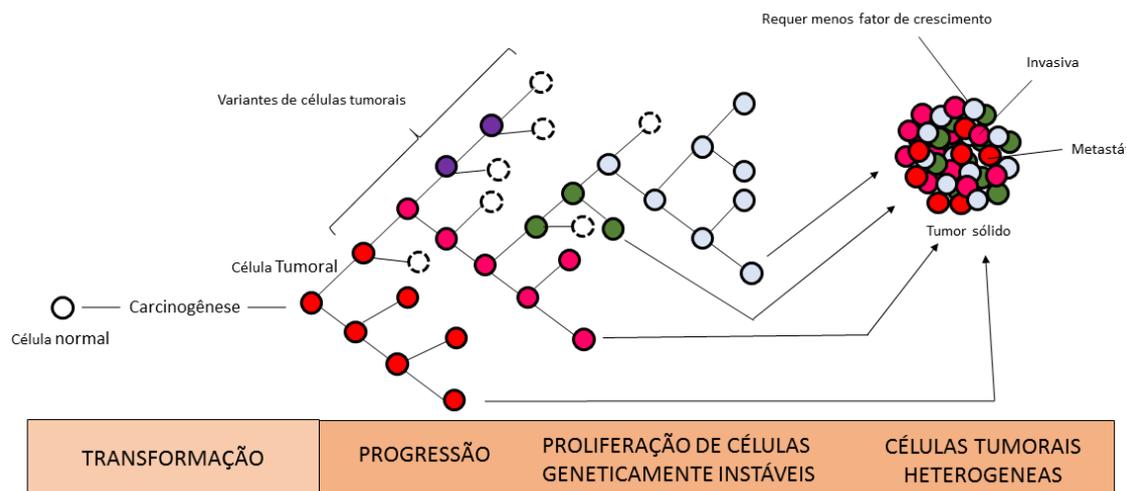


Figura 2. Esquema ilustrativo demonstrando a heterogeneidade das células tumorais de acordo com a progressão do tumor. Fonte: adaptado de PRASAD (2012).

O estresse causado pela InCr leva a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem interagir com o material genético e causar danos (JENA, 2012). Nesse cenário, genes supressores tumorais como *CDKN2A* (codificante da p16) reagem ao dano induzido por ROS e levam a parada do ciclo celular para reparo dos danos ou ativam processos de apoptose caso os danos não possam ser reparados (NA & SURH, 2013). Em CaPe, perda de heteroziguidade do gene *CDKN2A* já foi relatada, o que contribui para desregulação da célula e progressão dos tumores (POETSCH et al., 2011; MCDANIEL et al., 2015).

Mediadores inflamatórios, como a ciclooxigenase-2 (COX-2) e a prostaglandina E2 (PGE2) já foram relacionados com o desenvolvimento de CaPe via InCr (LEE et al., 2013), geralmente havendo superexpressão desses dois mediadores inflamatórios (DRAGAN et al., 2004; CARLSON et al., 2013; PEREIRA et al., 2017).

Alterações em *C-MYC* também já foram descritas em CaPe (SAMIR et al., 2011; MASFERRER et al., 2012). O gene *MYC* é um importante proto-oncogene localizado no cromossomo 8 (q24) e codificante de um fator de transcrição importante na regulação da proliferação celular (DANG, 2012). Em câncer cervical, 8q24 constitui um importante sítio de integração do genoma viral, o que pode levar à amplificação genômica da região, mas com superexpressão de *C-MYC* independente de alterações no número de cópias

(COUTURIER et al., 1991; PETER et al., 2006; ZANG et al., 2016). Masferrer et al. (2012) observaram uma correlação positiva entre o número de cópias de *MYC* e a evolução do tumor independentemente da infecção pelo HPV. No entanto, somente em tumores sem HPV foi possível notar associação entre número de cópias e superexpressão de *C-MYC*.

Alterações em receptores de fatores de crescimento celular são comumente relatados em vários tipos de câncer (NORMANNO et al., 2006). Disfunções em genes como *EGFR* e *ERBB2* estão geralmente associadas a um prognóstico desfavorável, mas com melhor resposta ao tratamento por inibidores de tirosina-quinase (AMANCIO et al., 2017). Os receptores de fatores de crescimento epidermal são ativados por ligantes específicos que ativam cascatas de transdução de sinal, regulando a expressão de genes cruciais envolvidos na sobrevivência, proliferação, migração e diferenciação celular (ZHOU et al., 2006). Chaux e colaboradores (2013) demonstraram superexpressão de *EGFR* em 88% dos casos analisados por imunohistoquímica, enquanto PEREIRA et al. (2017) observou o mesmo por RT-qPCR, com superexpressão em 87% dos casos analisados.

Há poucos trabalhos utilizando métodos de triagem em larga escala para CaPe. ALVES et al., 2001, utilizando a técnica de hibridação genômica comparativa (aCGH) demonstrou aumento no número de cópias em CaPe, com ganhos genômicos em 8q24, 16p11–12, 20q11–13, 22q, 19q13 e 5p15 e perdas em 13q21-22, 4q21-32 e cromossomo X. Entretanto, não foi possível estabelecer correlação entre o grau tumoral e as alterações cromossômicas encontradas. Mais recentemente, Busso-Lopes et al. (2015) utilizando a mesma metodologia em CaPe descreveu alterações envolvendo ganho no número de cópias em 3q, 5p, 8q, 9p, 9q, 20p e 21p e perdas em 3p, 8p, 9p, 21p e Y, sendo as alterações mais marcantes encontradas nos cromossomos 3, 8 e Y. As alterações nos cromossomos 3 e 8 foram associadas a características de pior prognóstico e sobrevida diminuída.

A técnica de array-CGH é uma técnica de citogenética molecular capaz de mapear o genoma através de sondas específicas e atuar na identificação de alterações no número de cópias (CNAs). Por sua amplitude de análise, os arrays permitem identificar deleções, microdeleções e ampliações gênicas que podem não ser observadas em outras metodologias. (PRATTE-SANTOS, 2016). A técnica vem sendo aplicada com sucesso na caracterização de anormalidades congênitas (KALLIONIEMI et al., 1993; VELTMAN et al., 2002) e na classificação molecular de tumores como o câncer de mama (WESSELS et al., 2002 REIS-FILHO et al., 2005; CLIMENT et al., 2007).

A avaliação dos achados de aCGH por outras técnicas moleculares específicas é um importante passo na validação dos dados. A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) é comumente utilizada na detecção de perdas genômicas observadas por array-CGH. Além do FISH, a PCR quantitativa em tempo real (qPCR) para estudos de variação no número de cópias de alvos pré-definidos, bem como a metodologia de RT-qPCR para estabelecimento da relação entre os CNAs e expressão gênica dos mesmos.

Diante da escassez de trabalhos, a etiologia molecular de CaPe é ainda pouco compreendida. No Brasil, o CaPe continua sendo um problema de saúde pública, não havendo a correta triagem desses pacientes e seguimento restrito a poucos centros de referência no país. Consequentemente, o diagnóstico desta neoplasia é geralmente realizado tardiamente e o tratamento cirúrgico torna-se imprescindível nesses casos. As cirurgias possuem caráter mutilante que geram consequências físicas e psicológicas gravíssimas aos pacientes, sem qualquer tipo de acompanhamento pós-operatório por profissionais da terapia ocupacional e psicologia.

A busca por biomarcadores que tenham valor diagnóstico, prognóstico e terapêutico torna-se imprescindível diante da alta incidência de câncer de pênis no Brasil sobretudo no estado do Maranhão. Pesquisas com esse tipo de câncer são escassas quando comparados a outros tipos de tumores, principalmente no que diz respeito a compreensão dos mecanismos genéticos envolvidos na carcinogênese peniana. Análises genômicas desses pacientes tornam-se assim cruciais para entendimento da biologia desses tumores.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Identificar alterações genômicas em carcinomas penianos no estado do Maranhão.

2.2 Objetivos Específicos

- Descrever o perfil clínico-histopatológico dos pacientes com carcinoma peniano;
- Identificar alterações genômicas no número de cópias em tumores penianos;
- Relacionar as alterações genômicas com parâmetros clínico-histopatológicos (estadiamento, grau e tamanho do tumor);
- Identificar a presença do papilomavírus humano (HPV) e genotipar os subtipos virais;
- Relacionar a presença de HPV com as alterações genômicas encontradas.

3 METODOLOGIA

3.1 Pacientes

As amostras deste trabalho são provenientes de pacientes com diagnóstico clínico-anatomopatológico de câncer de pênis que foram submetidos a procedimento cirúrgico no Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Belo (n=17) e Hospital Universitário Presidente Dutra (n=3), localizados em São Luís, Maranhão. O material utilizado faz parte do projeto “ANÁLISE DE ALTERAÇÕES GENÔMICAS E NA EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA EM CÂNCER PENIANO” aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa com Seres Humanos através da Plataforma Brasil, sob o processo (CAAE) nº 46371515.5.0000.5097 e parecer nº 1.308.275 (Anexo 1). Os pacientes convidados a participar da pesquisa assinando o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos seguindo as normas da resolução CNS nº 466/2012 (Apêndice A).

3.2 Critérios de Inclusão

Foram coletadas amostras de pacientes maiores de 18 anos atendidos no Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Belo e no Hospital Universitário Presidente Dutra, em São Luís, Maranhão, com diagnóstico clínico e anatomopatológico de câncer de pênis. Somente participaram da pesquisa os pacientes que realizaram procedimento cirúrgico como forma de tratamento e que não tenham feito uso de tratamento químico ou radioterápico antes da cirurgia.

3.3 Critérios de não inclusão

Pacientes que não se enquadraram nos critérios de inclusão acima descritos e/ou não concordaram assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Também não foram incluídos os pacientes que já tiveram iniciado tratamento quimioterápico ou radioterápico.

3.4 Amostras

Durante o procedimento cirúrgico, foi coletado um fragmento tumoral que foi lavado com soro fisiológico para minimizar contaminação com células sanguíneas. Os fragmentos de tecido tumoral foram embebidos em TLN - Tampão de Lise Nuclear (TrisHCl 10mM, EDTA 2mM, NaCl 400mM pH=8,0) e encaminhados ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Maranhão, em São Luís-MA,

onde foram codificados e armazenados a - 20°C até serem processados para obtenção de material genético (DNA) descrito no item 3.6.

3.5 Tamanho Amostral

Para execução desse trabalho estiveram disponíveis 56 amostras de DNA tumorais obtidas a partir de tecido fresco de áreas não necróticas. As 20 amostras que mais se adequaram aos critérios de qualidade (concentração e ausência de impurezas) foram selecionadas para realização dos ensaios de alteração no número de cópias (item 3.8) e genotipagem para o HPV (item 3.7) de

3.6 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada em amostras frescas de tumores peniano. Os tecidos foram descongelados e picotados em uma placa de Petri estéril utilizando bisturis estéreis individuais para cada tecido. Em seguida, o tecido picotado foi ressuspensionado com 500 µL de TLN (NaCl 400mM; TRIS HCl 25mM pH=8,0; EDTA 50mM pH=8,0) e transferido para microtubos de 1,5 mL. Logo após foi adicionado 40 µL de SDS 10% (Dodecil sulfato de Sódio) e colocado em banho-maria à 37° C por 30 minutos. O material foi resfriado a temperatura ambiente por aproximadamente 10 minutos e logo em seguida adicionado 40 µL de proteinase K 20 mg/mL (PK). Posteriormente foi levado ao banho-maria à 55° C por 12 horas (overnight). No dia seguinte, se o material não estivesse bem digerido, era adicionado mais 20 µL de PK e a amostra voltava ao banho-maria por 1 hora. Decorrido esse tempo, foi retirado do banho-maria e acrescentado 20 µL de RNase, homogeneizando e deixado novamente no banho-maria por 30 minutos. Posteriormente, foram adicionados 600µL de solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1). Em seguida o material foi homogeneizado lentamente por cerca de 10 vezes. Logo depois, foi centrifugado a 14000 RPM à 4° C por 15 minutos. Após isto, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, onde foram adicionados 500 µL de clorofórmio/álcool isoamílico, homogeneizando novamente o material invertendo-se o microtubo por cerca de 10 vezes. Os tubos foram centrifugados nas mesmas condições anteriores e em seguida o sobrenadante foi removido e transferido para um outro tubo onde foram adicionados 200 µL de Acetato de sódio (AcNa 3M, pH 4,8) e o volume completado com isopropanol gelado. As amostras foram armazenadas em freezer -20° C por 12 horas. Passado o período, o material foi centrifugado à 12000 RPM à 4° C por 15 minutos,

descartando-se o sobrenadante e invertendo o tubo totalmente e lentamente para não perder o *pellet*. Foi adicionado 500 µL de etanol 70% gelado para ressuspender o *pellet*. Os tubos foram novamente à 12000 RPM à 4° C por 15 minutos. Em seguida, foi descartado o etanol 70% e o material foi deixado a temperatura ambiente para secagem. Após isso, o *pellet* foi então diluído em 50 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM). A leitura da concentração de DNA foi realizada por espectrofotômetro e somente foram consideradas para as análises moleculares as amostras que apresentarem razão A260nm/A280nm com valor entre 1,8 e 2,0 e concentração ≥ 50 ng/ul. Após análise de qualidade do material, as amostras foram armazenadas em freezer a - 20°C.

3.7 Genotipagem do HPV

3.7.1 PCR Multiplex

Para a primeira rodada de amplificação, utilizou-se a reação de PCR, um conjunto de primers consenso MY09 (Manos et al., 1985) e nove novos iniciadores degenerados (cinco MY09A-D e cinco MY11-1-5). Foram designados como uma versão modificada do sistema de iniciadores MY09/11 original (Manos et al., 1985) para cobrir todas as sequências de genótipos de 40 HPV. O gene constitutivo da β -globina (BG) foi utilizado como controle de reação positiva interna.

Cada mistura de PCR foi realizada num volume final de 30 µL, contendo 200 ng / µl de DNA genômico, KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), MgCl₂ 1,5 mM, uma concentração final 200 µM de desoxirribonucleotídeos (dNTP), 1,5 U de Taq DNA Polymerase (*Phonetreria*), 7,5 a 22,5 pmol de cada iniciador (MY09 e MY11) e 2 pmol de cada primers BGS1 e BGA2. A reação foi incubada durante 40 ciclos a 94 ° C 1 min, 50 ° C 1 min, 72 ° C 2 min e um ciclo de extensão final a 72 ° C 5 min.

3.7.2. PCR Nested Multiplex

Na segunda reação, 40 iniciadores específicos marcados com fluoróforos foram dispostos numa PCR multiplex para 40 subtipos virais, incluindo genótipos de baixo e alto risco. Oncogênico. Foi utilizado o par de primers BGA2 e BGS3 para o gene constitutivo da β -globina. As sequências de iniciadores dos 40 subtipos não estão disponíveis por questões de patente.

Na segunda amplificação de PCRm o volume final foi 15 µL, KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), MgCl₂ 1,5 mM, potenciador (1X), 200 µM de dNTPs, 1,0 U de Taq

DNA Polymerase (Taq Platinum, Invitrogen), 0,5 pmol de cada iniciador específico de cada subtipo viral e 0,2 pmol de iniciadores de controle (BGA2 e BGS3). Foram utilizados dois microlitros dos produtos de PCR MY11/09 como alvos de amplificação. A reação foi incubada por 36 ciclos a 95 ° C 2 min, 56 ° C 1 min, 72 ° C 40 segundos e um ciclo de extensão final a 72 ° C 5 min.

3.7.3. Eletroforese Capilar

O produto amplificado da Nested PCR foi diluído 200X e 1 µL submetido à eletroforese capilar (*MegaBace 1000, Amersham Pharmacia Biotech, EUA*), utilizando o peso molecular padrão ETROx550 (GE Healthcare) para análises das amostras. Para a análise dos eletroferogramas, foi construído um novo filtro de pico no *software Fragment Profiler* com três sondas marcadas com fluoresceína: FAM (6-carboxifluoresceína), HEX (5'-hexaclorofluoresceína fosforamidata) e TAMRA (6-carboxietrametilrhodamina). Os resultados foram classificados como positivos na presença de amplificação para uma (única infecção) ou mais tipos virais de HPV (infecções múltiplas), gerando tamanhos de fragmentos de 74 a 338 pb, com presença ou ausência de amplificação de controle interno (gene de β-globina - 366 pb). Os resultados negativos foram considerados apenas quando o gene da β-globina foi amplificado.

3.8 Hibridação Genômica Comparativa (aCGH)

Foi utilizada a plataforma *SurePrint G3 Human CGH Microarray Cancer 4x44K* (*Agilent Technologies Inc, Ca*), contendo oligonucleotídeos correspondentes a todo o genoma humano, baseado na *data base* do HG19 (*Human Genome 19*). As amostras foram digeridas a fim de serem obtidos fragmentos de DNA com cerca de 300 a 500 pb, através das enzimas de restrição *AluI I* e *Rsa* (*Promega Corp, WI*). Após a digestão, as amostras foram marcadas com fluoróforos Cianina 3 (Cy3) e Cianina 5 (Cy5), para as amostras tumorais e controle, respectivamente. A marcação dos fragmentos de DNA foi feita pelo uso de *random primers* (oligonucleotídeos iniciadores de sequência aleatória) e pela enzima Klenow, que possui atividade de DNA polimerase I. O processo de marcação com fluoróforos foi iniciado pela adição dos *random primers* e pela enzima *Klenow* e os fluoróforos Cy3 e Cy5.

Após a verificação da incorporação dos fluoróforos, pares de DNA-teste e DNA-controle foram hibridizados na presença de *Cot-1DNA*, *10x Blocking Agent* e *2xHi-RPM Buffer* por 40 horas à 65°C, em rotação de 20 rpm, conforme instruções do fabricante (*Agilent Technologies Inc, CA*). Após a lavagem das lâminas de arrays em câmara especial com controle de ozônio, os arrays foram escaneados utilizando o *Scanner Agilent G2565CA* e os dados serão extraídos pelo programa *Feature Extraction v.10.1.1.1* (*Agilent Technologies Inc, CA*). A análise dos resultados foi feita utilizando o software *Cytogenomics v.4.0* (*Agilent Technologies Inc, CA*), adotando o algoritmo de análise ADM-2 e *threshold > 6*. Amplificações e deleções foram consideradas apenas quando presentes no mínimo em 3 sondas consecutivas, com valores superiores a $\log_2(7/6)$ e $\log_2(5/6)$, respectivamente.

3.9 Análise estatística

A associação entre os parâmetros clínico-histopatológicos, infecção pelo HPV e alterações genômicas encontradas foi feita pelo Teste Exato de Fisher, considerando como significativos valores de $p < 0.05$. Para comparação entre as médias de alterações genômicas encontradas dos parâmetros clínico-histopatológicos avaliados foi utilizado o Teste T de Student, considerando como significativos valores de $p < 0.05$. As análises foram feitas no programa SSPS (*version 17.0*) e os gráficos gerados pelo programa *GraphPrisma* (*version 5.0*).

4 RESULTADOS

4.1 Perfil clínico-histopatológico

Foram avaliados 20 pacientes com diagnóstico clínico-histopatológico de câncer de pênis do tipo carcinoma epidermóide. As características clínicas-histopatológicas dos 20 casos analisados estão descritas na Tabela 4. A idade média dos pacientes foi de $63,5 \pm 15,7$, variando de 32 a 83 anos, em sua maioria lavradores (50%), casados (70%), com nenhuma ou baixa escolaridade (70%). Cerca de 50% dos pacientes eram tabagistas, 55% etilistas e 30% eram tanto tabagistas quanto etilistas.

O subtipo histológico mais frequente foi o usual, presente em 45% das amostras (n=9), seguido pelo condilomatoso, descrito em 35% dos casos analisados (n=7). O subtipo basalóide foi descrito somente associado ao subtipo histológico misto. A região anatômica mais comumente afetada foi a glândula, observada em 50% (n=10) dos casos, houve comprometimento do prepúcio em 10% (n=2) dos pacientes e em 40% tanto da glândula como do prepúcio (n=8). Além disso, a presença de fimose foi observada 75% dos casos (n=15).

Quanto as características do tumor primário, 40% dos casos (n=8) eram do tipo T2. O grau histológico mais prevalente foi o II, presente em 50% (n=10). O tamanho dos tumores variou de $\leq 0,5$ cm a $\geq 5,0$, com cerca de 60% (n=12) tinham um tamanho entre 2,1 e 5,0 cm. As lesões ulceradas foram presentes em 40% dos tumores (n=8). Todos os pacientes foram submetidos ao tratamento cirúrgico, dos quais 80% realizaram penectomia parcial (n=16). Além disso, 20% dos casos apresentavam invasão linfática (n=4) e 15% (n=3) invasão perineural. Todos os pacientes (n=3) que foram submetidos à linfadenectomia apresentaram diagnóstico de metástase linfonodal.

4.2 Genotipagem do HPV

A genotipagem do HPV foi realizada em 19 pacientes, dos quais 73,7% apresentaram positividade para o genoma viral (n=14), como descrito na Figura 3. Entre os 14 casos positivos, 4 apresentaram infecções simples e 10 infecções múltiplas. Os subtipos virais de baixo risco oncogênico detectados foram o 6, 30, 44 e 74.

Tabela 4. Características clínicas-histopatológicas das 20 amostras avaliadas no presente estudo.

| Variável | Nº (%) | Variável | Nº (%) | Variável | Nº (%) | Variável | Nº (%) |
|----------------------------|-----------|-----------------------------|----------|---------------------------------|----------|-----------------------------|----------|
| Tabagismo | | Tumor primário (TNM) | | Grau histológico | | Invasão Perineural | |
| sim | 10 (50%) | T1 | 03 (15%) | I | 04 (20%) | sim | 03 (15%) |
| não | 10 (50%) | T1a | 01 (5%) | II | 10 (50%) | não | 17 (85%) |
| Etilismo | | T1b | 03 (15%) | III | 05 (25%) | Invasão Linfática | |
| sim | 11 (55%) | T2 | 08 (40%) | Nd | 01 (5%) | sim | 04 (20%) |
| não | 08 (40%) | T3 | 04 (20%) | Tamanho do tumor (cm) | | não | 16 (80%) |
| nd | 01 (5%) | Tx | 01 (5%) | ≤ 0,5 | 01 (5%) | Tipo de Cirurgia | |
| Tipo histológico | | Estadiamento | | 0,6 – 2,0 | 04 (20%) | Penectomia parcial | 16 (80%) |
| Carcinoma epidermóide | 20 (100%) | I | 04 (20%) | 2,1 – 5,0 | 12 (60%) | Penectomia total | 03 (15%) |
| Subtipo histológico | | II | 10 (50%) | ≥ 5,0 | 03 (15%) | Postectomia | 01 (5%) |
| CEC Misto* | 04 (20%) | IIIb | 03 (15%) | Características da lesão | | Metástase linfonodal | |
| CEC Condilomatoso | 07 (35%) | IV | 01 (5%) | Ulcerada | 08 (40%) | unilateral | 1 (5%) |
| CEC Usual | 09 (45%) | Nd | 02 (10%) | Vegetante | 02 (10%) | bilateral | 2 (10%) |
| Fimose | | Topografia | | Ulcerovegetante | 06 (30%) | ausente | 17 (85%) |
| sim | 15 (75%) | Glande | 10 (50%) | Verrucosa | 03 (15%) | Linfadenectomia | |
| não | 05 (25%) | Prepúcio | 02 (10%) | Nd | 01 (5%) | sim | 3 (15%) |
| | | Glande e prepúcio | 08 (35%) | | | não | 17 (85%) |

(*): misto usual e basalóide (n=2), misto usual e condilomatoso (n=2); (nd): informação não disponível.

Os subtipos virais de alto risco oncogênico estiveram presentes em 13 (92,8%) dos 14 casos positivos, sendo detectados os subtipos 16, 18, 30, 35, 58, 59, 66 e 73. O subtipo viral mais frequente foi o 16, em 57,1% (n=8) dos casos positivos, presente tanto em infecção simples (n=3) ou múltipla (n=5) (Figura 4).

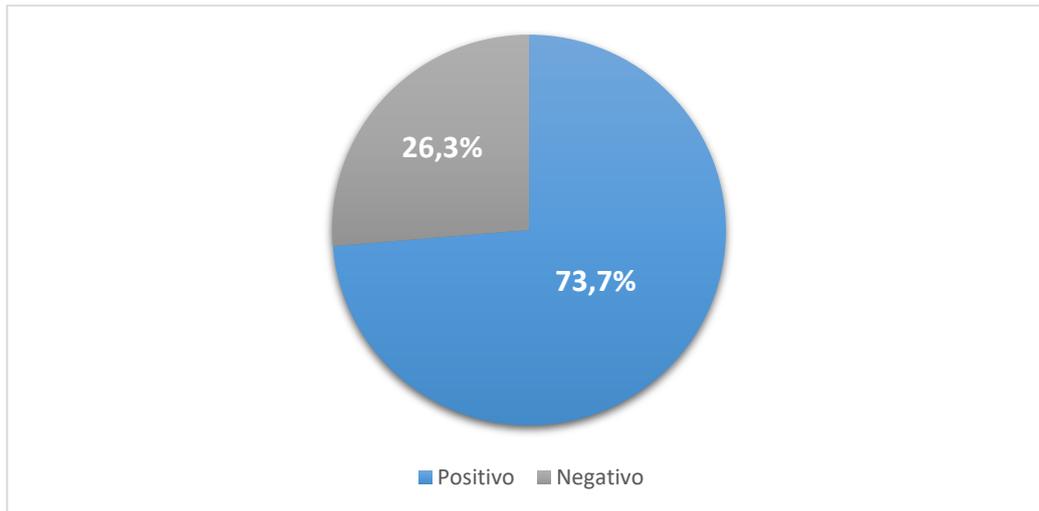


Figura 3. Prevalência de HPV nos tumores penianos avaliados (n=19).

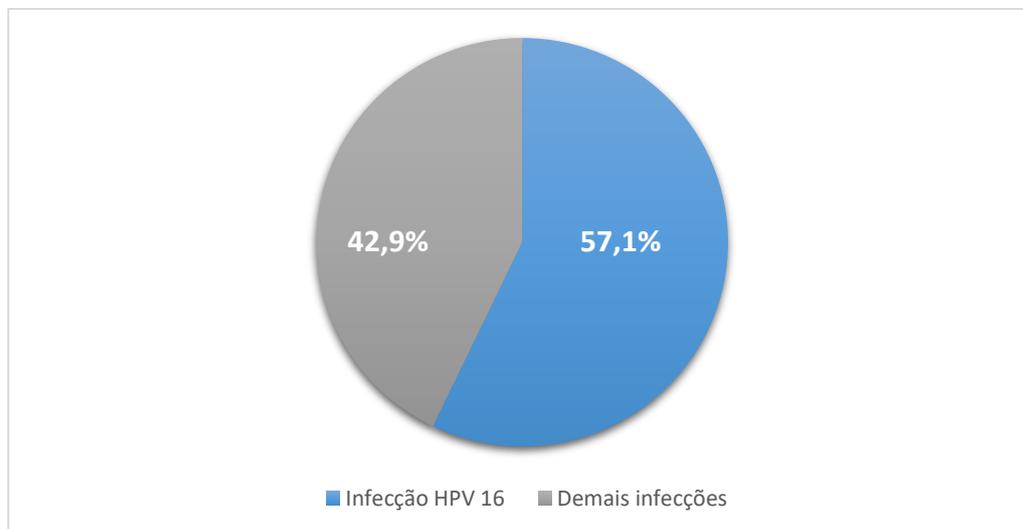


Figura 4. Prevalência de infecções pelo subtipo 16 nos tumores penianos avaliados.

A relação entre infecção por HPV e os parâmetros clínico-histopatológicos estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Associação entre a infecção pelo HPV e os parâmetros clínico-histopatológicos dos pacientes analisados (n=19).

| Variável | HPV | | Total (n=19) n (%) | P valor |
|----------------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------|---------|
| | Ausente (n=5) n (%) | Presente (n=14) n (%) | | |
| Subtipo histológico | | | | P=0.35 |
| CEC Condilomatoso | 1 (20,0) | 5 (35,7) | 6 (31,6) | |
| CEC Usual | 4 (80,0) | 5 (35,7) | 9 (47,3) | |
| CEC Misto | 0 (0) | 4 (28,6) | 4 (21,1) | |
| Grau histológico | | | | P=0.57 |
| I-II | 2 (60,0) | 11 (78,6) | 13 (68,4) | |
| III | 2 (40,0) | 3 (21,4) | 5 (26,3) | |
| Sem informação | | | 1 (5,3) | |
| Estadiamento TNM | | | | P=0.53 |
| I-II | 3 (60,0) | 11 (78,6) | 14 (73,7) | |
| IIIb-IV | 2 (40,0) | 2 (14,2) | 4 (21,1) | |
| Sem informação | | | 1 (5,3) | |
| Tamanho do Tumor | | | | P=1.00 |
| 0,5-5,0 | 5 (100) | 12 (85,7) | 17 (89,5) | |
| 5,1-10 | 0 (0) | 2 (14,3) | 2 (10,5) | |
| Invasão linfática | | | | P=1.00 |
| Sim | 1 (20,0) | 3 (21,4) | 4 (21,1) | |
| Não | 4 (80,0) | 11 (78,6) | 15 (78,9) | |
| Invasão Perineural | | | | P=1.00 |
| Sim | 1 (20,0) | 2 (14,3) | 3 (15,8) | |
| Não | 4 (80,0) | 12 (85,7) | 16 (84,2) | |
| Tumor primário | | | | P=0.52 |
| T1 | 2 (40,0) | 5 (35,7) | 7 (36,8) | |
| T2 | 1 (20,0) | 7 (50%) | 8 (42,1) | |
| T3 | 1 (20,0) | 2 (14,3) | 3 (15,8) | |
| Sem informação | | | 1 (5,3) | |
| Lesão | | | | P=0.354 |
| Ulcerada | 4 (80,0) | 4 (28,6) | 8 (42,1) | |
| Vegetante | 0 (0) | 2 (14,3) | 2 (10,5) | |
| Verrucosa | 0 (0) | 2 (14,3) | 2 (10,5) | |
| Ulceroso-vegetante | 1 (20,0) | 5 (35,7) | 6 (31,6) | |
| Sem informação | | | 1 (5,3) | |

Teste Exato de Fisher ou Qui-quadrado (p<0.05)

A positividade para HPV por subtipo histológico foi de 83,3% para os tumores condilomatosos, 55,5% para tumores usuais e em 100% para mistos. Em relação ao grau histológico, 80% dos tumores grau III foram positivos para HPV. Quando analisada a positividade por estadiamento, dos 14 casos positivos, 11(78,5%) possuíam estadiamento I ou II (78,6%). Cerca 85,7% dos tumores positivos possuíam tamanho entre 0,5 e 5,0 cm e a maioria não apresentavam invasão linfática ou perineural. Em relação ao tumor primário (T), o tipo T2 correspondeu a 50% dos casos positivos para HPV.

4.3 Análise quantitativa de alterações globais no número de cópias

Foram avaliados 20 CECs de pênis, com detecção de 1.085 CNAs e média de $54,2 \pm 31,34$ CNAs/caso. Os tumores apresentaram alterações genômicas que variaram de 21 a 154 por amostra, entre ganhos (uma ou duas cópias adicionais), ampliações (acima de duas cópias adicionais), perdas (uma cópia ausente) e deleções (duas cópias ausentes). Foram detectados entre todas as regiões genômicas 708 ganhos (65%), 318 perdas (29%), 31 deleções (3%) e 28 ampliações (3%), como observado no Gráfico 1. A média geral de ganhos por amostra foi de $35,4 \pm 18$, ampliações $1,4 \pm 0,8$, perdas $15,9 \pm 17,2$ e deleções $1,6 \pm 1,2$ por caso avaliado. O número de CNAs de acordo com o subtipo histológico, estadiamento, grau histológico e tamanho tumoral estão descritos na Tabela 6.

Gráfico 1. Percentual de alterações detectadas de acordo com o tipo de alteração.

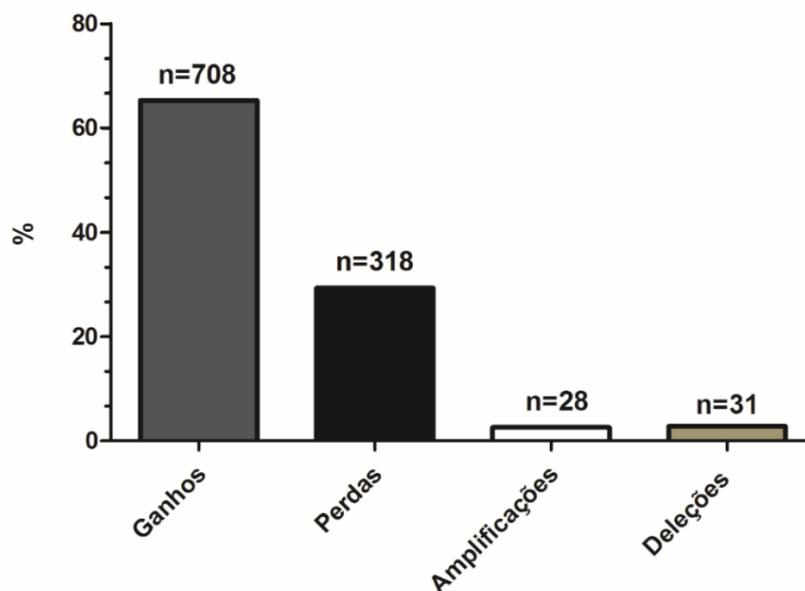


Tabela 6. Média de CNAs de acordo com subtipo histológico, estadiamento, grau histológico e tamanho tumoral.

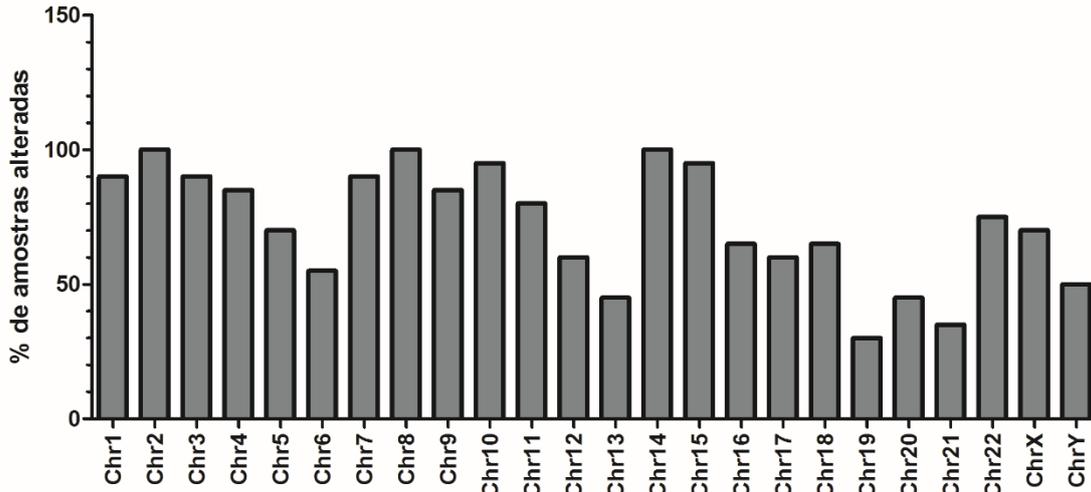
| Variável | Nº CNAs (%) | Média CNAs/caso |
|------------------------------|-------------|-----------------|
| n=1.085 | | |
| Subtipo histológico | | |
| Condilomatoso | 324 (29,9) | 46,3±22,3 |
| Usual | 396 (36,5) | 44±16,5* |
| Misto | 365 (33,6) | 91,25±46,9* |
| Estadiamento | | |
| I | 168 (15,5) | 42±15,7 |
| II | 654 (60,3) | 65,4±40,3 |
| IIIb | 155 (14,2) | 51,7±5,5 |
| IV | 47 (4,3) | 47±0 |
| Sem informação | 61 (5,7) | 30,5±12 |
| Grau histológico | | |
| I | 248 (22,8) | 62±25,9 |
| II | 444 (41) | 44,4±15,0 |
| III | 369 (34) | 73,8±51,4 |
| Sem informação | 24 (2,2) | 24±0 |
| Tamanho do tumor (cm) | | |
| 0.5 – 5,0 | 961 (88,6) | 56,6±32,6 |
| ≥5,0 | 124 (11,4) | 41,3±22,4 |

(*) p<0.05 pelo Teste T de Student

Quando comparados às médias de CNAs quanto ao subtipo histológico, observou-se diferença estatisticamente significativa entre os subtipos histológico usual e misto (P=0.0179).

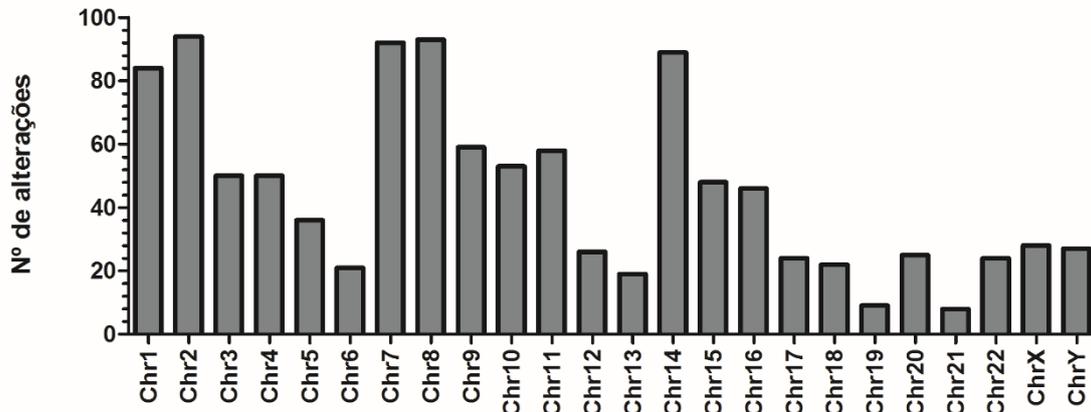
Foram detectadas alterações envolvendo todos os cromossomos do genoma. Alterações nos cromossomos 2, 8 e 14 foram detectadas em todas as amostras, enquanto que, no cromossomo 19, foram detectadas alterações em somente 6 casos (35%), conforme percentual descrito no Gráfico 2

Gráfico 2. Percentual de amostras apresentando alterações no número de cópias de acordo com o cromossomo.



Quando avaliado o número de alterações por cromossomo, os cromossomos 1, 2, 7, 8 e 14 foram os que tiveram o maior número de alterações detectadas. Poucas alterações foram descritas nos cromossomos 19 e 21, como observado no Gráfico 3.

Gráfico 3. Total de alterações no número de cópias detectadas em cada cromossomo.



Foram detectadas alterações do tipo ganho ou perda em todos os cromossomos, enquanto que CNAs do tipo amplificação foram detectados apenas nos cromossomos 2,

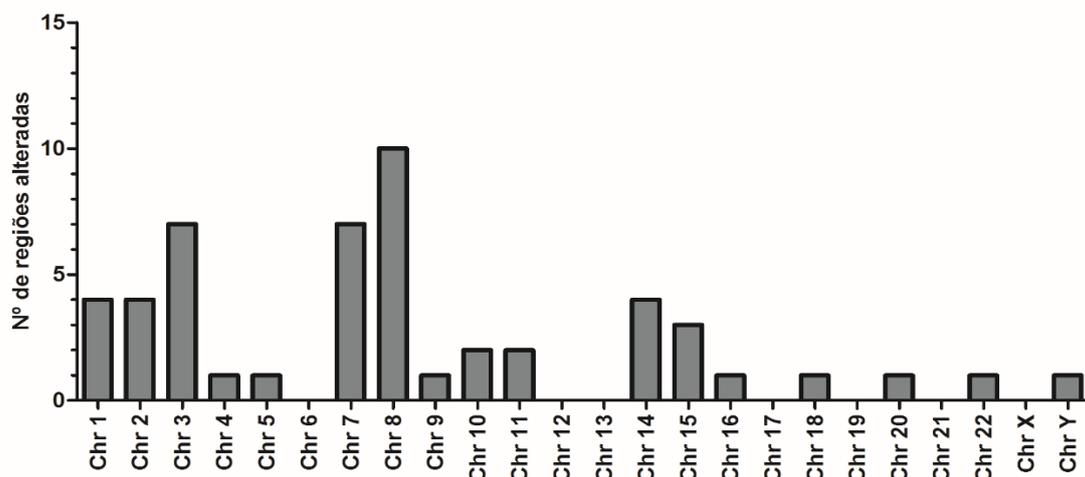
7, 9, 10, 11 e 14, e deleções foram observadas somente nos cromossomos 1, 2, 4, 5, 8, 9, 11, 19 e Y.

4.4 Análise qualitativa de alterações globais no número de cópias

Na análise qualitativa foi feita a distinção dos 1.085 CNAs em nível de banda cromossômica, revelando 239 bandas distintas com variação no número de cópias. Dessas, 220 apresentaram ganhos genômicos (92%), 6 bandas apresentaram ampliações (2,5%), 151 bandas com perdas (63,1%) e em 14 bandas foram observadas deleções (5,8%).

Para análise qualitativa foram selecionadas as alterações presentes em $\geq 40\%$ dos casos (Gráfico 4). Das 239 bandas, 50 apresentaram alteração presentes em $\geq 40\%$ dos tumores. Os cromossomos 6, 12, 13, 17, 19, 21 e X não apresentaram nenhuma banda cromossômica em comum para no mínimo 40% das amostras. Os cromossomos com maior número de bandas alteradas em comum a todas as amostras foram: 3, 7, 8 e 14. De acordo com o tipo de alteração foram descritos, em $\geq 40\%$ dos casos, ganhos em 1p, 1q, 3q, 7p, 7q, 8q, 9p, 10q, 11q, 14q, 15q, 16p, 18p, 20q, 22q e perdas em 1q, 4q, 8p, 10q, 15q e Yp. Os genes detectados de acordo com a região cromossômica estão descritos no Apêndice B.

Gráfico 4. Número de alterações encontradas em $\geq 40\%$ dos casos por cromossomo



A correlação entre as principais alterações e os parâmetros clínico-histopatológicos e infecção pelo HPV revelaram 13 regiões estatisticamente significativas envolvendo ganhos em 1q, 2p, 3q, 7p, 7q, 15q, 16p, 18p e 20q e perdas em 10q (Tabela

7). Cerca de 60% (n=30) das alterações encontradas em $\geq 40\%$ (n=50) dos casos são sítios de integração viral descritos em tumores ou em linhagens celulares. Das 13 regiões significativas, 76,9% são descritas como sítios de integração viral. A representação das regiões com perdas e ganhos genômicos0. estatisticamente significativas estão descritas da Figuras 5 a Figura 17.

Tabela 7. Características clínico-histopatológicas associadas com as alterações detectadas em $\geq 40\%$ dos casos e que foram estatisticamente significativas.

| Localização | Sítio de integração de HPV (subtipo) | Evento | Variável | P valor |
|--------------------|---|---------------|-------------------------|----------------|
| 1q43 | Sim (18) | Ganho | Sem invasão perineural. | P= 0.049 |
| 2p12 | Não | Ganho | Sem invasão perineural. | P= 0.046 |
| 2p12 | Não | Ganho | Estadiamento I e II | P= 0.039 |
| 2p12-p11.2 | Sim (16) | Ganho | Grau I e II | P= 0.014 |
| 2p12-p11.2 | Sim (16) | Ganho | Sem invasão perineural | P= 0.018 |
| 2p16.3 | Sim (18,16) | Ganho | Pacientes sem HPV 16 | P= 0.031 |
| 3q23 | Sim (16) | Ganho | Infecção simples | P= 0.021 |
| 7p13 | Sim (45) | Ganho | Estadiamento I e II | P= 0.011 |
| 7p15 | Sim (82) | Ganho | Estadiamento I e II | P= 0.023 |
| 7q21.11 | Sim (16,35) | Ganho | Tamanho 0,5-5,0 cm | P= 0.049 |
| 10q11.22 | Não | Perda | Tumores T1 e T2 | P= 0.032 |
| 15q11.1-q13.1 | Sim (18) | Ganho | Positividade HPV | P= 0.038 |
| 16p11.2-p11.1 | Sim | Ganho | Tumores T2 | P= 0.047 |
| 18p11.31-p21 | Sim (16) | Ganho | Tumores < 5,0 cm | P= 0.049 |
| 20q13.32-q13.3 | Sim (16) | Ganho | Positividade HPV | P= 0.045 |

Teste Exato de Fisher ($p < 0.05$); Sítios de integração viral de acordo com WENTZENSEN et al., 2004; PETT et al., 2004; AKAGI et al., 2017.

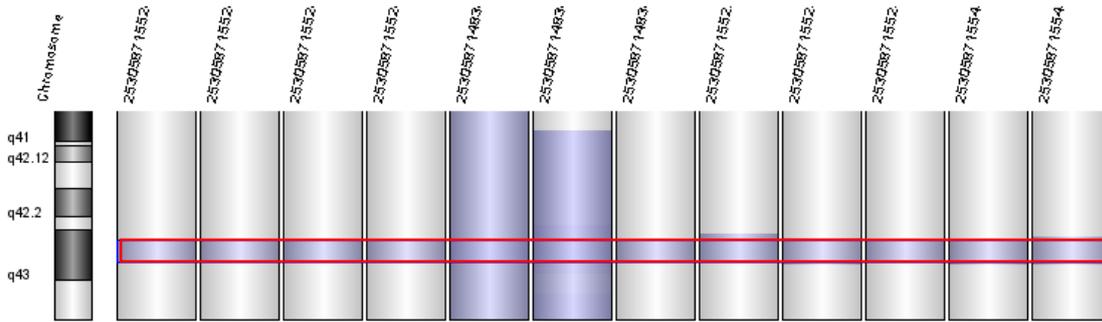


Figura 5. Imagem representando o intervalo 1q43 com alterações no número de cópias em 60% das amostras. Em vermelho a delimitação indicando a região de interesse com ganhos genômicos.

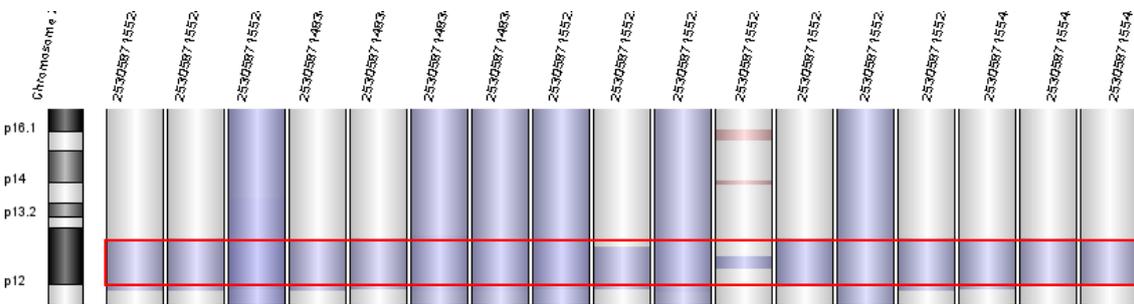


Figura 6. Imagem representando o intervalo 2p12 com alterações no número de cópias em 85% das amostras. Em vermelho a delimitação indicando a região de interesse com ganhos genômicos.

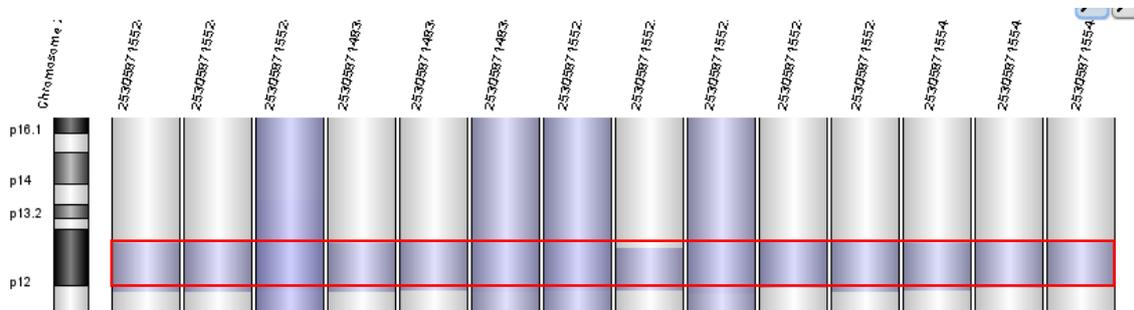


Figura 7. Imagem representando o intervalo 2p12-p11.2 com alterações no número de cópias em 70% das amostras. Em vermelho a delimitação indicando a região de interesse com ganhos genômicos.

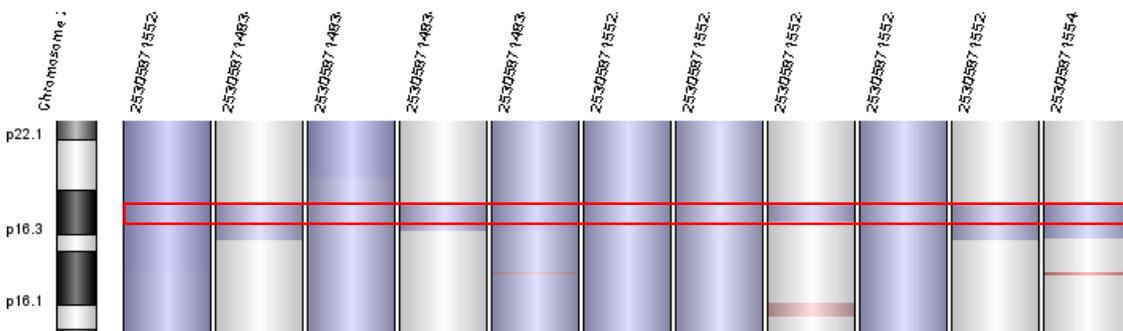


Figura 8. Imagem representando o intervalo 2p16.3 com alterações no número de cópias em 55% das amostras. Em vermelho a delimitação indicando a região de interesse com ganhos genômicos.

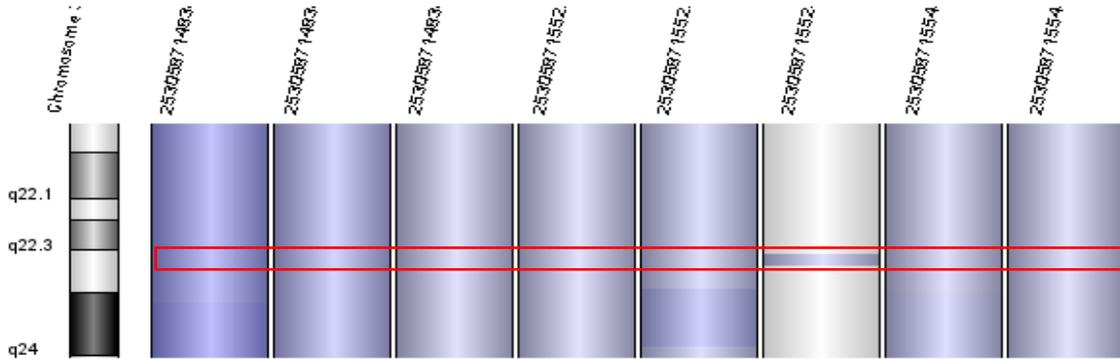


Figura 9. Imagem representando o intervalo 3q23 com alterações no número de cópias em 40% das amostras. Em vermelho a delimitação indicando a região de interesse com ganhos genômicos.

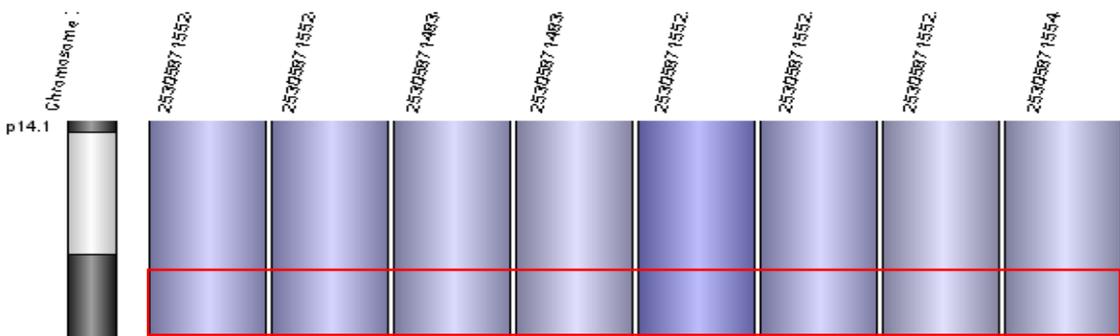


Figura 10. Imagem representando o intervalo 7p13 com alterações no número de cópias em 40% das amostras. Em vermelho a delimitação indicando a região de interesse com ganhos genômicos.

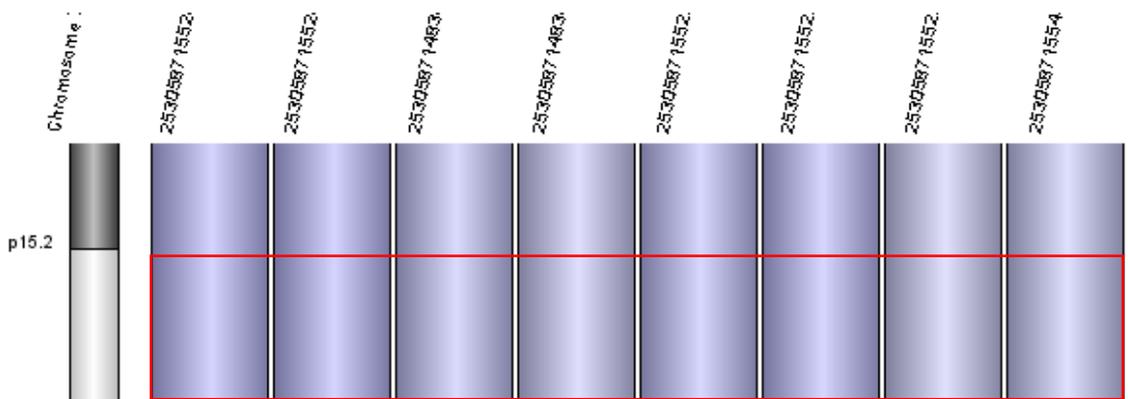


Figura 11. Imagem representando o intervalo 7p15 com alterações no número de cópias em 45% das amostras. Em vermelho a delimitação indicando a região de interesse com ganhos genômicos.

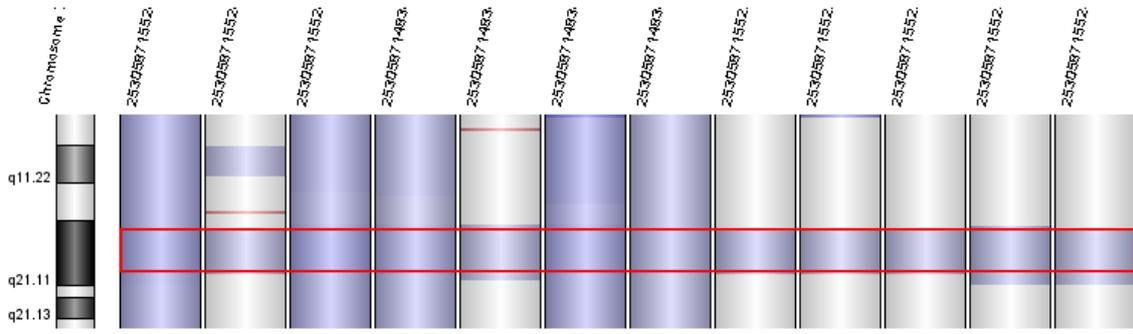


Figura 12. Imagem representando o intervalo 7q21.11 com alterações no número de cópias em 60% das amostras. Em vermelho a delimitação indicando a região de interesse com ganhos genômicos.

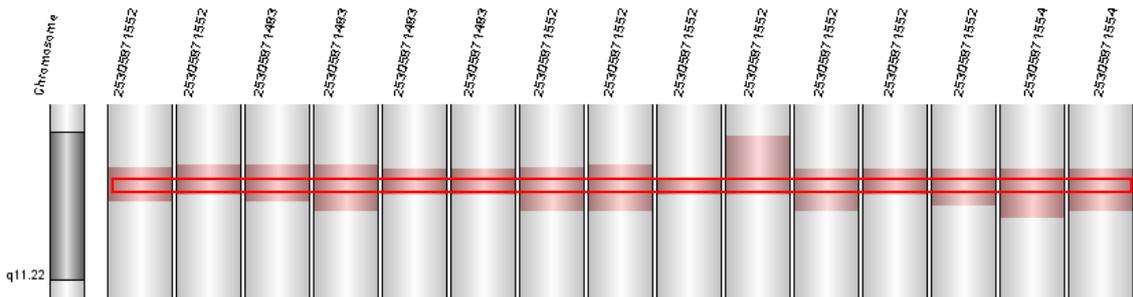


Figura 13. Imagem representando o intervalo 10q11.22 com alterações no número de cópias em 75% das amostras. Em vermelho a delimitação indicando a região de interesse com perdas genômicas.

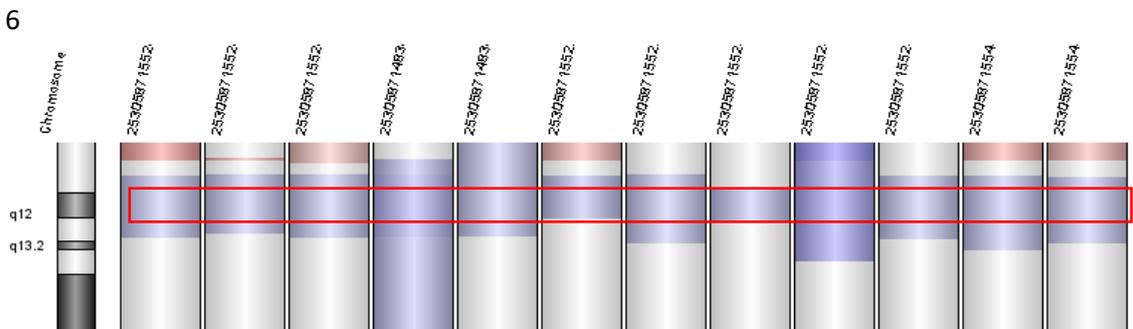


Figura 14. Imagem representando o intervalo 15q11.1-q13.1 com alterações no número de cópias em 60% das amostras. Em vermelho a delimitação indicando a região de interesse com ganhos genômicos.

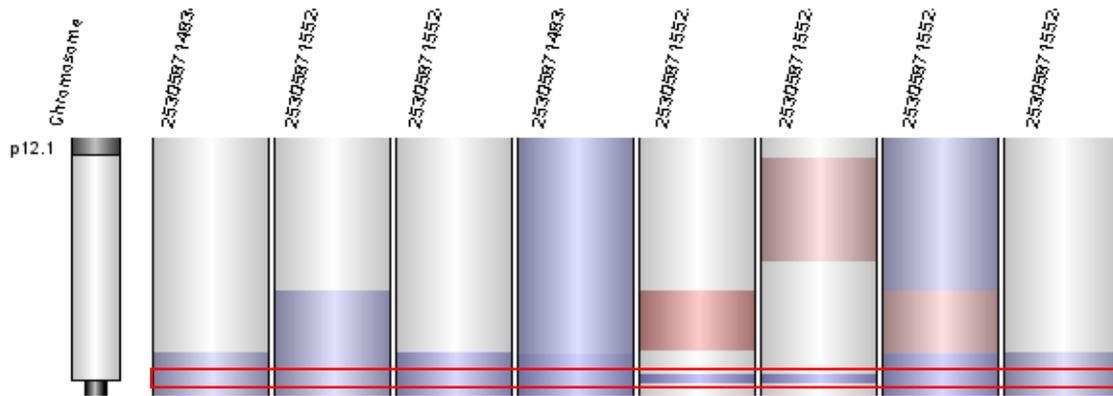


Figura 15. Imagem representando o intervalo 16p11.2-p11.1 com alterações no número de cópias em 40% das amostras. Em vermelho a delimitação indicando a região de interesse com ganhos genômicos.

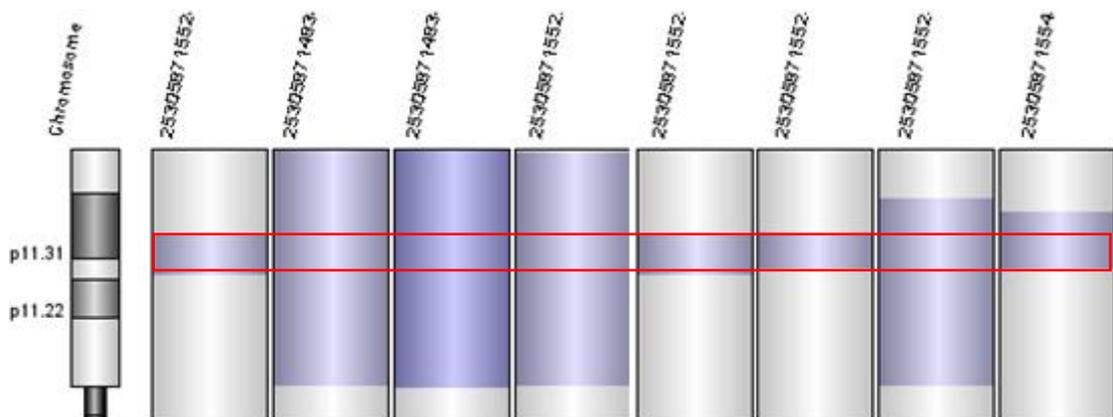


Figura 16. Imagem representando o intervalo 18p11.31-p21 com alterações no número de cópias em 40% das amostras. Em vermelho a delimitação indicando a região de interesse com ganhos genômicos.

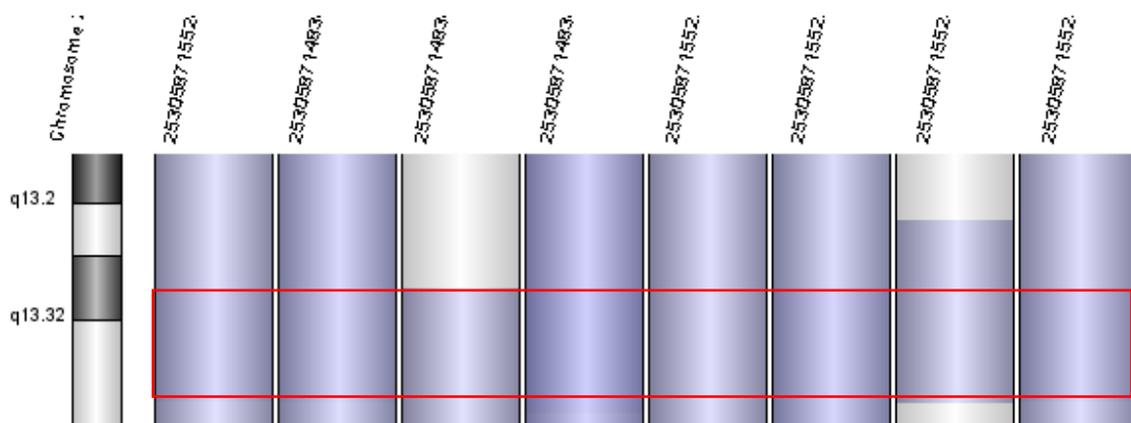


Figura 17. Imagem representando o intervalo 20q13.32-q13.3 com alterações no número de cópias em 40% das amostras. Em vermelho a delimitação indicando a região de interesse com ganhos genômicos.

Ganhos genômicos no cromossomo 14 (q32.33) foram relatados em todas as amostras, conforme observado nas Figura 18. Cerca de cinco genes podem ser observados com alterações no número de cópias na região alterada do cromossomo 14 (Figura 19).

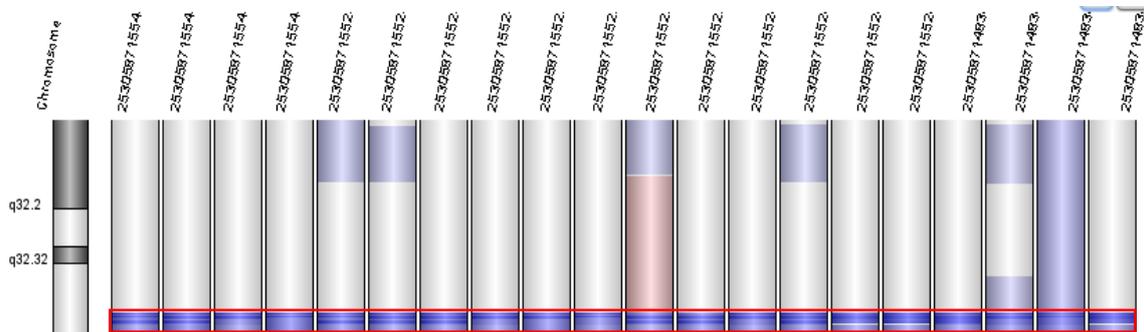


Figura 18. Imagem representando o intervalo 14q32.33 com alterações no número de cópias em 100% das amostras. Em vermelho a delimitação indicando a região de interesse com ganhos genômicos.

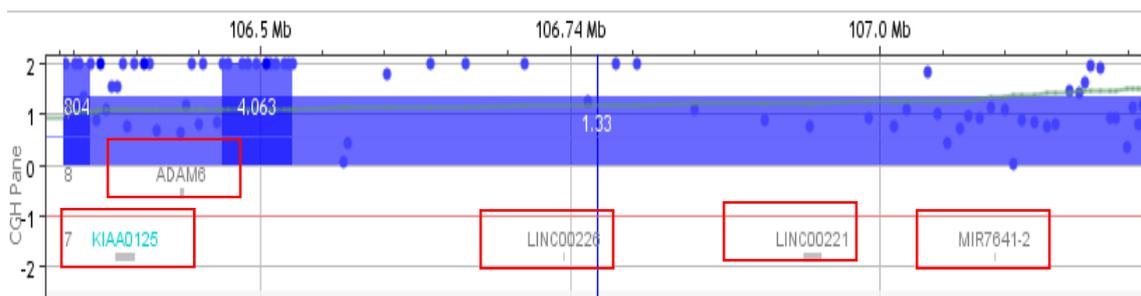


Figura 19. Imagem representando os genes *KIAA0125*, *ADAM6*, *LINC00226*, *LINC00221*, *MIR7641-2* com ganhos no número de cópias em 100% das amostras. Em vermelho a delimitação indicando os genes com ganhos genômicos

5. DISCUSSÃO

O câncer de pênis (CaPe) é uma doença negligenciada, agressiva e com grande impacto social e psicológico em seus acometidos (TORBRAND et al., 2016). A ocorrência desse tipo de tumor é alta em países em desenvolvimento como o Brasil, onde a incidência da doença é considerada uma das maiores do mundo (FAVORITO et al., 2008).

Nesse estudo foram avaliados 20 CaPe quanto às suas características clínico-histopatológicas, presença de infecção por HPV e alterações genômicas globais. O perfil dos pacientes estudados revela concordância com outros estudos realizados no Brasil e no mundo. A maioria dos pacientes apresentava idade acima de 60 anos, com média de 63,5 anos, corroborando com a prevalência desse tipo de tumor em homens acima dos 60 anos de idade (FAVORITO et al., 2008; FONSECA et al., 2010; DE SOUSA et al., 2015). No entanto, a ocorrência de CaPe não se limita a faixa etária citada, podendo ocorrer também em indivíduos mais jovens (FAVORITO et al., 2008; KOIFMAN et al., 2011). No presente trabalho, 35% dos pacientes possuíam idade inferior a 60 anos.

Houve prevalência de pacientes com baixa escolaridade (70% dos casos), e em sua maioria lavradores, o que reforça os achados sobre a prevalência de CaPe em indivíduos com perfil socioeconômico vulnerável (POW-SANG et al., 2010; CHAUX et al., 2011). Em um estudo realizado por Abdalla e colaboradores (2017) foi observado que o entendimento sobre CaPe e seus fatores de risco é baixo, mesmo em indivíduos com escolaridade alta.

Em relação aos fatores de risco, o desenvolvimento desse tipo de tumor parece ser aumentado em pacientes que possuem o hábito de fumar (DALING et al. 2005; KOIFMAN et al., 2011; COUTO et al., 2014), corroborando com dados desta pesquisa, onde 50% dos casos relataram serem tabagistas. Um estudo realizado no Rio de Janeiro por Koifman e colaboradores (2011) descreveu que cerca de 56,5% eram fumantes, reforçando a relação entre o tabagismo e desenvolvimento de CaPe. Além disso, a relação entre etilismo e desenvolvimento de CaPe também já foi descrita (MCINTYRE et al., 2011; GAO et al., 2016), no presente estudo cerca de 55% dos pacientes faziam uso de álcool.

A presença de fimose foi relatada em 75% dos pacientes que participaram deste trabalho. A associação entre fimose e CaPe foi feita pela primeira vez por Wolbarst (1932), quando avaliou 1.103 casos de CaPe nos Estados Unidos, dos quais nenhum

paciente era Judeu, apesar de 3% da população do país ser judaica. A maioria dos pacientes nos estudos com CaPe são descritos com essa condição anatômica, que parece aumentar 3,2 vezes as chances de desenvolvimento do tumor (PAULA et al., 2005; ROMERO et al., 2013; MORIS et al., 2017). A incidência de CaPe entre os Judeus é baixa, fato associado principalmente a prática de circuncisão neonatal nessa população, revelando um caráter preventivo dessa prática em relação ao desenvolvimento de CaPe.

Em relação à classificação histológica dos tumores, o subtipo histológico mais frequente foi o usual (45% dos casos), corroborando com os achados descritos na literatura, os quais mostram que esse subtipo histológico representa cerca de 48-65% dos casos de CaPe (CHAUX & CUBILLA et al., 2012). Neste trabalho, o sítio de comprometimento mais observado foi a glândula (50%), corroborando com outros trabalhos que relatam a glândula como principal sítio anatômico de início da carcinogênese do pênis (CHAUX et al., 2001; FAVORITO et al., 2008). Quanto ao tamanho e grau do tumor, nossos dados mostram prevalência de tumores entre 2,1-5,0 cm, estágio T2 (40%) e grau histológico II (50%). Os tumores com grau histológico II possuem risco intermediário, sendo o grau de diferenciação utilizado como preditivo para o prognóstico (AITA et al., 2016), de forma que, tumores com grau histológico III ou IV, são geralmente mais agressivos que tumores grau I ou II (NAM et al., 2017).

Quanto a invasão tumoral, 20% dos casos apresentaram invasão linfática, 15% invasão perineural e 15% metástase linfonodal até o momento da coleta de dados. Estes fatores estão diretamente relacionados a um pior prognóstico e sobrevida diminuída. Não foi possível correlacionar os parâmetros clínicos com a sobrevida devido a ausência de informações dos pacientes após procedimento cirúrgico, que revela a fragilidade do sistema de saúde no monitoramento e evolução dos pacientes, os quais, em sua maioria reside em cidades do interior do estado do Maranhão.

Em relação à infecção por HPV, foi observada uma alta prevalência de tumores positivos para o genoma do vírus (73,7%). Em 92,8% dos casos positivos foi detectada a presença de, no mínimo, um subtipo viral de alto risco. O subtipo mais comumente encontrado foi o 16 (alto risco oncogênico), presente em 57,1% dos casos positivos. Essa relação entre infecção por HPV de alto risco oncogênico e processos de tumorigênese é bem estabelecida em tumores do trato anogenital (ZUR-HAUSSEN, 1999; DOEBERITZ et al., 2009; GAO & SMITH, 2016; CAMPOS et al., 2017).

A alta prevalência HPV 16 nos tumores corrobora com achados anteriores em CaPe (ALEMANY et al, 2016), sendo este subtipo viral, juntamente com o subtipo 18, responsável por 70% dos casos de câncer do cólon do útero (DE SANJOSÉ et al., 2010; LI et al., 2011), além disso, são os subtipos virais mais frequentes em todas as regiões geográficas, corroborando com os estudos que sugerem que a frequência de HPV em CaPe parece estar relacionada com a prevalência local do vírus (BACKES et al., 2009; YANG et al., 2015; BLEEKER et al., 2009; CHRISTOULIDOU et al., 2015). No estado do Maranhão, a maior prevalência de HPV em tumores penianos já descrita foi de 91,9% de positividade nos 37 casos avaliados por Pereira e colaboradores (2017), dos quais 20 tumores são avaliados no presente estudo. A prevalência de HPV no Brasil em indivíduo sem manifestação clínica é de 30-75% (GININDZA et al., 2017; AFONSO et al., 2017), no entanto, não há dados de prevalência do vírus em homens sem lesões no Maranhão que sustentem a relação entre prevalência de HPV e incidência de CaPe na região.

Os mecanismos de transformação celular induzidas por HPV ainda não são totalmente elucidados, e a prevalência de tumores HPV positivos varia de acordo com o tipo de tecido estudado, método de detecção empregado e subtipo histológico do tumor (SCHEINER et al., 2008; AFONSO et al., 2012). Nessa pesquisa, cerca de 83,3% dos tumores condilomatosos foram positivos para HPV, corroborando com os achados de maior prevalência de infecção pelo vírus nesse subtipo histológico (CHAUX et al., 2010). Ademais, cerca de 55,5% dos casos usuais e 100% dos tumores mistos foram positivos para o vírus. A prevalência de HPV em tumores usuais e misto é bastante variável, e a positividade de todas as amostras de tumores mistos poder ser explicada pela composição histológica de caráter condilomatoso e basalóide, este último apresentando também alta prevalência de infecção pelo vírus, em média 66,3% dos casos (ALEMANY et al., 2016; KELLY et al., 2016).

Alguns trabalhos sugerem presença de HPV como fator prognóstico em CaPe. Wiener e colaboradores (1992) estudaram pela primeira vez a relação entre HPV e o prognóstico em CaPe, comparando parâmetros clínicos entre os casos HPV positivos e negativos. No entanto, não foi observada associação estatística significativa entre os parâmetros estudados. Em outro estudo, foi observado maior prevalência de infecção em pacientes mais jovens, menor percentual de embolização linfática em pacientes HPV positivos ($p=0.007$) e sem associação entre presença de HPV e ocorrência de metástase linfonodal e sobrevida dos pacientes (BEZERRA et al., 2001). Essa prevalência de

tumores HPV positivos em indivíduos mais jovens também foi observada por Chaux & Cubilla (2012). Em câncer orofaríngeo, pacientes com positividade para o vírus tendem a ter um aumento na sobrevivência de até cinco anos em relação aos casos negativos, o mesmo já observado em pacientes com CaPe (ANG et al., 2010; KOERBER et al., 2014; FLAHERTY et al., 2014). No presente estudo, não foi possível relacionar a sobrevivência com o status de HPV devido à escassez de informações sobre a evolução dos pacientes.

Não foi observada associação estatística significativa entre os parâmetros clínico-histopatológicos e a infecção pelo HPV, provavelmente devido ao tamanho amostral. No entanto, considerando-se que, a maioria dos tumores com grau histológico III (80%), estadiamento I e II (78,6%) e tamanho entre 0,5 e 5,0 cm foram positivos para presença de DNA viral. Enfatizamos a importância da imunização dos homens como medida preventiva a infecção pelo vírus. No Brasil, os programas de vacinação para HPV englobam somente mulheres. Imunização de meninos tem sido realizada de forma efetiva somente em programas de imunização dos Estados Unidos, Israel, Suíça e Austrália. (SILVA et al., 2017).

Todos os tumores foram avaliados quanto a alterações genômicas pela técnica de array-CGH, revelando um quantitativo de 1.085 regiões cromossômicas com alterações no número de cópias, entre ganhos (65%), perdas (29%), ampliações (28%) e deleções (3%). Essas alterações podem contribuir para o desenvolvimento de tumores, a medida que alteração no número de cópias (CNA) constituem um importante mecanismo de perturbação em proto-oncogenes e genes supressores tumorais (HIERONYMUS et al., 2014).

Foi observado um maior número de alterações genômicas em tumores mistos (média $91,25 \pm 46,9$), havendo diferença estatística somente entre as médias de CNAs de tumores usuais e mistos ($p=0.0179$). Parâmetros como grau, estadiamento e tamanho do tumor não apresentaram associação estatística com as alterações genômicas detectadas. Porém, a média de CNAs foi maior em tumores grau III, estadiamento II e tamanho entre 0,5 e 5,0 cm. Não houve diferença entre o número de alterações genômicas nos casos positivos e negativos para HPV, corroborando com Busso-Lopes e colaboradores (2015), que observaram o mesmo em CaPe.

A análise qualitativa revelou 50 regiões genômicas alteradas com prevalência em $\geq 40\%$ dos tumores. Tais alterações envolvem ganhos em 1p, 1q, 3q, 7p, 7q, 8q, 9p, 10q,

11q, 14q, 15q, 16p, 18p, 20q, 22q, e perdas em 1q, 4q, 8p, 10q, 15q e Yp. Quando essas alterações foram analisadas em relação aos parâmetros clínico-histopatológicos, foram detectadas 13 regiões (ganhos em 1q, 2p, 3q, 7p, 7q, 15q, 16p, 18p e 20q e perdas em 10q e Yp) associadas a esses parâmetros e/ou à infecção por HPV ($p < 0.05$). Os cromossomos 3, 7, 8 e 14 apresentaram maior número de regiões alteradas em pelo menos 40% tumores. A alta prevalência de alterações no cromossomo 8 foi descrito também em tumores penianos avaliados por Alves (2001) e Busso-Lopes e colaboradores (2015). No entanto, não houve associação estatística entre os parâmetros avaliados e alterações no cromossomo 8.

Das alterações estatisticamente significantes, ganhos genômicos em 1q43 e 2p12-p11.2 foram associados a pacientes com ausência de invasão perineural. Em CECs relacionados ao HPV, tumores na região da cabeça e pescoço frequentemente apresentam ganhos em 1q (WORSHAM et al, 2012). Em um trabalho realizado pelo Instituto de radiação molecular, ganhos em 1q43 revelaram prognóstico desfavorável na curva de sobrevivência livre da doença (Kaplan-Meie) em pacientes com câncer de cabeça e pescoço após tratamento radioterápico. Curiosamente, tumores de pênis costumam ser resistentes a radioterapia (POMPEO et al., 2010), sugerindo que ganhos em 1q43 possam estar associados a esta resistência ao tratamento. Outra hipótese seria a superexpressão de gene *EGFR* (7p), que tem sido relacionada a resistência a radioterapia e encontra-se com ganho em 60% dos casos avaliados nessa pesquisa. A superexpressão de *EGRF* é comumente relatada em câncer, fato que pode estar relacionado a ganhos genômicos na região deste gene (LAVENS et al., 2010; CARTHON et al., 2014).

Alterações em 1q43 não foram descritas em CaPe. Alguns SNPs no gene *RGS7*, localizado em 1q43, já foram associados a recorrência e surgimento de segundo tumor primário em câncer de cabeça e pescoço (WANG et al., 2012). Este gene encontra-se com ganho em 60% das amostras no presente estudo.

Em relação a alterações em 2p12, aumento na expressão do gene *REGIA*, de acordo com Astrosini e colaboradores (2008), é um importante fator prognóstico em relação a sobrevida livre de doença em câncer colorretal ($p < 0,05$). As alterações em 2p16.3 foram associadas a ausência de infecção por subtipo 16 no presente estudo. No entanto, apesar da região ser descrita como um dos locais de integração do vírus (AHAKI et al., 2017), o sítio de integração FRA2D geralmente é associado a HPV do subtipo 18 (CHUNG et al., 2004; SCHMITZ et al., 2012). No presente trabalho, nessa região

cromossômica foram observados ganhos em três genes. Destes, o gene *NRXN1* (neuroxina) é descrito em processos de sinapse no sistema nervoso central e controle intracelular de processos de *splicings* (CHEN et al., 2013). Curiosamente, uma proteína isomórfica codificada pelo gene *NRXN1* pode conter sequências que atuam como fator de crescimento epidermal, e, em câncer de pulmão, a interação entre *NRXN1* e quimioterápicos parece promover melhores respostas ao tratamento (KIM et al., 2013).

Em câncer esofaríngeal, ampliações em 7p13-p21 foram associadas a metástase a distância e alta morbidade pela doença (SAKAI et al., 2010). No presente estudo não foi possível analisar a presença de metástase a distância. No entanto, ganhos em 7p13 e 7p15 foram mais frequentes em tumores com estadiamento I e II (p=0.011 e 0.023), que geralmente possuem baixo potencial metastático (CHAUX et al., 2010).

La-Touche e colaboradores (2016) observaram que amplificação em 7q21 está relacionada à ausência de metástase linfonodal em pacientes com CaPe. Corroborando com esses autores, todos os tumores com metástase linfonodal avaliados no presente trabalho apresentaram alterações nessa banda cromossômica. Nessa região encontra-se o gene *GNAII*, codificante de uma proteína transdutora de sinal que, em hepatocarcinomas, atua regulando negativamente processos de migração e invasão das células tumorais (YAO et al., 2012). Logo, alterações nesse gene podem perturbar o controle celular em relação a migração e invasão.

A única perda genômica estatisticamente significativa no presente trabalho ocorreu em 10q11.22. Alterações desse tipo no braço longo do cromossomo 10 já foi associada à ausência de metástase linfonodal em CaPe (p<0.05) (LA-TOUCHE et al., 2016). No entanto, no presente estudo, 75% dos casos apresentaram perda na região 10q11.22, incluindo, embora com pequeno número de casos, todos os que desenvolveram metástase linfonodal (n=3). A banda 10q11.22 tem sido descrita em câncer de próstata hereditário devido a um alelo *minor* do gene *MSMB* (fator de ligação a imunoglobulinas). Este gene possui um SNP ([rs10993994](#)) próximo a região promotora do gene, o qual já foi associado ao desenvolvimento de câncer de próstata (THOMAS et al., 2008). No entanto, a deleção 10q22.11 parece não afetar o gene *MSMB* no presente estudo, sugerindo investigação para elucidação do significado dessa alteração na oncogênese peniana.

A região 15q11.2-q13.1 é geralmente associada ao autismo, síndrome de Prader-Willi e Angelman. Nesse estudo encontramos associação estatisticamente significativa de ganhos na região com a presença de HPV. Na busca por genes que estivessem relacionado ao câncer e que justificassem a associação estatística entre ganhos em 15q11.2-q13.1 e infecção por HPV, observamos que a interação entre o gene *HERC2* e a proteína *E6AP6* (ubiquitina ligase) já foi descrita na literatura (MARTINEZ-NOEL et al., 2012).

A proteína E6AP6 está envolvida na degradação de p53 pela proteína E6 do HPV. Curiosamente, *HERC2* parece atuar como ativador alostérico de E6AP, ou seja, estimula a atividade ubiquitina ligase de E6AP, que juntamente com E6 levam a proteína supressora tumoral p53 para degradação proteossômica (MORTENSERR et al., 2015). Surpreendentemente, o gene *UBE3A*, codificador de E6AP está localizado na mesma região detectada com ganhos genômicos em nosso estudo, no qual se encontra *HERC2*. Os ganhos genômicos destes dois genes associados a presença do HPV no presente estudo ($p=0.038$) é um achado importante no entendimento de tumores relacionados ao HPV.

Além disso, quando analisados possíveis sítios de integração do vírus em células do epitélio, observamos que a região 15q12 contém o sítio de integração viral HS150715, descrito em câncer do cólon do útero (WENTSENSEN et al., 2004).

A integração do genoma do HPV confere tanto vantagem de crescimento, instabilidade genômica e aumento na expressão dos transcritos oncogênicos (E6 e E7) em tumores associados ao vírus (FARAJI et al, 2017; CHEN et al., 2017). Esse evento ocorre geralmente por rompimento do genoma do vírus na região E2, codificante de uma proteína que regula negativamente E6 e E7. Com a disrupção de E2, ocorre a parada da regulação sobre as oncoproteínas, o que eleva superexpressão de E6 e E7 (PETT et al., 2004; LIU et al., 2015). Essa integração do genoma viral parece ser favorecida em sítios frágeis do genoma hospedeiro, regiões mais propensas a quebra da dupla fita de DNA. Geralmente o evento leva a variação no número de cópias em aproximadamente 1/3 das regiões de integração ou próximo a elas (AKAGI et al., 2017).

Curiosamente, 60% (n=50) das alterações encontradas em pelo menos 40% dos tumores e em 81,2% (n=13) das alterações estatisticamente significativas, são sítios de integração do genoma do HPV já descritos na literatura. Em câncer do cólon do útero a integração do HPV parece estar diretamente relacionada a mudança de fenótipo de neoplasia intraepitelial para carcinoma invasivo (LIU et al., 2015), sendo que, em cerca

de 10% desses tumores, a integração viral ocorre na região 8q24, onde localiza-se o gene *MYC*, comumente com alterações no número de cópias e superexpresso nesses tumores (PETER et al., 2006; SHEN et al., 2017).

No presente estudo a região 8q24 também apresentou ganhos no número de cópias envolvendo *MYC*, em 60% (n=12) dos casos, dos quais somente dois eram negativos para HPV. De acordo com Masferrer e colaboradores (2012), em câncer de pênis, ganhos em *MYC* são frequentes à medida que o tumor adquire potencial metastático, sendo considerado um fator independente para prognóstico desfavorável. O mesmo foi observado por McDaniel e colaboradores (2012).

Alterações do tipo ganho também foram detectadas na região 16p11.1-p11.2. Alves e colaboradores (2001) realizaram a primeira triagem de alterações genômicas por CGH em CaPe e também descreveram ganhos na região 16p11, porém não houve nenhuma associação com os parâmetros clínico-histopatológicos avaliados. No entanto, 19 dos 26 casos avaliados eram carcinoma moderadamente diferenciados, enquanto no presente estudo houve associação entre ganhos em 16p11 com estadiamento T2. Além disso, Busso-Lopes e colaboradores (2015), quando realizaram a segunda análise genômica global descrita para CaPe também observaram alterações em 16p11.1-p11.2. No entanto, foram descritos eventos do tipo perda somente em tumores verrucosos, sugerindo que alterações nessa região ocorrem de forma distinta em CaPe de acordo com o tipo de alteração e subtipo histológico estudado.

Dentre os genes descritos na região 18p11.31-p11.21, associada neste trabalho com tumores entre 0,5-5,0 cm, o gene *EPB41L3* já foi descrito em vias genéticas de câncer de pulmão. Segundo Liang e colaboradores (2015), em câncer de pulmão este gene é regulado negativamente por *miR-223*. Foi descrito em linhagens de carcinoma de pulmão, a expressão normal desse gene está associada a baixo risco de invasão tumoral (LIANG et al., 2015).

Neste trabalho, ganho em 20q13.32-q13.3 também foi associado a infecção por HPV. Nessa região encontra-se o gene *EDN3*, membro da família de endotelinas, essencial para proliferação, sobrevivência e migração de células precursoras de melanócitos. Análise transcriptômica e de metilação feita por Liu e colaboradores (2016) revelou envolvimento deste gene na carcinogênese do cólon do útero. Além disso, Espinosa e colaboradores (2013) relataram que o gene *EDN3* encontra-se *downregulated*

em câncer do cólon do útero. Chen e colaboradores (2014) demonstraram que a metilação deste gene pode ser considerado um biomarcador em câncer do cólon do útero, tumor totalmente relacionado a infecção pelo HPV. A hipermetilação de *EDN3* está associada a sobreposição gênica na região, que também é sítio de integração de HPV. Curiosamente, alterações em 20q13 também foram descritas por Alves e colaboradores (2001) em aproximadamente 40% das amostras de CaPe avaliadas.

Além das alterações que apresentam significância estatística, foram detectados muitos genes com alterações no número de cópias encontrados em grande parte das amostras analisadas. Um desses achados foi ganho em 14q32.33, o qual foi observado em 100% dos tumores. Nessa região foi detectado aumento no número de cópias dos genes *KIAA0125*, *ADAM6*, *LIC00226*, *LINC00211* e *MIR7641-2*. O gene *KIAA0125* codifica um RNA que não é transcrito em proteína e parece desenvolver funções relacionadas a neurogênese e astrocitose (LV et al., 2015). Entretanto, seu papel no câncer ainda não é totalmente compreendido.

Em um estudo realizado por Wenjie e colaboradores (2015) foi observado associação de *KIAA0125* com câncer de vesícula biliar, um tumor raro e com características agressivas. No estudo foi observado superexpressão de *KIAA0125* associada a um alto potencial metastático nesses tumores. Curiosamente em estudos *in vitro*, *knockout* deste gene parece inibir células de tumor vesicular quanto ao potencial de motilidade migração e invasão (ONO et al., 2014). Este achado revela um importante gene envolvido em processos de metástase e reforça a necessidade de melhor compreensão do papel de RNAs não codificantes no câncer. Descrevemos pela primeira vez alteração desse gene em CaPe.

Os demais genes da região 14q32.33 não são descritos como associados a alguma patologia específica ou ao câncer, exceto o gene *ADAM6*. Este pseudogene foi associado a células tumorais circulantes presentes no sangue de pacientes com melanoma (CHIU et al., 2014). Essas células são parecem promover maior risco de recorrência do tumor e baixa sobrevivência em melanomas. Semelhante aos nossos dados, em 100% dos 27 pacientes analisados no trabalho de Chiu e colaboradores (2014) foram detectados ganhos de *ADAM6*.

A família de proteínas ADAMs constituem importantes proteínas de membrana, que atuam em processos de adesão célula-célula e células-matriz-extracelular. Essas

proteínas são expressas preferencialmente nos testículos e caracterizam-se como desintegrinas e metaloproteases, com a presença de uma região *EGF-like* (PRIMAKOFF & MYLES, 2000; KELWICK et al., 2015). Outros genes codificantes de metaloproteases foram detectados com alterações no número de cópias nesta pesquisa. A exemplo do gene *MMP16*, cujo produto proteico já foi relacionado ao potencial de invasão e pior prognóstico de tumores gástricos (CAO et al., 2016).

É interessante perceber que, no presente estudo, pseudogenes ou genes de RNA não codificantes foram associados a alguma variável clínica do estudo, ou estavam alterados na maioria das amostras. Ademais, estudos recentes de sequenciamento de RNA revelaram que estas classes de genes são marcadores altamente específicos e possuem valor diagnóstico e prognóstico. De forma complementar, estudos em modelos animais sugerem uma ligação causal entre alteração na expressão de pseudogenes e câncer (POLISENO et al., 2015).

No presente trabalho foi discutido principalmente genes que ainda não haviam ou pouco haviam sido relacionados ao CaPe. No entanto, foram encontradas alterações também em genes *drivers* em diversos tipos de câncer e já relacionados a CaPe, como ganhos em receptores de crescimento epidermal (EGFR), que, em nosso estudo ocorreu em 60% dos casos. A superexpressão desse gene em CaPe e em outros tipos de câncer já foi descrita (LAVENS et al., 2010; DI-LORENZO et al., 2013; CARTHON et al., 2014; PEREIRA et al., 2017). Inúmeros outros genes com alterações foram detectados, tais como ganhos em *TP63* (50%), gene supressor tumoral descrito como marcador de transição entre neoplasia intraepitelial e cânceres potencialmente invasivos (ZHU et al., 2014), sendo a região em que se localiza (3q27.3) como sítio de integração viral. Ganhos em *TP73*, outro gene supressor de tumor, foi observado em 70% dos casos, em sítio de integração viral e já relacionado a câncer de cólon do útero (CRAVEIRO et al., 2004).

Por fim, enfatizamos que as alterações genômicas descritas no presente trabalho apresentam associação com variáveis clínicas e infecção por HPV. Dentre essas, algumas são descritas pela primeira vez em câncer peniano. Faz-se necessária a validação desses dados por técnicas específicas para determinar quais dessas alterações levam a desregulação do ciclo celular, produzindo um microambiente para estabelecimento e progressão do tumor. Esses marcadores devem ser validados por meio de análises gênicas e funcionais específicas de modo que potenciais alvos terapêuticos possam ser utilizados como ferramenta diagnóstica, prognóstica e terapêutica em câncer peniano.

6. CONCLUSÃO

No presente estudo, obtivemos dados de alterações no número de cópias em regiões cromossômicas já descritas em outros tipos de câncer e em tumores penianos. No entanto, descrevemos alterações nunca antes relatadas em casos de tumores de pênis. Além destas, a presença de alterações estatisticamente significativa nesse estudo revela novos potenciais biomarcadores para essa doença. Detectamos uma alta prevalência de infecção por HPV, havendo associação entre a presença do vírus, certas alterações genômicas e parâmetros clínico-histopatológicos dos pacientes avaliados, realçando a relação do vírus com o desenvolvimento desses tumores.

REFERÊNCIAS

AFONSO, L. A. et al. Human papillomavirus, Epstein-Barr virus, and methylation status of p16ink4a in penile cancer. **Journal of Medical Virology**, v. 9999, p. 1-7, 2017.

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.

AITA, G. A. et al. Tumor histologic grade is the most important prognostic factor in patients with penile cancer and clinically negative lymph nodes not submitted to regional lymphadenectomy. **International braz j urol**, v. 42, n. 6, p. 1136-1143, 2016.

- AKAGI, K. et al. Genome-wide analysis of HPV integration in human cancers reveals recurrent, focal genomic instability. **Genome research**, v. 24, n. 2, p. 185-199, 2014.
- ALEMANY, L. et al. Role of human papillomavirus in penile carcinomas worldwide. **European urology**, v. 69, n. 5, p. 953-961, 2016.
- ANG, K. K. et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 1, p. 24-35, 2010.
- ASTROSINI, C. et al. REG1A expression is a prognostic marker in colorectal cancer and associated with peritoneal carcinomatosis. **International journal of cancer**, v. 123, n. 2, p. 409-413, 2008.
- BACKES, D. M. et al. Systematic review of human papillomavirus prevalence in invasive penile cancer. **Cancer Causes & Control**, v. 20, n. 4, p. 449-457, 2009.
- 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. 84-89, 2016
- Begliomini, H. Carcinoma superficial multifocal do pênis: ênfase ao teste do azul de toluidina. **Rev. Col. Bras. Cir**, v. 28, n. 3, p. 235-237, 2001.
- Bezerra A.L. et al. Human papillomavirus as a prognostic factor in carcinoma of the penis: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy. **Cancer Journal**, v.92 p. 2315-2321, 2001.
- BLEEKER, M.C.G. et al. Penile cancer: epidemiology, pathogenesis and prevention. **World J Urol**, v. 27, p. 141-150, 2009.
- BOCCARDO, E.; VILLA, L.L. Vírus e câncer. In: **Oncologia Molecular**. 1. Ed. São Paulo: Atheneu, p.123-132, 2004.
- BOUVARD, V. et al. A review of human carcinogens—Part B: biological agents. **Lancet Oncol**, v. 10 p. 321–322, 2009.
- BRODERS, A. C. The microscopic grading of cancer. **Surg Clin North Am**, v. 21, n. 4, p. 947-62, 1941.
- BUSSO, A. F. Alteração no número de cópias genômicas e expressão gênica em larga escala em carcinomas de pênis. Tese (Doutorado). Fundação Antônio Prudente, 2013.
- CAMPOS, N. G. et al. Cost-effectiveness of HPV-based cervical cancer screening in the public health system in Nicaragua. **BMJ Open**, v. 7, n. 6, p. e015048, 2017.

CAMUS, S. et al. Ubiquitin-independent degradation of p53 mediated by high-risk human papillomavirus protein E6. **Oncogene**, v. 26, n. 28, p. 4059-4070, 2007.

CAO, L. et al. MMP16 is a marker of poor prognosis in gastric cancer promoting proliferation and invasion. **Oncotarget**, v. 7, n. 32, p. 51865, 2016.

CARTHON, B. C. et al. Epidermal growth factor receptor-targeted therapy in locally advanced or metastatic squamous cell carcinoma of the penis. **BJU international**, v. 113, n. 6, p. 871-877, 2014.

CARVALHO, N.S. et al. Associação entre HPV e Câncer Peniano: Revisão da Literatura. **DST – J bras Doenças Sex Transm**, v. 19, n. 2, p. 92-95, 2007.

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, A. et al. Metastatic tumors to the penis: a report of 17 cases and review of the literature. **International journal of surgical pathology**, v. 19, n. 5, p. 597-606, 2011.

CHAUX, A. et al. Papillary squamous cell carcinoma, not otherwise specified (NOS) of the penis: clinicopathologic features, differential diagnosis, and outcome of 35 cases. **The American journal of surgical pathology**, v. 34, n. 2, p. 223-230, 2010.

CHAUX, A.; CUBILLA, A. L. Advances in the pathology of penile carcinomas. **Human pathology**, v. 43, n. 6, p. 771-789, 2012.

CHEN, X. et al. HPV16 DNA and integration in normal and malignant epithelium: implications for the etiology of laryngeal squamous cell carcinoma. **Annals of Oncology**, v. 28, n. 5, p. 1105-1110, 2017.

CHEN, X. et al. Molecular analysis of a deletion hotspot in the NRXN1 region reveals the involvement of short inverted repeats in deletion CNVs. **The American Journal of Human Genetics**, v. 92, n. 3, p. 375-386, 2013.

CHEN, Y.C et al. Methyloomics analysis identifies epigenetically silenced genes and implies an activation of β -catenin signaling in cervical cancer. **International journal of cancer**, v. 135, n. 1, p. 117-127, 2014.

CHIPOLLINI, J. et al. Patterns of Regional Lymphadenectomy for Clinically Node-negative Patients With Penile Carcinoma: Analysis From the National Cancer Database From 1998 to 2012. **Clinical Genitourinary Cancer**, p. 1, 2017.

CHIU, C. G. et al. Genome-wide characterization of circulating tumor cells identifies novel prognostic genomic alterations in systemic melanoma metastasis. **Clinical chemistry**, v. 60, n. 6, p. 873-885, 2014.

CHRISTOULIDOU, M.; SAHDEV, V.; HOUSSEIN, S.; MUNEER, A, Epidemiology of penile cancer. **Current Problem Cancer**, v.39 (3), p.129-136, 2015.

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

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

COUTURIER, J. et al. Integration of papillomavirus DNA near myc genes in genital carcinomas and its consequences for proto-oncogene expression. **Journal of virology**, v. 65, n. 8, p. 4534-4538, 1991.

CRAVEIRO, R. et al. TP73 alterations in cervical carcinoma. **Cancer genetics and cytogenetics**, v. 150, n. 2, p. 116-121, 2004.

CUBILLA, A. L. et al. Warty (condylomatous) squamous cell carcinoma of the penis: a report of 11 cases and proposed classification of verruciform penile tumors. **The American journal of surgical pathology**, v. 24, n. 4, p. 505-512, 2000.

CURADO, M.P.; EDWARDS, B.; SHIN, H.R. Cancer incidence in five continents. **Lyon: IARC Scientific Publications**, v. 9, 2007.

DA SILVA AMANCIO, A. M. T. et al. Epidermal growth factor receptor as an adverse survival predictor in squamous cell carcinoma of the penis. **Human pathology**, v. 61, p. 97-104, 2017.

DALING, J. R. et al. Penile cancer: importance of circumcision, human papillomavirus and smoking in in situ and invasive disease. **International Journal of Cancer**, v. 116, n. 4, p. 606-616, 2005.

DE PAULA, A.A.P., et al. Carcinoma epidermóide do pênis: considerações epidemiológicas, histopatológicas, influência viral e tratamento cirúrgico. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.51, p. 243-252, 2005.

DE SANJOSE, S. et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. **The lancet oncology**, v. 11, n. 11, p. 1048-1056, 2010.

DE SOUSA, I. D. B. et al. Prevalence of human papillomavirus in penile malignant tumors: viral genotyping and clinical aspects. *BMC urology*, v. 15, n. 1, p. 13, 2015.

DI LORENZO, G. et al. EGFR mutational status in penile cancer. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 17, n. 5, p. 501-505, 2013.

DONG, L. et al. Changes in genotype prevalence of human papillomavirus over 10-year follow-up of a cervical cancer screening cohort. *Zhonghua liu xing bing xue za zhi= Zhonghua liuxingbingxue zazhi*, v. 38, n. 1, p. 20-25, 2017.

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

ESCANDE, A. et al. Brachytherapy for Conservative Treatment of Invasive Penile Carcinoma: Prognostic Factors and Long-Term Analysis of Outcome. **International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics**, v. 98, 2017.

ESPINOSA, A.M et al. Mitosis is a source of potential markers for screening and survival and therapeutic targets in cervical cancer. **PLoS one**, v. 8, n. 2, p. e55975, 2013.

FARAJI, F. et al. Molecular mechanisms of human papillomavirus-related carcinogenesis in head and neck cancer. **Microbes and Infection**, 2017.

FAVORITO, L.A.; NARDI, A.C. et al. Epidemiologic Study on Penile Cancer in Brazil. **Brazilian Society of Urology**, v. 34, n. 5, p. 587-593, 2008.

FLAHERTY, A. et al. Implications for human papillomavirus in penile cancer. In: **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**. Elsevier, v.32(1), p. 53-58, 2014.

FLORIN, L. et al. Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. **Journal of virology**, v. 76, n. 19, p. 10009-10014, 2002.

GAO, G.; SMITH, D. I. Human Papillomavirus and the Development of Different Cancers. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 150, n. 3-4, p. 185-193, 2016.

GAO, W. et al. Risk factors and negative consequences of patient's delay for penile carcinoma. **World journal of surgical oncology**, v. 14, n. 1, p. 124, 2016.

GININDZA, T. G. et al. Prevalence of and associated risk factors for high risk human papillomavirus among sexually active women, Swaziland. *PloS one*, v. 12, n. 1, p. e0170189, 2017.

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

GUIMARÃES, G. C. et al. Penile squamous cell carcinoma clinicopathological features, nodal metastasis and outcome in 333 cases. **The Journal of urology**, v. 182, n. 2, p. 528-534, 2009.

HARISH, K.; RAVI, R. The role of tobacco in penile carcinoma. **BJU International**, v. 75, n. 3, p. 375-377, 1995.

HAUSEN, H. zur. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, n. 9, p. 690-698, 2000.

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

HIERONYMUS, H. et al. Copy number alteration burden predicts prostate cancer relapse. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 30, p. 11139-11144, 2014.

INCA. HPV e câncer - Perguntas mais frequentes. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_uterio/hpv-cancer-perguntas-mais-frequentes. Acesso em: 12 Fev. de 2017.

JENA, N. R. DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair. *Journal of biosciences*, v. 37, n. 3, p. 503-517, 2012.

JOHNSON, D. E. et al. Verrucous carcinoma of the penis. **The Journal of urology**, v. 133, n. 2, p. 216-218, 1985.

KALLIONIEMI, O. et al. Comparative genomic hybridization: a rapid new method for detecting and mapping DNA amplification in tumors. **Seminars in Cancer Biology**, v.4, p.41-46, 1993.

KELWICK, R. et al. The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family. **Genome biology**, v. 16, n. 1, p. 113, 2015.

KHATTAK, F. et al. Mathematical Modeling of E6-p53 interactions in Cervical Cancer. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 18, n. 4, p. 1057, 2017.

KIM, J. H. et al. Genome-wide association study of lung cancer in Korean non-smoking women. **Journal of Korean medical science**, v. 28, n. 6, p. 840-847, 2013.

KOERBER, S. A. et al. Influence of human papillomavirus and p16 INK4a on treatment outcome of patients with anal cancer. **Radiotherapy and Oncology**, v. 113, n. 3, p. 331-336, 2014.

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

KRIEGSMANN, M. et al. Detection of HPV subtypes by mass spectrometry in FFPE tissue specimens: a reliable tool for routine diagnostics. *Journal of Clinical Pathology*, p. 204-217, 2016.

LAVENS, N.; GUPTA, R.; WOOD, L. A. EGFR overexpression in squamous cell carcinoma of the penis. **Curr Oncol**, v. 17, n. 1, p. 4-6, 2010.

LEBELO, R. L. et al. Diversity of HPV types in cancerous and pre-cancerous penile lesions of South African men: Implications for future HPV vaccination strategies. **Journal of medical virology**, v. 86, n. 2, p. 257-265, 2014.

LEE, Ha-Na; NA, Hye-Kyung; SURH, Young-Joon. Resolution of inflammation as a novel chemopreventive strategy. In: **Seminars in immunopathology**. Springer-Verlag, 2013. p. 151-161.

LI, F. et al. Diagnosis and treatment of penile verrucous carcinoma. **Oncology letters**, v. 9, n. 4, p. 1687-1690, 2015.

LI, N. et al. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. **International journal of cancer**, v. 128, n. 4, p. 927-935, 2011.

LIANG, H. et al. MicroRNA-223 delivered by platelet-derived microvesicles promotes lung cancer cell invasion via targeting tumor suppressor EPB41L3. **Molecular cancer**, v. 14, n. 1, p. 58, 2015.

LIMA, M. M.; TOBIAS-MACHADO, M. Suicide in patients with genitourinary malignancies. **European journal of cancer care**, 2017.

LIN, H.Y. et al. GATA3 and TRPS1 are distinct biomarkers and prognostic factors in breast cancer: database mining for GATA family members in malignancies. **Oncotarget**, 2017.

LIU, Y. et al. Comprehensive mapping of the human papillomavirus (HPV) DNA integration sites in cervical carcinomas by HPV capture technology. **Oncotarget**, v. 7, n. 5, p. 5852, 2016.

LIU, Y. et al. Identification of key genes associated with cervical cancer by comprehensive analysis of transcriptome microarray and methylation microarray. **Oncology Letters**, v. 12, n. 1, p. 473-478, 2016.

LV, W. et al. Long Noncoding RNA KIAA0125 Potentiates Cell Migration and Invasion in Gallbladder Cancer. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 108458-108458, 2014.

LV, W. et al. Long Noncoding RNA KIAA0125 Potentiates Cell Migration and Invasion in Gallbladder Cancer. *BioMed research international*, v. 2015, p. 108458-108458, 2014.

MARTÍNEZ-NOËL, G. et al. Identification and proteomic analysis of distinct UBE3A/E6AP protein complexes. **Molecular and Cellular Biology**, v. 32, n. 15, p. 3095-3106, 2012.

MASFERRER, E. et al. MYC copy number gains are associated with poor outcome in penile squamous cell carcinoma. **The Journal of urology**, v. 188, n. 5, p. 1965-1971, 2012.

MCDANIEL, A. S. et al. Genomic profiling of penile squamous cell carcinoma reveals new opportunities for targeted therapy. **Cancer research**, v. 75, n. 24, p. 5219-5227, 2015.

MCINTYRE, M. et al. Penile cancer: an analysis of socioeconomic factors at a southeastern tertiary referral center. **The Canadian journal of urology**, v. 18, n. 1, p. 5524-5528, 2011.

MILLS, A. M. et al. HR-HPV E6/E7 mRNA In Situ Hybridization: Validation Against PCR, DNA In Situ Hybridization, and p16 Immunohistochemistry in 102 Samples of Cervical, Vulvar, Anal, and Head and Neck Neoplasia. *The American journal of surgical pathology*, v. 41, n. 5, p. 607-615, 2017.

MIRABELLO, L. et al. HPV16 sublineage associations with histology-specific cancer risk using HPV whole-genome sequences in 3200 women. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 108, n. 9, p. djw100, 2016.

MONTIEL-JARQUÍN, Á. J. et al. Five-year survival analysis in patients with penile cancer. **Revista medica del Instituto Mexicano del Seguro Social**, v. 55, p. S34, 2017.

MORRIS, B. J. et al. Early infant male circumcision: Systematic review, risk-benefit analysis, and progress in policy. **World journal of clinical pediatrics**, v. 6, n. 1, p. 89, 2017.

MORTENSEN, F. et al. Role of ubiquitin and the HPV E6 oncoprotein in E6AP-mediated ubiquitination. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 32, p. 9872-9877, 2015.

MOSCONI, A. M. et al. Cancer of the penis. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 53, n. 2, p. 165-177, 2005.

NAM, Jong Kil et al. Clinicopathologic Characteristics and Treatment Outcomes of Penile Cancer. **The world journal of men's health**, v. 35, n. 1, p. 28-33, 2017.

NEVES, D. et al. Prevalence of human papillomavirus in penile carcinoma. *Braz J Urol*, v. 28, n. 3, p. 221-226, 2002.

NING, Q. Y. et al. Key pathways involved in prostate cancer based on gene set enrichment analysis and meta analysis. **Genet Mol Res**, v. 10, n. 4, p. 3856-87, 2011.

NORMANNO N, D. L., et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*, v.16, p. 366:2-16, 2016.

NOVARA, G. et al. Prognostic factors in squamous cell carcinoma of the penis. **Nature Clinical Practice Urology**, v. 4, n. 3, p. 140-146, 2007.

O'BRIEN, J. S. et al. Penile cancer: contemporary lymph node management. **The Journal of urology**, v. 197, n. 6, p. 1387-1395, 2017.

- OLESEN, T. B. et al. Human papillomavirus prevalence among men in sub-Saharan Africa: a systematic review and meta-analysis. **Sexually transmitted infections**, v. 90, n. 6, p. 455-462, 2014.
- ONO, H. et al. Long noncoding RNA HOTAIR is relevant to cellular proliferation, invasiveness, and clinical relapse in small-cell lung cancer. **Cancer medicine**, v. 3, n. 3, p. 632-642, 2014.
- PAIVA, G.R. et al. Penile cancer: impact of age at diagnosis on morphology and prognosis. **World J Urol**, v. 47, p. 295-299, 2015.
- PAULA, A. A. P.; NETO, J. C. A.; CRUZ, A. D.; JÚNIOR, R. F. Penile squamous carcinoma: epidemiological, histopathological, viral influence and surgical considerations. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 3, p. 243-252, 2005.
- PEREIRA, S. R. F. et al. Copy number and mRNA expression alterations of the PI3K/AKT and inflammatory pathways in penile cancer patients. **Cancer research**, v. X p.73, 2017.
- PETER, M. et al. MYC activation associated with the integration of HPV DNA at the MYC locus in genital tumors. **Oncogene**, v. 25, n. 44, p. 5985-5993, 2006.
- PETT, M. R. et al. Acquisition of high-level chromosomal instability is associated with integration of human papillomavirus type 16 in cervical keratinocytes. **Cancer research**, v. 64, n. 4, p. 1359-1368, 2004.
- PIZZOCARO, G. et al. EAU penile cancer guidelines 2009. **European urology**, v. 57, n. 6, p. 1002-1012, 2010.
- POLISENO, Laura; MARRANCI, Andrea; PANDOLFI, Pier Paolo. Pseudogenes in human cancer. **Frontiers in medicine**, v. 2, 2015.
- POMPEO, A. C.; HEYNS, C. F.; ABRAMS, P. Penile cancer: international consultation on penile cancer. **Urology**, v. 1076, s. 2, p. S1-S73, 2010.
- POMPEO, A.C.L. et al. Projeto Diretrizes II. **Soc. Brasileira de Urologia**, São Paulo, p. 1-9, 2006.
- POW-SANG, M. R. et al. Epidemiology and natural history of penile cancer. **Urology**, v. 76, n. 2, p. S2-S6, 2010.

PRIGGE, E. S.; VON KNEBEL DOEBERITZ, M.; REUSCHENBACH, M. Clinical relevance and implications of HPV-induced neoplasia in different anatomical locations. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 772, p. 51-66, 2017.

PRIMAKOFF, P.; MYLES, D. G. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. **Trends in Genetics**, v. 16, n. 2, p. 83-87, 2000.

PROTZEL, C.; SPIESS, Philippe E. Molecular Research in Penile Cancer—Lessons Learned from the Past and Bright Horizons of the Future? *International journal of molecular sciences*, v. 14, n. 10, p. 19494-19505, 2013.

PYEON, D. et al. Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 2, p. e1000318, 2009.

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

REIS-FILHO, J. S. et al. The molecular genetics of breast cancer: the contribution of comparative genomic hybridization. **Pathol Res Pract**, v. 201, n. 11, p. 713-725, 2005.

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

RODRIGUES, A. D. et al. Comparação das técnicas de captura de híbridos e PCR para a detecção de HPV em amostras clínicas. **J Bras Patol Med Lab**, v. 45, n. 6, p. 457-62, 2009.

ROMAGOSA, C. et al. p16Ink4a overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. **Oncogene**, v. 30, n. 18, p. 2087-2097, 2011.

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

ROSITCH, A. F. et al. Patterns of persistent genital human papillomavirus infection among women worldwide: a literature review and meta-analysis. **International journal of cancer**, v. 133, n. 6, p. 1271-1285, 2013.

SAKAI, N. et al. Study of abnormal chromosome regions in esophageal squamous cell carcinoma by comparative genomic hybridization: relationship of lymph node metastasis and distant metastasis to selected abnormal regions. **Diseases of the Esophagus**, v. 23, n. 5, p. 415-421, 2010.

SANCHEZ, D. F. et al. Pathological factors, behavior, and histological prognostic risk groups in subtypes of penile squamous cell carcinomas (SCC). In: **Seminars in diagnostic pathology**. WB Saunders, 2015. p. 222-231.

SCHEINER, M. A. et al. Human papillomavirus and penile cancers in Rio de Janeiro, Brazil: HPV typing and clinical features. **International braz j urol**, v. 34, n. 4, p. 467-476, 2008.

SCHMITZ, Martina et al. Non-Random Integration of the HPV Genome in Cervical Cancer. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, 2012.

SENKOMAGO, V. et al. Higher HPV16 and HPV18 penile viral loads are associated with decreased human papillomavirus clearance in uncircumcised Kenyan men. **Sex Trans Dis**, v. 43, n. 9, p. 572-578, 2016.

SHAH, A. A. et al. Prognostic factors and 5-year survival of patients with carcinoma penis: Tertiary health center study. **Indian Journal of Cancer**, v. 53, n. 2, p. 309, 2016

SHEN, C. et al. Long-distance interaction of the integrated HPV fragment with MYC gene and 8q24. 22 region upregulating the allele-specific MYC expression in HeLa cells. **International Journal of Cancer**, v. 141, p. 540-548, 2017.

SILVA, A. M. T. C.; AMARAL, M. V. T.; CRUZ, A. D. O papel do papiloma vírus humano no câncer. **Biotechnol Cienc Desenvol**, v. 29, p. 48-54, 2003.

SILVA, R. J. C. et al. Persistence and clearance of HPV from the penis of men infected and non-infected with HIV. **Journal of medical virology**, v. 83, n. 1, p. 127-131, 2011.

SNUSTAD, P.; SIMMONS, M.J. Base genética do câncer. In: **Fundamentos de Genética**. 6ª Edição. Ed. Guanabara Koogan, cap. 21 p. 574-590, 2013.

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

SOUTO, R.; FALHARI, J. P. B.; CRUZ, A. D. O Papilomavírus Humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 51, n. 2, p. 155-160, 2005.

SOUZA, V. C.; MARQUES, S.M.D. Câncer de pênis no Brasil: um problema de saúde pública. *Revista Brasileira de Oncologia Clínica*, v. 11, n. 40, 2015.

STANKIEWICZ, E. et al. HPV infection and immunochemical detection of cell-cycle markers in verrucous carcinoma of the penis. ***Modern Pathology***, v. 22, n. 9, p. 1160-1168, 2009.

STRATTON, K. L.; CULKIN, D. J. A Contemporary Review of HPV and Penile Cancer. ***Oncology (Williston Park, NY)***, v. 30, n. 3, p. 245-249, 2016.

THAPA, S. et al. Warty Carcinoma Penis: An Uncommon Variant. ***Case Reports in Pathology***, v. 2017, 2017.

THOMAS, G. et al. Multiple loci identified in a genome-wide association study of prostate cancer. ***Nature genetics***, v. 40, n. 3, p. 310-315, 2008.

THOMAS, M. et al. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. ***Oncogene***, v. 18, n. 53, p. 7690-7700, 1999.

TORBRAND, C. et al. Socioeconomic factors and penile cancer risk and mortality: a population-based study. ***BJUI Internatinal***, p. 2-7, 2016.

VELTMAN, J.A. et al. High-throughput analysis of subtelomeric chromosome rearrangements by use of array-based Comparative Genomic Hybridization. ***American Journal Human Genetics***, v. 70, p.1269-1276, 2002.

VON KNEBEL DOEBERITZ, M; VINOKUROVA, S. Host factors in HPV-related carcinogenesis: cellular mechanisms controlling HPV infections. ***Archives of medical research***, v. 40, n. 6, p. 435-442, 2009.

WENTZENSEN, N.; VINOKUROVA, S.; VON KNEBEL DOEBERITZ, M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. ***Cancer research***, v. 64, n. 11, p. 3878-3884, 2004.

WESSELS, L.F.A. et al. Molecular classification of breast carcinomas by comparative genomic hybridization: a specific genetic profile for BRCA1 tumors. ***Cancer Research***, v.62, p. 7110-7117, 2002.

WIENER, J. S. et al. Prevalence of human papillomavirus types 16 and 18 in squamous-cell carcinoma of the penis: A retrospective analysis of primary and metastatic lesions by differential polymerase chain reaction. **International journal of cancer**, v. 50, n. 5, p. 694-701, 1992.

WOLBARST, A.. Circumcision and penile cancer. *The Lancet*, v. 219, n. 5655, p. 150-153, 1932.

WORSHAM, M. J. et al. Molecular characterization of head and neck cancer: how close to personalized targeted therapy? **Molecular diagnosis & therapy**, v. 16, n. 4, p. 209-222, 2012.

YANG, L. et al. Prevalence of human papillomavirus and the correlation of HPV infection with cervical disease in Weihai, China. *European journal of gynaecological oncology*, v. 36, n. 1, p. 73-77, 2014.

YAO, J. et al. GNAI1 suppresses tumor cell migration and invasion and is post-transcriptionally regulated by mir-320a/c/d in hepatocellular carcinoma. **Cancer biology & medicine**, v. 9, n. 4, p. 234-241, 2012.

YU, T. et al. The role of viral integration in the development of cervical cancer. **Cancer genetics and cytogenetics**, v. 158, n. 1, p. 27-34, 2005.

ZHOU, C. et al. Inhibition of EGFR/PI3K/AKT cell survival pathway promotes TSA's effect on cell death and migration in human ovarian cancer cells. **International journal of oncology**, v. 29, n. 1, p. 269, 2006.

ZHU, D. et al. Amplification and overexpression of TP63 and MYC as biomarkers for transition of cervical intraepithelial neoplasia to cervical cancer. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 24, n. 4, p. 643-648, 2014.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in human cancers. **Proceedings of the Association of American Physicians**, v. 111, n. 6, p. 581-587, 1999.

APÊNDICES

Apêndice A - Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)



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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

INFORMAÇÕES PARA OS PACIENTES, RESPONSÁVEIS E FAMILIARES

Você está sendo convidado a participar voluntariamente do projeto de pesquisa **“ANÁLISE DE ALTERAÇÕES GENÔMICAS E NA EXPRESSÃO GÊNICA e PROTEICA EM CÂNCER PENIANO”**.

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

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DO ESTUDO

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

Como será feita esta pesquisa?

As pessoas serão convidadas a participar da pesquisa. Receberão uma cópia deste documento que deverá ser lido, entendido e assinado. Os participantes serão atendidos pelo médico que fará algumas perguntas, examinará o paciente e, se necessário, poderá solicitar alguns exames complementares para auxiliar no diagnóstico.

Quais os riscos e limites que podem ser encontrados quando for feita a coleta de material biológico?

Os riscos são mínimos, pois a análise dos fragmentos de tumor não implicará em riscos adicionais na sua cirurgia e, nem tampouco, em aumento no tempo de operação ou extensão da mesma, ou terá qualquer influência no resultado do seu tratamento, de modo que você é livre para escolher entre participar ou não da pesquisa.

Todos os dados do paciente são absolutamente confidenciais e, portanto, serão comunicados somente à pessoa ou responsável e ao profissional médico que acompanha o paciente.

Quais os benefícios e malefícios deste estudo?

Não haverá nenhuma vantagem direta, tal como remuneração financeira, com a participação neste estudo, porém, os resultados poderão ajudar no entendimento do estabelecimento da doença e poderá contribuir para a melhoria do diagnóstico e tratamento dessa patologia.

Os pacientes terão acompanhamento e assistência médica no hospital onde realizam tratamento médico, mesmo que não participem desta pesquisa ou que a pesquisa seja interrompida.

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

Rotineiramente, o material biológico retirado é destinado para exames clínicos laboratoriais necessários para um diagnóstico. O restante do material retirado é armazenado e pode ser usado para novos exames, caso seja necessário. Caso contrário, é descartado, conforme regulamenta a legislação sanitária no Brasil.

Neste estudo, estamos solicitando sua permissão para utilizar o resto de tecidos e/ou fluídos retirados de você que não são mais necessários para o seu diagnóstico. As amostras serão registradas por números, para evitar identificação dos pacientes.

A eventual inclusão dos resultados da pesquisa em publicação científica será sempre feita de modo a manter seu anonimato.

O paciente ou seu responsável legal poderá escolher entre ser informado ou não dos resultados da pesquisa. Aqueles que se interessarem em saber sobre os resultados obtidos com o presente estudo serão orientados pela coordenadora geral do Projeto, Dra. Silma Regina Ferreira Pereira (professora do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Maranhão), podendo ser contactada no Laboratório de Genética e Biologia Molecular, no endereço: Av. dos Portugueses, 1966, cidade universitária do Campus do Bacanga, São Luís, Maranhão, telefone (98) 3272-8543.

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMA está situado na Avenida dos Portugueses número 1966, Cidade Universitária do Bacanga, Prédio do CEB Velho, PPPG, Bloco C Sala 07. E-mail cepufma@ufma.br, telefone (98) 3272-8708. Este comitê tem, como uma de suas atribuições, garantir a manutenção dos aspectos éticos da pesquisa, bem como a obtenção do consentimento livre e esclarecido dos indivíduos ou grupos para a sua participação.

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

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

São Luís, _____ de _____ de 20 ____

NOME POR EXTENSO/RG

ASSINATURA

Apêndice B: alterações genômicas encontradas em $\geq 40\%$ dos 20 casos CaPe analisados.

| Localização CNA | Evento | Sítio de integração do HPV (subtipo) | Genes alterados | % de amostras |
|---------------------|--------|---|---|---------------|
| Cromossomo 1 | | | | |
| 1p36.31 | ganho | Sim (16) | <i>MIR4417</i> | 45% |
| 1p36.32 | ganho | Sim (16) | <i>PLCH2, PANK4, HES5, TNFRSF14, ACTRT2, PRDM16, MEGF6, MIR551A, TPR GIL, TP73, SMIMI, CEP104, DFFB, AJAPI, LOC115110, LOC100996583, FAM2 13B, MMEL1, TTC34, LINC00982, MIR4251, ARHGEF16, WRAP73, TP73- AS1, CCDC27, LRRC47, C1orf174, LINC01134, LINC01346, LOC284661</i> | 70% |
| 1q21.2 | perda | Sim (16,45) | <i>NBPF25P</i> | 45% |
| 1q43 | ganho | Sim (18) | <i>RYS2, ZP4, CHRM3, FMN2, GREM2, RGS7, LOC100130331, LINC01139, CHRM3-AS2, CHRM3- AS1, RPS7P5, MIR1273E</i> | 60% |
| Cromossomo 2 | | | | |
| 2p12 | ganho | Não | <i>REG3G, REG1A, CTNNA2, LRRTM1, REG1B, REG1CP, REG3A, LOC101927987, MIR4264, MIR8080</i> | 85% |

| | | | | |
|---------------------|-------|--------------|---|-----|
| 2p12-p11.2 | ganho | Sim (16) | <i>LRRTM4, REG3G, REG1A, CTNNA2, LRRTM1, LOC101927907, LOC101927967, LOC101927926, SNAR-H, LOC101927948, EG1B, REG1CP, REG3A, LOC101927987, MIR4264, MIR8080, LOC100507201, LOC1720</i> | 70% |
| 2p16.3 | ganho | Sim (18, 16) | <i>NRXN1, MIR8485, LOC730100</i> | 55% |
| 2p25.3 | ganho | Não | <i>TPO, PXDN, MYTIL, LINC01115, LOC101060385, SNTG2, MYTIL-AS1</i> | 45% |
| Cromossomo 3 | | | | |
| 3q23 | ganho | Sim (16) | <i>MRPS22, COPB2, RBP2, RBP1, NMNAT3, CLSTN2, LOC100507291</i> | 40% |
| 3q24 | ganho | Não | <i>C9A9-AS1, SLC9A9, PLOD2, ZIC1, AGTR1, C3ORF58, PLSCR4, PLSCR1, PLSCR2, ZIC4, CPB1, PLSCR5, LOC440982, LOC100507461</i> | 40% |
| 3q25 | ganho | Sim (16) | <i>CLRN1, MME, MLF1, IFT80, PFN2, TM4SF4, MED12L, MBNL1, RAP26, PLCH1, DHX30, GMPS, KCNAB1, LEKR1, VEPH1, SHOX2, ARL14, RNF13, LINC01213, TSC22D2, GPR171, IGSF10, TMEM14EP, MBNL1-AS1, C3ORF79, ARHGEF26, LOC100507537, C3ORF33, LIC00881, LOC100996447, IQCJ-SCHIP1, SCHIP1, C3ORF80,</i> | 45% |
| 3q26.1 | ganho | Sim (45) | <i>SI, SLITRK3, BCHE, LINC01192, MIR1263, LINC01324, LINC01322</i> | 85% |

| | | | | |
|---------------------|-------|-------------|--|-----|
| 3q26.31 | ganho | Sim (45) | <i>PIK3CA, GNB4, CCDC39, DNAJC19, SOX2, NLGN1, NAALADL2, TBL1XR1, KCNMB2, KCNMB3, USP13, PEX5L, FXR1, NAALADL2-AS1, NAALADL2-AS2, NAALADL2-AS3, NLGN1-AS1, MIR7977, LINC01209, LINC00578, LINC01014, ZMAT13, LOC100505609, LOC102724604, SOX2-OT, FLJ46066</i> | 45% |
| 3q27.3-q28 | ganho | Sim (18) | <i>BCL6, LPP, MIR28, TP63, P3H2, CLDN1, CLDN16, TMEM207, IL1RAP, LPP-AS2, FLJ42393.</i> | 50% |
| 3q29 | ganho | Não | <i>OPA1, TFRC, CEP19, RUBCN, HRASLS, HES1, GP5, CPN2, LSG1, XXYLT1, PPP1R2, TNK2, UBXN7, WDR53, SENP5, IQCG, LMLN, ATP13A5, LOC647323, LOC100507391, ACAP2, SDHAP2, ZDHHC19, MIR4797, MIR922</i> | 40% |
| Cromossomo 4 | | | | |
| 4q13.2 | perda | Sim (16) | <i>UGT2B17</i> | 45% |
| Cromossomo 5 | | | | |
| 5q13.2 | perda | Não | <i>OCLN, SERF1A, SMN1, SMN2, GTF2H2, GTF2H2C, GTF2H2C_2, GUSBP3, SERF1B, SMA4, GTF2H2B, SMA5, LOC441081, GUSBP9, NAIP, LOC647859, LOC102724392</i> | 50% |
| Cromossomo 7 | | | | |

| | | | | |
|--------------|-------|--------------|---|-----|
| 7p12.1-p11.2 | ganho | Não | <i>HPVC1, EGFR, POM121L12, LINC01446, LINC01445, VSTM2A, VSTM2A-OT1, SEC61G, LOC100996654, EGFR-AS1</i> | 60% |
| 7p13 | ganho | Sim (45) | <i>BLVRA, GCK, NPC1L1, OGDH, HECW1, STK17A, COA1, URGCP, MRPS24, POLM, CAMK2B, NUDCD3, DDX56, TMED4, ZMIZ2, MYL7, PPIA, PURB, MYO1G, RAMP3, LOC100506895, SPDYE1, POLR2J4, YKT6, H2AFV, MIR4657, SNORA9, NACAD, SNORA5A.</i> | 40% |
| 7p14 | ganho | Não | <i>NME8, SFRP4, STARD3NL, TARP, AMPH, EPDR1, TRG-AS1</i> | 55% |
| 7p15 | ganho | Não | <i>NKX3-2, PROM1, RAB2B, QDPR, SLD34A2, CPEB2, BST1, LDB2, MIR218-1, SLIT2, GBA3, PPARGC1A, LG12, DHX15, STIM2, PCDH7, LOC101929019, LIC00504, LINC01097, LAP3, MIR4275, LOC102723828, LOC101927363.</i> | 45% |
| 7p21.3 | ganho | Sim (16) | <i>MIOS, RPA3, GLCC11, ICA1, NXPH1, UMAD1, LOC100505921, LOC100505938</i> | 65% |
| 7q11.2 | ganho | Não | <i>GUSB, KCTD7, ELN, NCF1, POR, ZNF107, ZNF92, PARGF1, WBSCR17, FKBP6, FZD8, BAZ1B, EIF4H, GTF21, CCL26, DTX2, FOL2, ATPR, LOC100287704, ZNF733P, ZNF079, ZNF727, ZNF273, INTSP2, PMS2P4, LOC100507468, MIR39142, TYW1B, MIR4650-2, GTF2IRD2, PMS2P7, PMS2P5, GTF2IP1, SSC4D, PMS2P9, CCD6146</i> | 40% |
| 7q21.11 | ganho | Sim (16, 35) | <i>GNAI1, GNAT3, CD36, SEMA3C, HGF, PCLO, SEMA3E, SEMA3A, SEMA3D, MAGI2,</i> | 60% |

| <i>MAGI2-AS3, MIR548M, LOC101927269, LOC100128317, CACNA2D1, LOC101927356, LOC101927378</i> | | | | | |
|---|-------|-------------|---|--|-----|
| Cromossomo 8 | | | | | |
| 8p11.22 | perda | Sim (18) | <i>ADAM5, ADAM3A</i> | | 55% |
| 8p23.1 | perda | Sim (16) | <i>DEFB103A, DEFB4A, DEFB4B, DEFB103B, SPAG11B, DEFB104B, DEFB104A, DEFB106B, DEFB106A, DEFB105A, DEFB105B, DEFB107A, DEFB107B, PRR 23D1, PRR23D2, FAM90A7P ,FAM90A10P, SPAG11A, ZNF705B, FAM66E, USP17L8, USP17L3, DEFB109P1 B, MIR548I3</i> | | 85% |
| 8q12.1 | ganho | Não | <i>TGSI, LYN, RPS20, MOS, PLAG1, CHCHD7, PENK, XKR4, SBF1P1, LOC10537 5843, TMEM68, SNORD54, SDR16C5, SDR16C6P, LOC101929415</i> | | 50% |
| 8q13.3 | ganho | Não | <i>NCOA2, EYA1, MSC, TRPA1, LOC101926892, TRAM1, LACTB2- AS1, LACTB2, XKR9, MSC-AS1</i> | | 50% |
| 8q21.13-q21.3 | ganho | Sim (16,18) | <i>RALYL, E2F5, CA1, CA3, CA2, WWP1, CPNE3, CNGB3, MMP1 6, LOC101927141, LINC01419, LRRCC1, LOC102723322, C8orf59, CA13, CA3A S1, REXO1L2P, PSKH2, ATP6V0D2, SLC7A13, RMDN1, CNBD1, DCAF4L2 RAD54B, NDUFAF6, C8ORF37, GDF6, UQCRB, VPS13B, SPAG1, GRHL2, RRM2B, FDZ6, DPYS, CDH17, GEM, DPY19L4, SDC2, RPL30, TSPYL5, RPL30, STK3, MATN2, RGS22, FBXO43, PABPC1, YWHAZ, NCALD, ODF1, AZIN1, KLF10, AZIN1, RIMS2, DCSTAMP, OC102724710, RBM12B, LINC00535, LOC100500773, LOC101927066, MIR599, SNX31, ZNF706, BAALC-AS2.</i> | | 55% |
| 8q22 | ganho | Sim (18) | | | 70% |

| | | | | |
|----------------------|-------|--------------|--|-----|
| 8q23.3 | ganho | Não | <i>TRPS1, CSMD3, EIF3H</i> | 65% |
| 8q24.21 | ganho | Sim (16,18) | <i>POU5F1B, MYC, PVT1, CASC21, CASC8, CCAT2, CASC11, MIR1204, TMEM75, MIR1205, MIR1206, MIR1207, MIR1208, LINC00824, LINC00977, CCDC26.</i> | 55% |
| 8q11.1-q24.3* | ganho | Sim (16, 18) | <i>PRKDC, MCM4, RB1CC1, SOX17, RP1, PLAG1, IMAP1, CA8, CHD7, ASPH, TTPA, CYP7B1, CSPP1, CPA6, EYA1, TRPA1, TMEM70, JPH1, GDAP1, ZFH4, PEX2, CA2, CNGB3, NBN, TMEM67, PDP1, RAD54B, NDUFA6, C8ORF37, GDF6, UQCRB, PTDSS1, VPS13B, SPAG1, GRHL2, RRM2B, FZD6, CTHRC1, DPYS, ZFPM2, TRHR, TRPS1, RAD21, SLC30A8, EXT1, TNFRSF11B, TAF2, RNF139, NDUFB9, KIAA0196, MYC, KCNQ3, LRRC6, TG, SLA, NDRG1, KCNK9, TRAPPC9, ARC, SLURP1, CYP11B1, CYP11B2, GPIHBP1, FAM83H, PUF60, PLEC, OPLAH, CYC1, DGAT1, SLC52A2, SLC39A4, RECAL4,</i> | 50% |
| Cromossomo 9 | | | | |
| 9p21.3 | ganho | Não | <i>ELAVL2, LOC101929563, IZUMO3</i> | 45% |
| Cromossomo 10 | | | | |
| 10q11.22 | perda | Não | <i>GPRIN2, NPY4R, ANXA8, CHI7360D5.1, LINC00842, HNRNPA1P33, FAM25C, FAM25G, AGAP9, BMS1P6, FAM35DP, ANTXRLP1, ANTXRL, FAM25BP, ANX A8LI</i> | 75% |
| 10q26.13 | ganho | Sim (16) | <i>DMBT1</i> | 85% |
| Cromossomo 11 | | | | |
| 11q21 | ganho | Não | <i>MAML2, MIR1260B, JRKL, CCDC82, JRKL-AS1, LOC105369443</i> | 40% |
| 11q25 | ganho | Não | <i>NTM, OPCML, NTM-AS1, NTM-IT</i> | 45% |

| Cromossomo 14 | | | | |
|----------------------|---------|----------|--|------|
| 14q11.2 | perda | Não | <i>DAD1, ABHD4</i> | 75% |
| 14q12 | ganho | Não | <i>NOVA1, FOXG1, PRKD1, LOC101927062, LOC102724890, MIR4307HG, MIR4307, LINC00645, MIR3171, FOXG1-AS1, LINC01551, LOC105370424, MIR548AI</i> | 45% |
| 14q31-q31.3 | ganho | Sim (16) | <i>FLRT2, LOC105370605, LINC00911, LOC101928767, LOC283585</i> | 40% |
| 14q32.33 | ganho | Sim (16) | <i>KIAA0125, ADAM6, LIC00226, LINC00211, MIR7641-2</i> | 100% |
| 14q32.33 | amplif. | Sim (16) | <i>LINC00226</i> | 45% |
| Cromossomo 15 | | | | |
| 15q11.2-q13.1 | ganho | Sim (18) | <i>OCA2, PWRN2, PWRN1, NPAP1, SNRPN, SNORD116-1, IPW, SNORD115-1, UBE3A, ATP10A, GABRB3, GABRA5, GABRG3, OCA2, HERC2, APBA2, CHEK2 P2, HERC2P3, GOLGA6L6, GOLGA8CP, MIR3118-4, MIR3118-3, MIR3118-2, POTE3, POTE3, POTE2, NF1P2, MIR5701-3, MIR5701-1, MIR5701-2, LINC01193, LOC646214, CXADRP2, LOC101927079, LOC727924, OR4M2, OR4N4, OR4N3P, MIR1268A, REREP3, MIR4509-3, MIR4509-2, MIR4509-1, GOLGA8DP, GOLGA6L1, GOLGA6L22, LOC283683, WHAMMP3, GOLGA8IP, HERC2P2, HERC2P7, GOLGA8EP, GOLGA8S, GOLGA6L2, MIR4508, PWRN4, PWRN3, SNURF, SNORD107, PWARSN, PWAR5, SNORD64, SNORD108, SNORD109B, SNORD109A, SNORD116-2, SNORD116-9, SNORD116-</i> | 60% |

3, SNORD116-4, SNORD116-5, SNORD116-7, SNORD116-6, SNORD116-8, SNORD116-10, SNORD116-11, SNORD116-12, SNORD116-13, SNORD116-14, SNORD116-15, SNORD116-16, SNORD116-17, SNORD116-19, SNORD116-18, SNORD116-20, SNORD116-21, SNORD116-22, SNORD116-23, SNORD116-24, SNORD116-25, SNORD116-26, SNORD116-27, SNORD116-28, SNORD116-29, SNORD116-30, PWAR1, SNORD115-2, SNORD115-3, SNORD115-4, SNORD115-5, SNORD115-12, SNORD115-10, SNORD115-9, SNORD115-6, SNORD115-7, SNORD115-8, SNORD115-29, SNORD115-43, SNORD115-36, SNORD115-11, SNORD115-13, SNORD115-14, SNORD115-16, SNORD115-19, SNORD115-17, SNORD115-18, SNORD115-20, SNORD115-21, SNORD115-15, SNORD115-22, PWAR4, SNORD115-23, SNORD115-24, SNORD115-25, SNORD115-26, SNORD115-27, SNORD115-28, SNORD115-30, SNORD115-31, SNORD115-32, SNORD115-33, SNORD115-34, SNORD115-35, SNORD115-37, SNORD115-38, SNORD115-39, SNORD115-40, SNORD115-41, SNORD115-42, SNORD115-44, SNORD115-45, SNORD115-46, SNORD115-47, SNORD115-48, MIR4715, LOC100128714, LINC00929, GABRG3-AS1, GOLGA8F, GOLGA8G, HERC2P9, GOLGA8M, WHAMMP2, LOC100289656, PDCD6IPP2, GOLGA6L7P, FAM189A1, NSMCE3

15q11.1-q11.2 perda Não NBEAP1, CHEK2P2, HERC2P3, GOLGA6L6, GOLGA8CP, MIR3118-4, MIR3118-3, MIR3118-2, POTE3, POTE2, NF1P2, MIR5701-3, MIR5701-1, MIR5701-2,

45%

| | | | | | |
|---|-------|----------|---|--|-----|
| <i>LINC01193, LOC646214, CXADRP2, LOC101927079, LOC727924, OR4M2, OR4N4, OR4N3P, MIR1268A, REREP3</i> | | | | | |
| <i>NR2F2, SPATA8, NR2F2-AS1, MIR1469, SPATA8-</i> | | | | | |
| 15q26.2-q26.3 | ganho | Sim (16) | <i>AS1, LOC101927286, LOC101927310, LINC00923, ARRDC4, LINC0158</i> | | 45% |
| Cromossomo 16 | | | | | |
| 16p11.2-p11.1 | ganho | Sim | <i>LINC00273, UBE2MP1, LINC01566, FRG2DP, TP53TG3HP, FLJ26245</i> | | 40% |
| Cromossomo 18 | | | | | |
| 18p11.31-p11.21 | ganho | Sim (16) | <i>EPB41L3, ARHGAP28, LAMA1, PTPRM, MIR3976HG, MIR3976, TMEM200C, L3MBTL4, L3MBTL4-AS1, MIR4317, LINC01387, LOC101927168, LINC00668, LOC101927188, LRRC3</i> | | 40% |
| Cromossomo 20 | | | | | |
| 20q13.32-q13.33 | ganho | Sim (16) | <i>GNAS, CTSZ, TUBB1, ATP5E, EDN3, PHACTR3, SYCP2, PPP1R3D, CDH4, TAF4, PSMA7, LOC101927932, NELFCD, SLMO2-ATP5E, PRELID3B, ZNF831, LOC100506384, FAM217B, CDH26, C20orf197, LOC729296, MIR646HG, MIR646, LOC101928048, MIR4533, MIR548AG2, LOC100506470, MIR1257, MIR3195, LSM14B.</i> | | 40% |
| Cromossomo 22 | | | | | |
| 22q11.21 | ganho | Não | <i>SEPT5, GP1BB, TBX1, GNB1L, SEPT5-GP1BB</i> | | 55% |
| Cromossomo Y | | | | | |

| | | | | |
|------|-------|-----|---|-----|
| Yp11 | perda | Não | <i>PCDH11Y, AMELY, TBL1Y, PRKY, TSPY1, TTTY23B, TTTY23, TSPY2, LINC00280, TTTY1, TTTY1B, TTTY2, TTTY2B, TTTY21, TTTY21B, TTTY7B, TTTY7, TTTY8B, TTTY8, TTTY16, TTTY12, TTTY18, TTTY19, TTTY11, RBMY1A3P, TTTY20, FAM197Y2P, FAM197Y5P, TSPY4, TSPY8, TSPY3, TSPY10, RBMY3AP, TTTY22</i> | 40% |
|------|-------|-----|---|-----|

Sítios de integração viral de acordo com WENTZENSEN et al., 2004; PETT et al., 2004; AKAGI et al., 2017.

ANEXO A - Parecer de aprovação do Comitê de Ética

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: SILMA REGINA FERREIRA PEREIRA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 46371515.5.0000.5087

Instituição Proponente: FUNDACAO UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHAO

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

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.308.275

Apresentação do Projeto:

O câncer de pênis (CP) é uma neoplasia rara em países desenvolvidos. No entanto, sua incidência é mais elevada em países em desenvolvimento, como o Brasil, sendo mais prevalente nas regiões Norte e Nordeste. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA) esse tipo de tumor representa 2% de todos os tipos de câncer que atingem o homem, tendo sido registrados 363 mortes no ano de 2010. De acordo com a SBU, em 2007, o Maranhão teve 10,7% dos casos de câncer de pênis notificados no Brasil, estando entre os cinco estados onde há maior prevalência, sendo superior até mesmo que o câncer de próstata. No entanto, faz-se necessário a realização de um estudo epidemiológico mais robusto e atualizado para que seja conhecida a realidade sobre a ocorrência dessa patologia no Estado.

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

A etiologia é heterogênea, mas estudos mostram uma relação com baixas condições socioeconômicas e de instrução, à má higiene íntima e a homens que não se submeteram à circuncisão. Apesar da alta prevalência de câncer peniano no Brasil, dados epidemiológicos, análise do background genético, parâmetros clínicos, evolução da doença e resposta aos tratamentos, ainda são incipientes, o que dificulta o diagnóstico, prognóstico e tratamento da doença e, conseqüentemente, resulta nos altos índices de diagnóstico em estágios avançados e mortalidade. A caracterização de alterações genômicas e de expressão gênica apresenta grande potencial para a identificação de marcadores moleculares e vêm contribuindo para o desenvolvimento de novas terapias em uma série de cânceres humanos. Neste sentido, propomos, por meio de análises de array-CGH, alteração no número de cópias (CNA), miRNAs, e análise de expressão gênica e protéica, a identificação de marcadores moleculares em tumores penianos de pacientes provenientes do Estado do Maranhão, normalmente diagnosticados em estágios clínicos avançados, onde o risco de recorrência tumoral é elevado. Os perfis genômicos observados serão validados através de análises gênicas específicas e funcionais, incluindo as principais vias de sinalização celular identificadas. Estas análises podem, futuramente, contribuir para a redução da taxa de mortalidade por estes tumores, pela predição do prognóstico em uma fase inicial do atendimento clínico, bem como pela escolha adequada do tratamento, propiciando uma resposta terapêutica satisfatória.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

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

Objetivo Secundário:

- Caracterizar os portadores de carcinomas penianos do Estado do Maranhão para o desenvolvimento de um registro epidemiológico específico para os homens do estado, a fim de identificar os principais fatores de risco e promover e incentivar ações preventivas.
- Identificar a presença de papilomavírus humano (HPV) e genotipar os subtipos virais.
- Identificar o perfil de alterações genômicas através do método de array-CGH.
- Identificar o perfil de expressão de miRNAs.
- Identificar alterações no número de cópias gênicas (CNA) por meio de qPCR.
- Integrar os dados de alterações de número de cópias de DNA com os de expressão de miRNA nas mesmas amostras tumorais.
- Avaliar alterações na expressão de genes específicos por meio de RT-PCR.

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho

Bairro: Bloco C, Sala 7, Comitê de Ética

CEP: 65.080-040

UF: MA

Município: SAO LUIS

(98)3272-8708

Fax: (98)3272-8708

E-mail: cepufma@ufma.br

- Identificar, por citometria de fluxo e imunohistoquímica, variações na expressão de proteínas relacionadas às alterações genéticas detectadas nas células tumorais.
- Correlacionar as alterações observadas com parâmetros clínico-patológicos dos pacientes (tipo histológico, grau de estadiamento, tamanho do tumor), incluindo dados de seguimento clínico (tempo livre da doença, recorrência tumoral, sobrevida, entre outros).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

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

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

Benefícios:

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

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

Os resultados obtidos nesta pesquisa serão comparados aos já existentes na literatura científica e serão tornados públicos, sejam eles favoráveis ou não.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

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

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

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

Recomendações:

Todas as recomendações foram acatadas e corrigidas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

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

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho

Bairro: Bloco C,Sala 7, Comitê de Ética

CEP: 65.080-040

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)3272-8708

Fax: (98)3272-8708

E-mail: cepufma@ufma.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MARANHÃO/MA



| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|--|---|---------------------|-------------------------------|----------|
| Informações do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_ROJETO_246615.pdf | 29/10/2015 15:48:44 | | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | CARTALIME.pdf | 29/10/2015 15:46:25 | SILMA REGINA FERREIRA PEREIRA | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | CARTAGYLEANES.pdf | 29/10/2015 15:46:04 | SILMA REGINA FERREIRA | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | CARTALABGEM.pdf | 29/10/2015 12:37:35 | SILMA REGINA FERREIRA PEREIRA | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | CARTALabimunofisiologia.pdf | 29/10/2015 12:31:36 | SILMA REGINA FERREIRA PEREIRA | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | CARTAAAnaPaula.pdf | 29/10/2015 12:29:12 | SILMA REGINA FERREIRA | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | CartaMartaBelfort.pdf | 29/10/2015 12:23:47 | SILMA REGINA FERREIRA | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | CARTALEUDIVAN.pdf | 29/10/2015 12:23:15 | SILMA REGINA FERREIRA | Aceito |
| Outros | RESPOSTAAOPARECERcapeniano.p | 28/10/2015 19:20:31 | SILMA REGINA FERREIRA | Aceito |
| Outros | FichaSujeitodapesquisa.pdf | 28/10/2015 18:57:15 | SILMA REGINA FERREIRA | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | Anuenciainstituicao.pdf | 28/10/2015 18:56:25 | SILMA REGINA FERREIRA | Aceito |
| | Anuenciainstituicao.pdf | 28/10/2015 18:56:25 | SILMA REGINA FERREIRA | Aceito |
| Folha de Rosto | Folhaderosto.pdf | 28/10/2015 18:53:22 | SILMA REGINA FERREIRA | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | CARTARONALD.pdf | 28/10/2015 18:48:31 | SILMA REGINA FERREIRA | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | CARTAJAQUELINE.pdf | 28/10/2015 18:41:54 | SILMA REGINA FERREIRA | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | CARTAJuliana.pdf | 28/10/2015 18:38:21 | SILMA REGINA FERREIRA | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | CARTAcaxixto.pdf | 28/10/2015 18:38:00 | SILMA REGINA FERREIRA | Aceito |

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho

Bairro: Bloco C,Sala 7, Comitê de Ética

CEP: 65.080-040

UF: MA

Município: SAO LUIS

(98)3272-8708

Fax: (98)3272-8708

E-mail: cepufma@ufma.br

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO LUIS, 04 de novembro de 2015

Assinado por:

Richard Diego Leite (Coordenado)