

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
FUNDAÇÃO HEMOCENTRO DE RIBEIRÃO PRETO**

**RENATO MENDES ROSSI DE LUCCA**

**PANORAMA GENÉTICO DO CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE PÊNIS**

**TESE DE DOUTORADO**

**RIBEIRÃO PRETO**

**2020**

**RENATO MENDES ROSSI DE LUCCA**

**PANORAMA GENÉTICO DO CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE PÊNIS**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Oncologia Clínica, Células tronco e Terapia celular

Orientador: Prof. Dr. Rodolfo Borges dos Reis

**RIBEIRÃO PRETO**

**2020**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Lucca, Renato Mendes de

Panorama genético do carcinoma epidermóide de pênis.  
Ribeirão Preto, 2020.

110 p.: il. ; 30 cm

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Oncologia Clínica, Células  
tronco e Terapia celular

Orientador: Borges dos Reis, Rodolfo

1.Câncer de pênis. 2.Mutações. 3.Exoma. 4.Diagnóstico molecular

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Lucca, Renato Mendes Rossi de**

Panorama genético do carcinoma epidermóide de pênis

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Oncologia Clínica, Células tronco e Terapia celular

Orientador: Prof. Dr. Rodolfo Borges dos Reis

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a).Dr(a).\_\_\_\_\_

Instituição:\_\_\_\_\_ Assinatura:\_\_\_\_\_

Prof(a).Dr(a).\_\_\_\_\_

Instituição:\_\_\_\_\_ Assinatura:\_\_\_\_\_

Prof(a).Dr(a).\_\_\_\_\_

Instituição:\_\_\_\_\_ Assinatura:\_\_\_\_\_

Prof(a).Dr(a).\_\_\_\_\_

Instituição:\_\_\_\_\_ Assinatura:\_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

À minha família terrena e espiritual.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiro agradeço ao Pai Maior, guias e orixás pela vida e pelos auxílios espirituais recebidos durante toda minha caminhada.

Agradeço a minha companheira Jaque por todo apoio e paciência durante essa jornada na pós-graduação e na vida e por toda dedicação a nossa família.

Agradeço a minha filha Liz, por me transformar em pai e conhecer o verdadeiro significado do amor.

Aos meus pais Solange e Roberto pelos ensinamentos morais e pela educação a mim dada me servindo como exemplo para a vida.

Ao meu irmão Victor por estar presente sempre quando precisei.

Aos meus sogros Seu Zé e Dona Lourdes por estarem sempre presente quando precisei, pelas conversas e pela cerveja nos meus momentos de tensão.

Aos meus cunhados, Mari, Jana e Neto por se fazerem presentes e auxílio a mim e a minha família sempre.

Agradeço ao Prof. Dr. Rodolfo Borges dos Reis pela oportunidade a mim dada, ao aprendizado e a orientação no doutorado que me fez crescer em todas as formas na minha vida.

Ao Prof., Dr. Wilson Araújo da Silva Junior, por auxiliar em minha orientação, e ao aprendizado sempre que precisei.

Agradeço às minhas colegas de laboratório Claudinha e Kelly por sempre estarem compartilhando nossos melhores momentos no laboratório e na vida além de todo incentivo e cumplicidade durante todo o doutorado.

Agradeço a minha caloura-veterana Dani Brotto por todo apoio e aprendizagem, além de estar sempre disponível quando precisei.

A todos os colegas da USP e Hemocentro de Ribeirão Preto que estavam sempre me acalmando e compartilhando de bons momentos.

Agradeço a todos meus irmãos de Fé do Núcleo de Umbanda Sagrada Flecha Dourada por todas as orações e apoio espiritual.

Aos Membros da banca por aceitarem fazer parte desse trabalho.

A USP e o Hemocentro, pelo local de trabalho oferecido.

A CAPES e o CNPQ pelo auxílio financeiro e incentivo a pesquisa.

E a todos aqueles que não foram citados, mas que tivemos contato durante todos esses anos, agradeço de coração.

## RESUMO

LUCCA, R. M. R. **Panorama genético do carcinoma epidermóide de pênis.** 2020 110f. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – São Paulo, 2020.

O Câncer de pênis (CP) é uma doença rara, intimamente ligado a higiene precária do pênis e é mais prevalente em regiões com baixo nível sócio econômicos. No Brasil o CP representa cerca de 2 a 4% dentre todos os tipos de câncer no sexo masculino, sendo mais frequente nas regiões Norte e Nordeste. A descoberta dos mecanismos moleculares envolvidos na gênese de diversos tumores tem propiciado diagnósticos mais precoces e melhora na eficiência dos procedimentos. A ausência de estudos com sequenciamento de larga escala no CP motivam o nosso estudo. Desta forma o objetivo do trabalho é fazer um estudo do exoma de tecido de CP. Para este trabalho foram selecionadas amostras de tecido tumoral de pacientes diagnosticados com carcinoma epidermóide de pênis. O DNA teve o exoma sequenciado e os dados foram analisados via bioinformática. Também foram feitos os diagnósticos moleculares para HPV 16 e 18 que é fator de risco para o CP. Como resultados encontramos uma amostra bastante heterogênea, entretanto, o achado de mutações em genes responsáveis por processos importantes para a manutenção e saúde das células foram encontrados. Observamos 40% dos pacientes com mutações em genes da família *NOTCH*, genes relacionados a diferenciação, proliferação e sobrevivência da célula, encontramos também a presença do *TP53* e *ATM* genes importantes para o reparo celular mutados em um paciente com pior prognóstico. Os genes mais mutados foram o *PABPC1*, *MUC16*, *USP6* e *SIRPa*, tanto em pacientes como nos controles o que possivelmente descarta papéis importantes no CP. Algumas mutações encontradas em pacientes com mau prognóstico foram exclusivas desses pacientes, dado importante que fornece uma fonte de estudo nova para estas variações. Em relação ao HPV, encontramos em apenas 16,67% dos pacientes o que é menor do que encontrado na literatura. Esses dados são importantes pois podem nos ajudar a entender o aparecimento e evolução do CP.

**PALAVRAS-CHAVE:** Exoma, Câncer de pênis, HPV

## ABSTRACT

LUCCA, R. M. R. **Genetic landscape of penile squamous cell carcinoma**. 2020. 110p. Doctoral Thesis. Ribeirão Preto Medical School – University of São Paulo, Ribeirão Preto – São Paulo, 2020.

Penile cancer (CP) is a rare disease, closely linked to poor penis hygiene and is more prevalent in regions with low socioeconomic status. In Brazil, the CP represents about 2 to 4% among all types of cancer in men, being more frequent in the north and northeast regions. The discovery of the molecular mechanisms involved in the genesis of several tumors has led to earlier diagnoses and improved efficiency of procedures. The absence of studies with large-scale sequencing in the CP motivates our study. Thus, the objective of the work is to make a study of the exome of CP tissue. For this work, tumor tissue samples from patients diagnosed with penile squamous cell carcinoma were selected. The DNA had the exome sequenced and the data were analyzed via bioinformatics. Moleculares diagnoses were also made for HPV 16 and 18, which is a risk factor for CP. As a result, we found a very heterogeneous sample, however, the finding of mutations in genes responsible for important processes for the maintenance and health of cells were found. We observed 40% of patients with mutations in *NOTCH* family, genes related to cell differentiation, proliferation and survival, we also found the presence of *TP53* and *ATM* genes important for cell mutation repair in patients with a worse prognosis. The most mutated genes were *PABPC1*, *MUC16*, *USP6* and *SIRPa*, both in patients and in controls, which possibly rules out important roles in CP. Some mutations found in patients with poor prognosis were exclusive to these patients, an important data that provides a new study source for these variations. Regarding HPV, we found in only 16.67% of patients what is less than that found in the literature. These data are important because they can help us to understand the appearance and evolution of CP.

KEYWORDS: Exome, Penile cancer, HPV



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Descrição da média de qualidade por base das reads de 75 nucleotídeos....	40
Figura 2. Lista dos 20 genes mais mutados em câncer de pênis. Gráfico modificado da plataforma COSMIC.....	43
Figura 3. Oncoprint demonstrando os genes mutados em relação a cada paciente .....	43
Figura 4. Análise de PPI comparativo dos pacientes A) 2424 e B) 439.....	44
Figura 5. Análise de enriquecimento de vias gênicas usando a lista dos 31 genes mutados nos pacientes da nossa coorte. A análise foi realizada na plataforma WebGestalt (Liao et al. 2019) .....	44
Figura 6. Localização do gene <i>TP53</i> .....	51
(Fonte GeneCard).....	51
Figura 7. Localização do gene <i>SIRPa</i> .....	51
(Fonte GeneCard).....	51
Figura 8. Localização do gene <i>NOTCH1</i> .....	52
(Fonte GeneCard).....	52
Figura 9. Localização do gene <i>NOTCH2</i> .....	52
(Fonte GeneCard).....	52
Figura 10. Localização do gene <i>JAK2</i> .....	53
(Fonte GeneCard).....	53
Figura 11. Localização do gene <i>EML4</i> .....	54
(Fonte GeneCard).....	54
Figura 12. Localização do gene <i>DDX10</i> .....	55
(Fonte GeneCard).....	55
Figura 13. Localização do gene <i>ATM</i> .....	55
(Fonte GeneCard).....	55
Figura 14. Localização do gene <i>USP6</i> .....	56
(Fonte GeneCard).....	56
Figura 15. Localização do gene <i>CBLC</i> .....	57
(Fonte GeneCard).....	57
Figura 16. Localização do gene <i>STRN</i> .....	57
(Fonte GeneCard).....	57
Figura 17. Localização do gene <i>TSC2</i> .....	58
(Fonte GeneCard).....	58
Figura 18. Localização do gene <i>RGPD3</i> .....	59
(Fonte GeneCard).....	59

Figura 19. Localização do gene <i>RSPO3</i> .....	60
(Fonte GeneCard).....	60
Figura 20. <i>PPI</i> do paciente 2424 gerado pelo <i>StringDB</i> .....	62
Figura 21. <i>PPI</i> do paciente 435 .....	68
Figura 22. <i>PPI</i> do paciente 439 .....	70
Figura 23. <i>PPI</i> do paciente 453 .....	76
Figura 24. <i>PPI</i> do paciente 435 .....	79

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sistema TMN para estadiamento do câncer de pênis .....	18
Tabela 2. Primers usando na reação de PCR para detecção do HPV 16 e 18.....	29
Tabela 3. Nomenclatura adotada para pacientes e controles.....	37
Tabela 4. Principais informações clínicas, demográficas e sociais coletadas dos prontuários dos pacientes.....	39
Tabela 5. Características do sequenciamento.....	41
Tabela 6. Caracterização molecular das variantes patogênicas encontradas nos pacientes .....	45
Tabela 7. Caracterização molecular das variantes patogênicas encontradas nos Controles .....	49
Tabela 8. Relação dos genes mutados e tipo de mutação nos pacientes com desenvolvimento normal do CP .....	81

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	15
1.1 CÂNCER DE PÊNIS .....	15
1.2 EPIDEMIOLOGIA .....	15
1.3 FATORES DE RISCO .....	16
1.4 ESTADIAMENTO.....	17
1.5 APRESENTAÇÃO CLÍNICA E TRATAMENTO .....	19
1.6 PROBLEMAS FUNCIONAIS, SOCIAIS E EMOCIONAIS .....	20
1.7 MARCADORES MOLECULARES E O CÂNCER.....	21
2. JUSTIFICATIVA .....	23
3. OBJETIVOS .....	25
3.1 OBJETIVO GERAL .....	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	27
4.1 DESENVOLVIMENTO DO PROJETO .....	27
4.2 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	27
4.3 ASPECTOS ÉTICOS.....	27
4.4 COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS .....	28
4.5 MICRODISSECÇÃO .....	28
4.6 EXTRAÇÃO DO DNA .....	29
4.7 VERIFICAÇÃO INICIAL DA QUALIDADE DAS AMOSTRAS DE DNA .....	29
4.8 DIAGNÓSTICO MOLECULAR HPV 16 E 18.....	29
4.9 PREPARO DA BIBLIOTECA GENÔMICA.....	30
4.10 SEQUENCIAMENTO DO EXOMA .....	34
4.11 ANÁLISE BIOINFORMÁTICA DO SEQUENCIAMENTO DE EXOMAS .....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA GERAL DOS PACIENTES.....	37
5.2 RESULTADO DO SEQUENCIAMENTO .....	40
5.3 DESCRIÇÃO DAS VARIANTES POR AMOSTRA ( <i>ONCOPRINT</i> ) .....	41
5.4 PACIENTES DESTACADOS .....	50
5.5 GENES EM DESTAQUE .....	50
5.6 RESULTADO MOLECULAR DO HPV 16 E HPV 18.....	60
5.6.1 PACIENTE 2424 .....	61
5.6.2 PACIENTE 435 .....	68
5.6.3 PACIENTE 439.....	70

5.6.4 PACIENTE 453 .....	75
5.6.5 PACIENTE 457 .....	78
5.6.6 PACIENTES 2425, 2426, 433, 437, 443, 455, 459 .....	81
5.6.7 CONTROLES .....	83
5.7 PAINEL GENÉTICO.....	83
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	86
6.1 LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	86
7. CONCLUSÕES .....	89
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	91
9. ANEXOS .....	104

# Introdução

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 CÂNCER DE PÊNIS

O câncer é o resultado de mutações genéticas de causas multifatoriais, altamente complexas e variáveis podendo apresentar características específicas conforme o tipo celular e tecido ao qual ele esteja envolvido.

Muitas são as vias que uma célula com seu material genético mutado pode tomar, podendo ou não entrar em apoptose para manter a homeostasia do tecido, ou, ativar vias que mantêm o funcionamento caótico, desestabilizando o microambiente celular proporcionando o crescimento desenfreado agora com funções e genoma diferentes das células normais (FOUAD; AANEI., 2017; HANAHAN; WEINBERG., 2010 e 2011).

O processo cancerígeno é caracterizado pelo crescimento desenfreado destas células, e a aquisição de características que permitem que as mesmas proliferem e se espalhem para os diferentes tecidos e órgãos do corpo humano é denominado metástase.

Dos diferentes tipos de neoplasias malignas que afetam a população masculina, o Câncer de Pênis (CP) é um dos que se destacam pelo seu alto índice de letalidade.

O CP é um tumor raro, sendo o tipo histológico mais comum o Carcinoma epidermóide, que responde por aproximadamente 95% dos casos relatados (ROON; HORENBLAS; NIEWEG, 2005; BLEEKER et al., 2008; CHAUX et al., 2010). O CP está intimamente ligado a hábitos de higiene e, conseqüentemente é mais prevalente em regiões com baixo nível sócio econômicos como a América latina, a África e a Ásia. (PARKIN et al., 2002).

## 1.2 EPIDEMIOLOGIA

Além de sua baixa prevalência, o CP é uma neoplasia ligada a países com baixo índice sócioeconômico, onde muitas vezes não existem banco de dados de registros de câncer organizados. Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), foram notificadas 402 mortes em 2015; 408 em 2016; 444 em 2017 devido ao CP (INCA 2019).

Estimativas pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) apontam que em 2020 são estimados 36.230 novos casos e cerca de 15.938 mortes em todo o mundo devido ao CP (WHO 2019).

Dados compilados da literatura sobre CP, tanto no Brasil quanto em outros países, são muitas vezes antigos e provenientes de algumas coortes e de estudos retrospectivos. Essa carência de dados pode ser devido a sua raridade em países desenvolvidos assim como pela baixa notificação ou dificuldade de diagnóstico pelos centros de saúde em todo o mundo (COELHO et al., 2018).

No Brasil, o CP representa cerca de 2 a 6% dentre todos os tipos de cânceres que afetam o sexo masculino, sendo mais frequente nas regiões Norte (3,0%) e Nordeste (6,3%) (DILLNER et al., 2000; INCA., 2019; FAVORITO et al., 2008; ARYA et al., 2013; DO COUTO et al., 2014). Em regiões com alto padrão econômico do Brasil e em países desenvolvidos como os EUA e da União Européia, o CP responde por 0,5 e 1,5% dentre todos os tumores malignos que acometem os homens (GOODMAN et al., 2007; ARYA et al., 2013; SIEGEL; MILLER; JEMAL., 2019; FERLAY et al., 2019).

### **1.3 FATORES DE RISCO**

Vários fatores de risco têm sido atribuídos a gênese do CP. O tabagismo, hábitos sexuais (múltiplos parceiros; zoofilia), a infecção genital pelo papiloma vírus humano (principalmente os subtipos 16 e 18) são os fatores de risco mais destacados, já as inflamações crônicas do pênis (balaopostites; líquen esclero-atrófico e balanite xerofítica obliterante) também estão estabelecidas como lesões pré malignas do órgão genital masculino (PIZZOCARO et al., 2009; BEZERA et al., 2001; POW-SANG; ASTIGUETA., 2010; MICALI et al., 2006; FICARRA et al., 2010).

Outro fator de risco importante é a fimose, definida como um anel fibroso que impossibilita a exposição da glande e conseqüentemente a higiene adequada. Já foi demonstrado, em regiões de baixo desenvolvimento socioeconômico, que homens não circuncidados apresentam maior risco de CP (D'HAUWERS et al., 2012). Muitos desses pacientes apresentavam acúmulo de esmegma que resultou no desenvolvimento do líquen esclero-atrófico, lesão esta considerada pré-maligna (D'HAUWERS et al., 2012; BASU; MONDAL; KELA., 2017).

Acredita-se que a postectomia precoce exerça fator protetor no aparecimento do CP, no entanto, apesar da diminuição da prevalência em indivíduos circuncidados, o mesmo não se encontra totalmente fora de risco. (BASU; MONDAL; KELA., 2017). Sendo necessário a realização de higiene diária com o intuito de se evitar o acúmulo de agentes irritantes que possam resultar no aparecimento do CP (BERK et al., 2010).



Barnes et al, demonstraram a associação da obesidade com o aparecimento do CP (BARNES et al., 2013, 2016). A obesidade é considerada fator de risco para diversas neoplasias, tal fato baseia-se no processo inflamatório crônico, estresse oxidativo e regulação de vias de sinalização de insulina que resultam do acúmulo exagerado de gordura (BROMAGE; CRUMP; PEARCE., 2008; BASEN-ENGQUIST; CHANG., 2011). Além dos aspectos moleculares, os pacientes obesos apresentam maior dificuldade para realizar a higiene peniana.

Um dos fatores de risco mais estudado do CP é a infecção pelo Papiloma Virus Humano (HPV). O HPV tem sido associada ao câncer de orofaringe, cervical e peniano (MUNHOS et al., 2003; DOUGLAWI; MASTERSON., 2019).

O HPV possui vários subtipos, no entanto o HPV 16 e 18 estão mais relacionados ao risco de aparecimento dos tumores de colo de útero, orofaringe, ânus, vulva e pênis (SCHIFFMAN et al., 2007; MIRALLES-GURI et al., 2009; SPIESS et al., 2016)

O mecanismo de ação do HPV no câncer de pênis ainda não está completamente elucidado, no entanto, a agressividade conferida a célula tumoral pode ser mediada por dois oncogenes virais, o E6 e E7, que são ativados em células infectadas pelo HPV. Um dos alvos do oncogene E6 é a proteína p53, enquanto que o E7 tem como alvo principal a rb1. A ligação de E6 e E7 aos seus alvos inativa os produtos de genes supressores de tumorais, sendo ambos reguladores negativos da proliferação celular, resultando no crescimento celular descontrolado (POW-SANG; ASTIGUETA., 2009; FLAHERTY et al., 2014).

Apesar do HPV ser um fator de risco para diversas neoplasias, não podemos relacionar diretamente o CP ao HPV, pois vários pacientes portadores de CP os mesmos não estão infectados pelo HPV. Diferentemente do câncer cervical, onde Hausen colaboradores em 1990 detectaram a presença do HPV em 100% dos pacientes portadores dessa neoplasia (Apud KAYES et al.,2007).

Levando-se em conta os fatores de risco; campanhas de orientação de hábitos de higiene e comportamento sexual, aliados a realização da circuncisão, podem ajudar na redução do CP (FONSECA et al., 2010).

#### **1.4 ESTADIAMENTO**

O estadiamento dos tumores tem por finalidade catalogar os diferentes estágios das neoplasias. Tal classificação auxilia o melhor planejamento terapêutico, indica o prognóstico e subsidia pesquisas longitudinais (BLACK; BASHIR., 1998).

A classificação do CP é realizada pelo sistema TNM (Tumor, Node, Metastases). O sistema TNM fornece informações importantes sobre a extensão local, a presença de linfonodos acometidos e a presença de lesões a distância. Aliado aos aspectos anatômicos, informações histológicas como o tipo celular, o grau de diferenciação celular, a invasão da túnica albugínea e a presença de invasão linfovascular são fundamentais também pois influenciam diretamente as condutas médicas a serem tomadas (SOLSONA et al., 2004). A última atualização do sistema TNM para o CP foi realizada pela *American Cancer Society* em 2018 (tabela 1)

**Tabela 1. Sistema TMN para estadiamento do câncer de pênis**

<b>Estágio AJCC</b>	<b>Grupos</b>	<b>Descrição*</b>
<b>0 (0is ou 0a)</b>	<b>Tis ou Ta N0 M0</b>	Também chamado carcinoma in situ ou CIS. O tumor está apenas na camada superior da pele e não se aprofundou (Tis ou Ta). O câncer não se espalhou para os linfonodos próximos (N0) ou para partes distantes do corpo (M0).
<b>I</b>	<b>T1a N0 M0</b>	O tumor cresceu em tecido logo abaixo da camada superior da pele. Não cresceu em vasos sanguíneos, vasos linfáticos ou nervos próximos e não é de alto grau (nota 3) (T1a). O câncer não se espalhou para os linfonodos próximos (N0) ou para partes distantes do corpo (M0).
<b>IIA</b>	<b>T1b N0 M0</b>	O tumor cresceu em tecido logo abaixo da camada superior da pele. Cresceu em vasos sanguíneos, vasos linfáticos ou nervos próximos e / ou é de alto grau (nota 3) (T1b). O câncer não se espalhou para os linfonodos próximos (N0) ou para partes distantes do corpo (M0).
	<b>OU</b>	
	<b>T2 N0 M0</b>	O câncer cresceu para o corpo esponjoso (uma câmara interna que percorre a parte inferior e a glândula). O câncer não se espalhou para os linfonodos próximos (N0) ou para partes distantes do corpo (M0).
<b>IIB</b>	<b>T3 N0 M0</b>	O câncer cresceu no corpo cavernoso (uma das duas câmaras internas que se estendem ao longo da parte superior da haste do pênis). O câncer não se espalhou para os linfonodos próximos (N0) ou para partes distantes do corpo (M0).
<b>IIIA</b>	<b>T1-T3 N1 M0</b>	O tumor cresceu em tecido abaixo da camada superior da pele e pode ter crescido no corpo esponjoso e / ou no corpo cavernoso (T1 a T3). O câncer se espalhou para 1 ou 2 linfonodos inguinais próximos da

		virilha, do mesmo lado do corpo (N1). Não se espalhou para partes distantes do corpo (M0).
<b>IIIB</b>	<b>T1-T3 N2 M0</b>	O tumor cresceu em tecido abaixo da camada superior da pele e pode ter crescido no corpo esponjoso e / ou no corpo cavernoso (T1 a T3). O câncer se espalhou para 3 ou mais gânglios linfáticos inguinais próximos do mesmo lado do corpo ou para gânglios inguinais dos dois lados do corpo (N2). Não se espalhou para partes distantes do corpo (M0).
<b>IV</b>	<b>T4 Qualquer N M0</b>	O tumor cresceu em estruturas próximas, como escroto, próstata ou osso púbico (T4). O câncer pode ou não ter se espalhado para os linfonodos próximos (qualquer N). Não se espalhou para partes distantes do corpo (M0).
	OU	
	<b>Qualquer T N3 M0</b>	O tumor pode ou não ter crescido em camadas mais profundas do pênis ou estruturas próximas (qualquer T). O câncer se espalhou para os linfonodos próximos na pelve ou cresceu fora de um linfonodo para o tecido circundante (N3). O câncer não se espalhou para partes distantes do corpo (M0).
	OU	
	<b>Qualquer T Qualquer N M1</b>	O tumor pode ou não ter crescido em camadas mais profundas do pênis ou estruturas próximas (qualquer T). O câncer pode ou não ter se espalhado para os linfonodos próximos (qualquer N). O câncer se espalhou para partes distantes do corpo (M1).

\* As seguintes categorias adicionais não estão listadas na tabela acima:

- TX: O tumor principal não pode ser avaliado devido à falta de informação.
- T0: Não há evidência de um tumor primário.
- NX: Os linfonodos regionais não podem ser avaliados devido à falta de informação.

(FONTE: UICC | Leading the global fight against cancer, " [s.d.]

## 1.5 APRESENTAÇÃO CLÍNICA E TRATAMENTO

O CP se origina do epitélio, parte interna do prepúcio ou da glândula. Aparece como uma lesão superficial, que pode progredir para vegetações ou ulcerações podendo invadir ou não os corpos cavernosos, o corpo esponjoso e a uretra.

A forma de apresentação do CP no Brasil foi avaliada em um estudo onde com 230 casos. O tamanho da lesão variou de 0,3 cm a 15 cm, acometendo com maior frequência a glândula e o prepúcio (70% dos casos), em aproximadamente 15% dos

pacientes a doença envolvia todo o pênis. As regiões inguinais não apresentavam gânglios palpáveis em 57% dos pacientes (KOIFMAN et al., 2011).

O CP, se não tratado nos seus estágios iniciais pode ser muito agressivo e acarretar grande morbidade, tanto pela doença em si quanto pelo tratamento. A abordagem para as lesões planas e o carcinoma *in situ* baseia-se na quimioterapia / imunoterapia tópica ou ablação a laser (PIZZOCARO et al., 2009). Entretanto, lesões vegetantes ou ulceradas são melhores tratadas através da ressecção cirúrgica (FICARRA et al., 2010). A penectomia parcial, total, ou até mesmo a emasculação são procedimentos frequentemente utilizados, entretanto causam grande impacto na autoestima e qualidade de vida dos pacientes. (RIPPENTROP et al., 2004).

A disseminação metastática ocorre pelas vias hematogênica e linfática. Ocorrem frequentemente metástases para a cadeia ganglionar inguinal superficial e profunda e para os gânglios pélvicos (DEWIRE; LEPOR., 1992). A disseminação para os pulmões, fígado, ossos e cérebro é menos frequente, aparecendo raramente na ausência do acometimento linfonodal (BADALAMENT et al., 1992).

A presença da doença metastática nos linfonodos ainda é o principal fator prognóstico relacionado à sobrevida (SOLSONA et al., 2004). O risco de envolvimento linfonodal é estimado através de variáveis como o tamanho, o padrão de crescimento, a profundidade de invasão das camadas teciduais, a espessura tumoral, a presença de margens cirúrgicas positivas, o tipo histológico, o grau de diferenciação celular, a detecção de invasão perineural e a presença de invasão linfovascular, sendo este último o critério mais importante (HEYNS et al., 2010; FICARRA et al., 2010; ORNELLAS et al., 2008).

Um fato a lamentar é que na maioria das vezes o paciente se apresenta com doença localmente avançada devido à falta de recursos médicos e a vergonha em procurar atendimento (POMPEO; BILLIS., 2003).

## **1.6 PROBLEMAS FUNCIONAIS, SOCIAIS E EMOCIONAIS**

O pênis é um órgão com conotação social forte ligado à masculinidade, a força e a capacidade reprodutiva, a ausência física ou funcional deste órgão pode trazer consequências arrasadoras. Quando submetido a penectomia parcial ou total, devido à perda das características estéticas, das alterações na função sexual e miccional, muitas vezes problemas psicológicos se impõem, podendo resultar no aumento da ansiedade, depressão, levando até ao suicídio, logo o acompanhamento psicológico se torna

necessário quando cirurgias mutilantes são indicadas (MADDINENI; LAU; SANGAR., 2009; YU et al., 2016; AUDENET; SFAKIANOS., 2017; SIMPSON et al., 2017).

## 1.7 MARCADORES MOLECULARES E O CÂNCER

A busca por marcadores moleculares capazes de prever o risco de aparecimento, comportamento biológico e resposta a terapia, tem sido exaustiva. A descoberta dos mecanismos moleculares envolvidos na gênese de diversos tumores tem propiciado diagnósticos mais precoces e melhora na eficiência dos procedimentos a serem tomados (LOPES et al., 2002), não somente servem como fatores de predição do comportamento tumoral.

Alguns exemplos comparativos são válidos para entender a amplitude destas descobertas. A mutação no gene *VHL*, que é um gene supressor tumoral, encontrada no desenvolvimento de tumores renais (RINI et al., 2009; SATO et al., 2013). A presença de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* que quando presentes aumentam o risco de aparecimento do câncer de mama e próstata (KING et al., 2003; FORD et al., 1998).

Estudos moleculares e genéticos do CP revelaram vários potenciais marcadores para esta doença (CUBILLA et al., 2010; BARZON et al., 2014). A proteína p53, o antígeno de células escamosas (*SCC-ag*), a proteína p16, INK4a, o Ki-67, a E-caderina e o MMP-9; foram avaliados como biomarcadores, entretanto ainda não se estabeleceu o real papel destes nas inúmeras facetas envolvidas nos processos de carcinogênese e disseminação do CP (LOPES et al., 2002; ZHU et al., 2007; MUNEER et al., 2009).

Alguns outros estudos demonstraram que mutações que causam a desregulação das vias gênicas de *PI3K* e *PTEN* podem afetar diretamente a progressão do CP, bem como mutações nas vias de *HRAS* e *KRAS*, também são alteradas no carcinoma epidermóide de pênis, sugerindo que são vias importantes no desenvolvimento desta doença (ANDERSON et al., 2008).

Com os avanços das técnicas de sequenciamento, ocorreu uma revolução na forma de investigar os mecanismos moleculares relacionados com o surgimento e evolução dos tumores. Saímos de um olhar pontual para uma escala logarítmica (genômica). O volume de dados gerados pelos principais consórcios científicos (TCGA e ENCODE) permitiu, com base em assinaturas gênicas, um refinamento da classificação dos estágios tumorais e o melhor entendimento das vias envolvidas na gênese e progressão tumoral. Tais informações possibilitam identificar novos biomarcadores de diagnóstico e prognóstico de diferentes neoplasias (RODNEY et al., 2015).

**Justificativa**

## 2. JUSTIFICATIVA

Por ser uma doença que pouco acomete os países desenvolvidos, o CP é pouco estudado se comparado a outros tipos de tumores sólidos como o de próstata, rim, bexiga e mama. A carência de estudos com abordagem genômica no CP é o principal fator que motivou a realização do nosso trabalho. Uma investigação global dos genes alterados no CP pode fornecer informações inéditas as quais poderão contribuir para a melhor compreensão dos fatores genéticos envolvidos com a gênese e progressão do CP

# Objetivos



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o exoma do carcinoma epidermóide de pênis, visando identificar uma assinatura de genes mutados que possam estar envolvidos na gênese ou progressão desta neoplasia.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- I.** Identificar vias gênicas afetadas por mutações em seus membros relacionadas com o CP; e fazer um comparativo com os controles
- II.** Verificar a presença de algum padrão nos genes mutados em pacientes
- III.** Identificar os genes mais mutados nos pacientes e nos controles
- IV.** Sugerir painel genético de prognóstico do CP.

# Material e Métodos

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 DESENVOLVIMENTO DO PROJETO**

Os experimentos e análises foram realizados no Laboratório de Urologia e biologia molecular localizados no Centro de Cirurgia Experimental da FMRP/USP juntamente com os laboratórios de Genética Molecular e Bioinformática do Departamento de Genética da FMRP/USP, no Centro Regional de Hemoterapia e Hematologia de Ribeirão Preto (Hemocentro), e Centro de Medicina Genômica localizado no Hospital das Clínicas (CMG-HC-RP) USP/RP.

### **4.2 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS**

Foram selecionadas amostras congeladas de 12 pacientes portadores de CP que foram submetidos a cirurgia para a remoção do tumor no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP). O grupo controle foi constituído por 6 indivíduos os quais foram submetidos a postectomia no Hospital Estadual de Ribeirão Preto.

**Critérios de inclusão Pacientes:** homens maiores de 18 anos com diagnóstico confirmado de CP de células escamosas, submetidos a cirurgia (penectomia parcial ou total), não submetidos a nenhum tratamento neoadjuvante (quimioterapia ou radioterapia)

**Critérios de inclusão Controles:** homens maiores de 18 anos sem diagnóstico de câncer de pênis, sem histórico de doenças venéreas ou quaisquer lesões que pudessem alterar o tecido prepucial, submetidos à postectomia estética e/ou funcional.

A escolha da utilização de tecido de pênis de controles com tecido normal, ao invés do sangue periférico dos pacientes foi justamente para determinar as características genômica encontrada em um mesmo microambiente o que possibilita obter dados de uma região “saudável” exposta a fatores ambientais semelhantes ao tecido tumoral.

### **4.3 ASPECTOS ÉTICOS**

Visando o cuidado e respeito ético com os participantes do estudo e ainda baseando-se nas diretrizes de regulamentação às pesquisas com seres humanos, as amostras, assim como a criação do biorrepositório foram aprovados pelo Comitê de ética

em pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo FMRP-USP relativo aos processos 1.909.052/2016 (ANEXO A) no qual também autorizou a pesquisa sem a necessidade do Termo de consentimento livre e Esclarecido (TCLE)(ANEXO B) de amostras biopreservadas devido à dificuldade de precisar a localização dos pacientes e, também, porque não seria necessário a identificação ou pós coleta e contato com os pacientes que foram apenas numerados sem nomes. Os novos pacientes após esclarecidos sobre a pesquisa e após aceitarem a participação, assinaram o TCLE autorizando a coleta e o uso do material a ser coletado.

#### **4.4 COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS**

O estudo incluiu amostras previamente coletadas, que estavam armazenadas no biorrepositório do laboratório de Urologia da FMRP-USP sob responsabilidade do Prof. Dr. Rodolfo Borges dos Reis; e também amostras recém coletadas, no centro cirúrgico do Hospital das Clínicas da FMRP-USP, com tempo de isquemia não superior a três minutos. O procedimento cirúrgico foi realizado pela uma equipe de profissionais médicos da Divisão de Urologia. Após a retirada da peça cirúrgica, a mesma foi imediatamente congelada em isopentano resfriado em nitrogênio líquido e em seguida foram armazenadas no biorrepositório da Divisão de Urologia da FMRP – USP em freezer -80°C. As amostras foram então transferidas para o biorrepositório criado para o atual projeto. Vale ressaltar que tanto as amostras já existentes quanto às novas, foram coletadas e submetidas aos mesmos procedimentos desde o início até o fim de sua utilização, a fim de evitar divergências no processamento e nos resultados.

#### **4.5 MICRODISSECÇÃO**

Cortes histológicos do tumor foram obtidos em criostato a -22°C. Cortes consecutivos com 10µm de espessura foram micro dissecados, sendo que uma amostra (lâmina) foi corada pela hematoxilina e eosina (HE) servindo como guia. Em seguida as lâminas restantes foram analisadas por um médico patologista para análise do grau de diferenciação celular e diagnóstico histológico. Confirmado o diagnóstico e apontado como células diferenciadas e tumorais, o tecido foi então encaminhado para a extração do DNA.

#### 4.6 EXTRAÇÃO DO DNA

O DNA utilizado foi extraído dos fragmentos de tecidos congelados previamente confirmados como tumorais. As extrações foram realizadas utilizando o Kit AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal da Qiagen (Qiagen, Venlo, Netherlands), seguindo as instruções estabelecidas pelo protocolo do fabricante.

#### 4.7 VERIFICAÇÃO INICIAL DA QUALIDADE DAS AMOSTRAS DE DNA

As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro *nanodrop* (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, USA) onde foram verificadas a presença de contaminações por proteínas e/ou reagentes e a quantidade de material. Posteriormente aplicou-se 50 ng de DNA em gel de agarose 1,5% para verificar sua integridade.

#### 4.8 DIAGNÓSTICO MOLECULAR HPV 16 E 18

A investigação da presença do HPV subtipos 16 e 18 foram feitas através da ampliação do DNA genômico pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional. Foi utilizado o kit Taq Pol Master Mix 2x Green (Cellco Biotec, São Carlos, Brasil) que continha em uma única solução (master mix), a enzima DNA polimerase, os dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), KCL, MgCl<sub>2</sub>, corante, tampão de carregamento e estabilizante. Foi então seguido o protocolo do fabricante para a reação.

Tabela 2. Primers usando na reação de PCR para detecção do HPV 16 e 18

Genótipo	Sequência	Amplicon (bp)
HPV-16 F	5'-AGAACTGCAATGTTTCAGGACCCACAG-3'	120
HPV-16 R	5 'TCTGCAACAAGACATACATCGACCGG-3'	
HPV-18 F	5'-TGAGGATCCAACACGGC-3'	120
HPV-18 R	5'-CCTCTGTAAGTTCCAATACTGTC-3'	

Foram preparadas amostras distintas em relação ao primer de HPV; uma para o HPV 16 e outra utilizando os primers do HPV18.

Após preparado o *mix* do PCR o programa utilizado no termociclador foi o seguinte: desnaturação inicial (95°C por 2 minutos), 33 ciclos de desnaturação (95°C por 1 minuto), anelamento (55°C por 1 minuto), alongação (72°C por 1 minuto) e alongação final (72°C por 7 minutos).

Ao fim dos ciclos, as amostras, controles de corrida e controles da PCR (controle positivo usou-se uma amostra positiva para HPV16 e HPV18, controle negativo usou-se água) foram aplicadas em gel de agarose 1,5% (Sigma Aldrich, St Louis, EUA), imerso em tampão TAE (Tris, Ácido Acético, EDTA) e contendo intercalante de DNA *SYBR™ Safe* (Invitrogen, California, EUA) em diluição 1:10.000. As amostras foram então submetidas a corrida em eletroforese para separação das bandas a 100v por 30 minutos. Após a corrida, o gel foi revelado em foto documentador *ChemiDoc™ MP* (Bio-Rad, Berkeley, California, EUA) com o uso do software *image Lab v5.2* desenvolvido pela mesma empresa.

#### 4.9 PREPARO DA BIBLIOTECA GENÔMICA

As bibliotecas foram geradas utilizando o kit da Illumina, Nextera Exome Enrichment (Illumina Inc.San Diego, CA, USA) onde foram seguidas as instruções estabelecidas no protocolo do fabricante. O sequenciamento foi feito através do equipamento HiSeq1000(Illumina Inc.San Diego, CA, USA). O kit faz a captura de 62mb do genoma equivalente ao exoma total humano e é constituído por onze passos:

##### 1) Fragmentação do DNA, ligação e tagmentação de adaptadores.

Inicialmente uma enzima fragmenta o DNA genômico das amostras e adiciona adaptadores nas extremidades permitindo que esse DNA seja amplificado por PCR nos próximos passos.

Neste passo as amostras são diluídas para conter 50ng de DNA genômico, a fragmentação e a tagmentação ocorre a partir da adição de 25µL de *Tagment DNA Buffer* e 15µL de *Tagment DNA Enzyme*. As amostras foram então homogeneizadas e centrifugadas a 1800RPM por 1 minuto. Após a centrifugação as amostras foram incubadas a 58°C por 10 minutos e após esse tempo adicionado 15µL de *StopTagment Buffer*. As amostras foram novamente homogeneizadas e centrifugadas e permaneceram 5 minutos incubadas em temperatura ambiente.

##### 2) Limpeza dos produtos da fragmentação e tagmentação.

As amostras foram purificadas utilizando 65µL de *Sample Purification Beads*, que são *beads* magnéticas que ajudam na limpeza de produtos indesejados. Após adição das *beads* e homogenização, as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por aproximadamente 10 minutos e em seguida por mais 1 minuto em uma raque magnética.

Lentamente o sobrenadante foi retirado e adicionado 200µL de etanol 80% para lavagem da amostra. Após incubado por 1 minuto em temperatura ambiente, o etanol foi retirado e lavado novamente com etanol 80%. Após 1 minuto, o etanol foi novamente retirado e as amostras permaneceram na raque para secagem da amostra. Após 10 minutos, foram acrescentados 22µL de tampão de ressuspensão e o DNA foi incubado em temperatura ambiente novamente por 5 minutos.

### 3) Primeira amplificação

Após a tagmentação, 20µL da amostra foi utilizada para uma reação de amplificação por PCR, onde foram adicionados os “Index” que são pequenas sequências utilizadas para a identificação das amostras durante o sequenciamento.

Para isto, 5µL do Index 1 e 2 foram adicionados na amostra juntamente com 20µL de Nextera Library Amplification Mix. O produto foi homogeneizado e centrifugado a 1200RPM por 2 minutos. Em seguida a amostra foi submetida a PCR usando o seguinte programa: 72°C por 3 minutos, 98°C por 30 segundos, 72°C por 5 minutos, esta primeira programação durou cerca de 10 ciclos.

### 4) Limpeza do produto amplificado por PCR

Após a reação de PCR, foi adicionado 90µL de *beads* às amostras e foram homogeneizadas e incubadas por 10 minutos e em seguida por 1 minuto em raque magnética. Em seguida foi retirado o sobrenadante e o material foi novamente lavado com 200µL de etanol 80%, incubado por 1 minuto sobre raque magnética, retirado o sobrenadante, e incubado novamente até a secagem das *beads*.

Posteriormente o material foi ressuspendido com tampão de ressuspensão, incubado por 2 minutos a temperatura ambiente. Foi retirado 25µL de sobrenadante e utilizado para quantificação pelo método fluorimétrico (Qubit)

### 5) Hibridização 1

Nesta parte do processo, a biblioteca foi hibridizada com sondas responsáveis pela captura das regiões alvo, no nosso caso, os exons. As amostras então foram combinadas em “*Pool*” de 8 amostras cada uma com seus *Index* e foram adicionados 50µL de *Enrichment Hybridization Buffer* + 10µL de *Expanded Exome Oligos* em cada *Pool*. Os *Pools* foram então incubados em termociclador a 95°C por 10 minutos, seguido de ciclos de 1 minuto onde cada ciclo a temperatura diminui 2°C até chegar a 58°C onde permaneceu *overnight* por 16 horas.

#### 6) Captura 1

Após as 16 horas as amostras foram retiradas do termociclador e foram adicionadas a elas 250µL de Streptavidin Magnetic *Beads*, que são *beads* marcadas com streptavidina que vai selecionar as regiões de interesse. Os *pools* foram então homogeneizados e incubados a temperatura ambiente por 25 minutos. Foi então colocado em raque magnética e incubado por mais dois minutos, após a incubação o sobrenadante foi descartado. As amostras então foram lavadas com 200µL de *Enrichment Wash Solution* e homogeneizados.

Foram então incubados por aproximadamente 30 minutos a 50°C e posterior colocado em raque magnética por mais 2 minutos e em seguida descartado o sobrenadante. Foi então adicionado uma solução de *Enrichment Elution Buffer* e NaOH num total de 30µL onde foi homogeneizado e incubado em raque magnética por 1 minuto. Foram então retirados 21µL do sobrenadante e adicionado junto de 4µL de *Elute Target Buffer 2*.

#### 7) Hibridização 2

vide passo 5

#### 8) Captura 2

vide passo 6

\*A repetição dos passos de hibridização e captura fornece um melhor resultado e uma alta especificidade das regiões capturadas.

#### 9) Limpeza das bibliotecas



Sucedendo os passos de hibridização e captura, foram adicionados 45µL de *Sample Purification Beads* a aos *pools*. Em seguida foram incubados em temperatura ambiente por 10 minutos e mais dois minutos na raque magnética.

O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 200µL de etanol 80% para limpeza, após incubados por 30 segundos, o sobrenadante novamente foi removido e repetido esta etapa de lavagem. O etanol então foi retirado e as amostras incubadas em raque magnética por 10 minutos ou até as *beads* secarem por completo. Foi então adicionado 27,5µL de tampão de ressuspensão e homogeneizado. Após incubadas por 2 minutos em raque magnética, foi transferido então 25µL do sobrenadante para um novo tubo.

#### 10) Segunda Amplificação

Depois de purificada, a biblioteca foi amplificada por PCR convencional. Foram adicionados aos *pools* 20µL de *Nextera Enrichment Amplification Mix* e 5µL de PCR Primer Mix. As amostras então foram colocadas em termociclador por 98°C por 30 segundos, 12 ciclos de 98°C por 10 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, 72°C por 5 minutos e 10°C ∞.

#### 11) Limpeza do produto amplificado da PCR

Após o processo de PCR as amostras foram retiradas e adicionados 90µL de *Sample Purification Beads*. Depois de homogeneizadas, as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos e mais dois minutos em raque magnética. O sobrenadante foi retirado e foi feita a lavagem com etanol 80% por duas vezes. O sobrenadante foi retirado e as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos até secarem as *beads*. O DNA então foi ressuspendido em 32µL de tampão de ressuspensão. As amostras então foram incubadas em temperatura ambiente por 2 minutos e mais dois em raque magnética. Foram então transferidos 30µL do sobrenadante para outro tubo que foi então submetido ao procedimento do exoma

#### 4.10 SEQUENCIAMENTO DO EXOMA

A utilização de sondas de 95 pb foi responsável pela captura dos 62Mb citados acima, que representa a quantidade de exomas totais de cada amostra.

A primeira etapa do sequenciamento do exoma é a clusterização das amostras, onde ocorre uma amplificação dos clusters, linearização e a hibridização dos primers em uma *flow cell*. Nessa fase os fragmentos de DNA da amostra são incorporados a superfície da *flow cell* onde contém oligonucleotídeos capazes de amplificar o DNA gerando os clusters propriamente dito.

Após a clusterização as amostras foram incluídas em *Flow Cells*, para seguir o processo do sequenciamento, este processo é todo automatizado e permite uma alta confiabilidade devido a robustez do equipamento. O sequenciamento foi feito de maneira *paired-end* (2x50 ciclos) no equipamento illumina NextSeq o qual utiliza a tecnologia Solexa (*Sequencing by synthesis* - SBS) que permite uma leitura em grande escala simultânea das sequências de nucleotídeos de milhões de fragmentos de DNA. Esta leitura é baseada na terminação da síntese da cadeia de DNA após a detecção de um sinal de fluorescência, ou seja, é detectado a clivagem do nucleotídeo marcado possibilitando a adição de um próximo nucleotídeo. Este processo acontece várias vezes na *flow cell*, e permite uma leitura base a base eliminando assim possíveis erros em repetições de mesma base. Como os nucleotídeos contém bases com fluoróforos, a imagem das leituras é registrada em tempo real por *softwares* específico que possibilita a construção das sequências com uma alta confiabilidade.

Todo o procedimento foi feito de acordo com o protocolo e recomendação do fabricante.

#### 4.11 ANÁLISE BIOINFORMÁTICA DO SEQUENCIAMENTO DE EXOMAS

Os dados brutos gerados foram avaliados quanto a qualidade do sequenciamento, utilizando os softwares FastQC (versão 0.11.5) e MultiQC (versão 1.8). Em seguida foi feito o alinhamento e mapeamento das reads no genoma referência (GRCh37), utilizando o software BWA (versão 0.7.15), com parâmetros padrão. O arquivo de mapeamento resultante foi pré-processado (adição de informações do sequenciamento, ordenação e construção de índice) com o programa Picard (versão 2.5.0). A seguir, foi feito um novo alinhamento em torno de indels e a recalibração de valores de score com o programa

GATK (versão 3.6-0). O GATK também foi utilizado para realizar a chamada de variantes, com os módulos Haplotype Caller e Genotype GVCF seguido da recalibração dos scores e aplicação de filtros para a seleção de variantes com alta confiabilidade (GATK). As variantes identificadas foram anotadas com o programa SnpEff (versão 4.2) e scripts Perl desenvolvidos *in-house*. Todas as etapas foram executadas como descrito no manual de boas práticas de chamada de variantes (Van der Auwera et al. 2018)

As variantes chamadas, foram anotadas e tabuladas utilizando o SnpEff, em seguida, com a lista de genes para os quais as variantes foram anotadas, utilizou-se o banco de dado do COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer) (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) para explorar o impacto de mutações somáticas em diferentes tipos de cânceres. Nessa etapa, foram filtrados apenas os genes encontrados mutados nas nossas amostras que estavam relacionados com outros tipos de cânceres, além do tumor de pênis. Além disso, as variantes foram filtradas quanto à patogenicidade pelo CADD (CADD>10) e pelos seguintes preditores, SIFT, Polyphen, UMD, Provean e LRT, além das variantes filtradas pelo SnpEff já citado acima.

# Resultados e Discussão

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DA GERAL DOS PACIENTES

Foram utilizadas amostras de tecido de 12 pacientes diagnosticados com carcinoma epidermóide de pênis os quais foram submetidos a cirurgia para exérese do tumor primário no HCFMRP-USP. A identificação das amostras de tecido tumoral seguiu o padrão utilizado pelo bio-repositório da Divisão de Urologia (Tabela 3). Todos possuíam o tipo histológico classificado como carcinoma de células escamosas (critério de inclusão). Este tipo histológico é descrito na literatura como o mais frequente, presente em 95% dos casos (KROON; HORENBLAS; NIEWEG et al., 2005; BLEEKER et al., 2009; CHAUX et al., 2013). Adotamos como critério de inclusão a presença de tumores de células escamosas com o intuito de homogeneizar a amostra.

Foram usadas como controle 6 amostras de tecido obtidas de indivíduos submetidos a postectomia. Os indivíduos do grupo controle possuíam hábitos saudáveis de vida, declarando não serem tabagistas e nem etilistas. As amostras de tecido do grupo controle foram identificadas como: TNP1-164, TNP2-165, TNP3-166, TNP4-167, TNP5-168 e TNP6-169 (Tabela 3).

**Tabela 3. Nomenclatura adotada para pacientes e controles**

PACIENTES	CONTROLES
2424	TNP1-164
2425	TNP2-165
2426	TNP3-166
433	TNP4-167
435	TNP5-168
437	TNP6-169
439	
443	
453	
455	
457	
459	

A idade dos pacientes no momento do diagnóstico variou entre 33 a 81 anos, onde a média e a mediana de idade se igualaram em 57,5 anos evidenciando que a doença pode aparecer em pacientes numa ampla faixa etária, diferente de alguns outros tipos de cânceres, que aparecem com a progressão da idade. No caso do CP, sendo os fatores

de risco irritativos fundamentais para a sua gênese, o tempo de exposição aos mesmos torna-se mais importante do que a idade dos pacientes.

A classificação étnica, cor autodeclarada, da amostra foi dividida entre caucasianos 58,33% (7), afro-brasileiros 25,0% (3) e mulatos 16,67% (2) (Tabela 4).

Quando classificamos os hábitos dos pacientes, verificamos que 75% declararam ser tabagistas e 50% disseram fazer consumo de bebidas alcoólicas (Tabela 4).

Apesar de nossa amostra não possuir um tamanho significativo em relação aos dados sócio-demográficos, pudemos verificar uma maior quantidade de pacientes com presença do CP que faziam uso de tabaco.

Ao verificar os aspectos clínicos, foi observada a presença de lesões macroscópicas sugestivas de HPV em dois dos pacientes (435 e 453), no entanto o diagnóstico molecular foi positivo em apenas um destes pacientes (453). O paciente 2424, que não apresentava lesões macroscópicas sugestivas, se mostrou positivo a um dos tipos de HPV, quando seu DNA foi submetido ao exame molecular (Tabela 4).

Dos 12 pacientes, 33,33% (n=4) tiveram a presença de metástase inicialmente nos linfonodos, dois destes posteriormente apresentaram metástase óssea e pulmonar, e foram a óbito devido a agressividade da doença (Tabela 5).

Todos os pacientes foram submetidos a penectomia para a exérese do tumor primário. Em 11 pacientes, a cirurgia de escolha foi a penectomia parcial onde foram retirados o tumor e uma margem de segurança, no entanto, dois deles (435 e 453) tiveram necessidade da retirada total do órgão posteriormente. O paciente 439 que possuía um quadro mais avançado com infiltração perineural, invasão linfo-vascular (dados de biópsia), de toda a espessura da pele até a uretra prostática, foi submetido a penectomia total (Tabela 4).

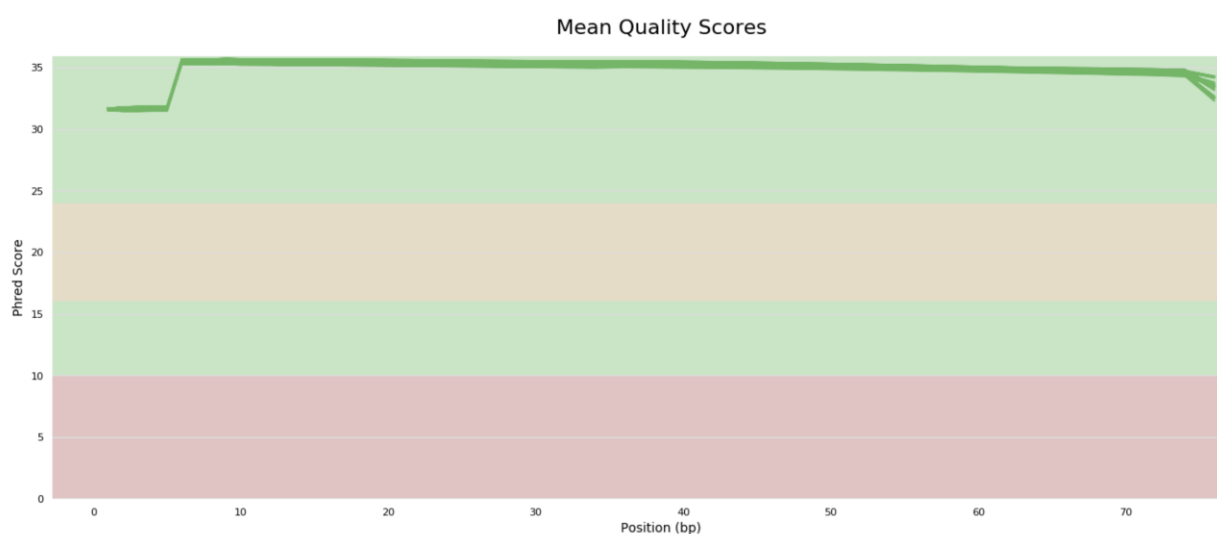
**Tabela 4. Principais informações clínicas, demográficas e sociais coletadas dos prontuários dos pacientes**

<b>Idade ao Diagnóstico (Mediana)</b>	33-81 (57,5)
<b>Etnia (autodeclarada)</b>	<b>Número de pacientes (%)</b>
Caucasiano	7 (58,33%)
Afro-brasileiro	3(25,00%)
Mulato	2(16,67%)
<b>Tabagista</b>	
Sim	9 (75,0%)
Não	3 (25,0%)
<b>Etilista</b>	
Sim	6 (50,0%)
Não	6 (50,0%)
<b>Diagnóstico molecular HPV 16</b>	
Positivo	2 (16,67%)
Negativo	10 (83,33%)
<b>Diagnóstico molecular HPV 18</b>	
Positivo	0 (0,0 %)
Negativo	12 (100,0%)
<b>Presença de Metástase</b>	
Positiva	4 (33,33%)
Negativa	8 (66,67%)
<b>Tipo da Cirurgia</b>	
Penectomia parcial	9 (75,00%)
Penectomia parcial seguida de total	2 (16,67%)
Penectomia Total	1 (8,33%)
<b>Paciente</b>	<b>TNM</b>
459	pT2
457	Não informado
455	Não informado
453	pT3 pN1 pMx

443	pT2 pNX pMx
439	pT3 pN3 pMX
437	T1N0
435	T3NX
433	T2NX
2426	pT1b, pN2
2425	pT1a , pN0
2424	pT1 pN2 pMx
<b>Nº de óbitos</b>	<b>2</b>

## 5.2 RESULTADO DO SEQUENCIAMENTO

O exoma de todas amostras foi realizado para a pesquisa de mutações nas regiões codificadoras dos genes associados ao CP. Este método permite, caso não se encontre variantes patogênicas em algum gene de interesse, ampliar a pesquisa a outros genes ainda não relacionados ao tumor de interesse. A figura 1 mostra um gráfico com a qualidade base-a-base do sequenciamento dos milhares de "reads" (sequências lidas) realizado na plataforma NextSeq da Illumina. A análise mostra que o valor de qualidade (*PhredScore*) ficou em torno  $Q > 35$  ou seja, a confiabilidade de as bases estarem corretas passam de 99,9% de confiança.



**Figura 1 - Descrição da média de qualidade por base das reads de 75 nucleotídeos.**

\*Os valores de *PhredScore* acima de 20 são considerados de boa qualidade.



A tabela 5 apresenta a média de outros parâmetros da qualidade do sequenciamento, como: %CG, número de sequências e % de duplicação das *reads* estão demonstramos na tabela 6. Pelos parâmetros analisados, observamos que o sequenciamento teve uma leitura robusta e uma alta confiabilidade dos dados. Também se verificou que a cobertura média das amostras foi de 50x.

**Tabela 5. Características do sequenciamento**

AMOSTRA	MÉDIA %GC	MEDIA MILHÕES SEQUÊNCIA	MÉDIA DE % DUPLICAÇÃO
164TNP1	46%	10.5	19,30%
165TNP2	44%	5.7	14,00%
166TNP3	45%	7.4	15,40%
167TNP4	44%	6.9	15,30%
168TNP5	45%	7.5	15,40%
169TNP6	45%	7.4	15,40%
2424	44%	7.0	14,90%
2425	45%	7.1	15,50%
2426	45%	8.8	16,40%
433	44%	7.1	15,50%
435	44%	6.8	15,30%
437	44%	3.5	11,70%
439	45%	6.3	14,40%
443	45%	7.6	15,70%
453	44%	6.9	16,00%
455	45%	8.2	15,70%
457	45%	6.2	13,20%
459	45%	7.4	15,70%

### 5.3 DESCRIÇÃO DAS VARIANTES POR AMOSTRA (*ONCOPRINT*)

Após o sequenciamento do exoma e o processamento dos dados, foram analisados 719 genes da plataforma COSMIC, uma base de dados relacionados com câncer (Sondka Z, et al. 2018). Desse total, foram filtrados 31 genes que apresentaram variantes detectadas como potencialmente patogênicas pelos preditores (SIFT, Polyphen, UMD, Provean, LRT, CADD). A figura 2 descreve o *oncoprint* com o resumo das variantes mais relevantes do presente estudo.

Com exceção dos genes *PABPC1* e *MUC16*, que estão mais alterados nos pacientes, acometendo 78% e 67% da amostra respectivamente, e o gene *KAT6B*, todos os outros genes apresentavam variantes com potencial patogênico apenas nos pacientes. A ausência de variantes com potencial patogênico nos indivíduos controles sugere uma investigação mais minuciosa do papel desses genes na tumorigênese do CP

Por exemplo, os genes *JAK2*, *ATM* e *TP53*, sabidamente envolvidos com a progressão de vários tumores, estão alterados em dois pacientes com tumor metastático que foram a óbito (Figura 2). Vale salientar que o paciente 439 apresenta alteração nos genes *ATM* e *TP53* (Figura 2), além de ser caracterizado, segundo classificação TNM, como pT3 pN3 pMX.

Apesar do número pequeno de amostras analisadas no presente estudo, os genes *TP53*, *NOTCH1*, *NOTCH2*, *USP6* e *KRAS* estão entre os 20 genes mais mutados em amostras de câncer de pênis na base de dados do COSMIC (Figura 2). Dos três genes mais mutados no nosso trabalho, o gene *SIRPA* tem registro no COSMIC de mutação em 100 amostras mutadas, sendo 36 delas com a mesma mutação p.Leu96HisfsTer14, encontrada na amostra 2424 da nossa coorte de pacientes (Tabela 7). Este paciente foi a óbito e apresentava tumor metastático aliada a mutação no gene *JAK2*. Vale a pena investigar se a combinação dos dois genes mutados tem relação com a agressividade do tumor. Essa sugestão pode ser estendida ao paciente 439, que apresenta mutação nos genes *TP53* e *ATM*, e apresentou o mesmo desfecho clínico. Como subsídio para esta hipótese, foi feita uma análise de interação proteína: proteína (PPI) comparativa para gerar circuitos gênicos entre os genes mutados nos pacientes 2424 e 439. Os achados revelaram que os dois genes mencionados acima, em cada um dos pacientes, apresentam interação o que pode estar resultando na perda de regulação mais acentuada das vias de sinalização celular, contribuindo decisivamente para o desfecho clínico observado (Figura 4A e 4B). Já o paciente 2424, além dos genes *SIRPA* e *JAK2*, os genes *NOTCH1* e o *MUC16* também pertencem ao mesmo circuito gênico (Figura 4A). No caso do paciente 439, os genes *NOTCH2* se junta ao *TP53* e *ATM* (Figura 4B). Essas duas observações reforçam ainda mais o papel desses genes na agressividade dos dois casos.

Para saber se os circuitos gênicos descritos para os pacientes (Figura 4A e 4B) estão presentes em alguma via gênica relacionada com câncer, nós realizamos o enriquecimento de vias usando a plataforma online WebGestalt (*WEB-based Gene Set AnaLysis Toolkit*) descrita por Liao et al. (2019) (Figura 5). A análise foi feita com a lista dos 31 genes mutados nos pacientes da nossa coorte. A figura 5 destaca as 10 vias gênicas mais enriquecidas, com destaque para a via do papilomavírus, que pode estar relacionada com a evolução clínica do paciente 2424 e a via de microRNA em câncer, relacionado com o paciente 439 (Figuras 3, 4 e 5)

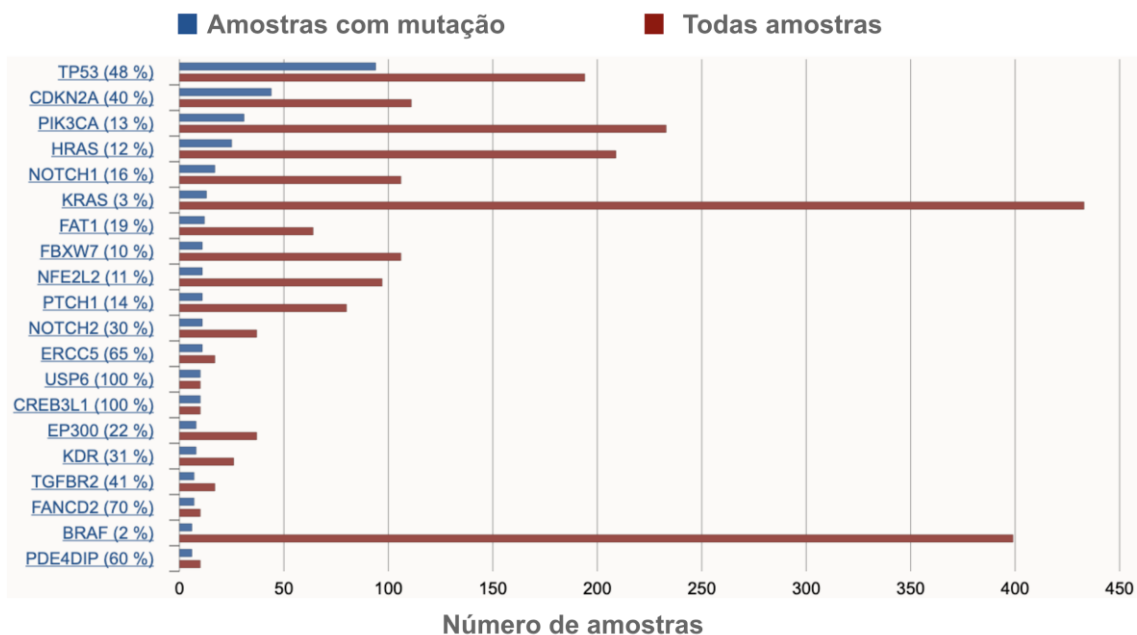


Figura 2. Lista dos 20 genes mais mutados em câncer de pênis. Gráfico modificado da plataforma COSMIC.

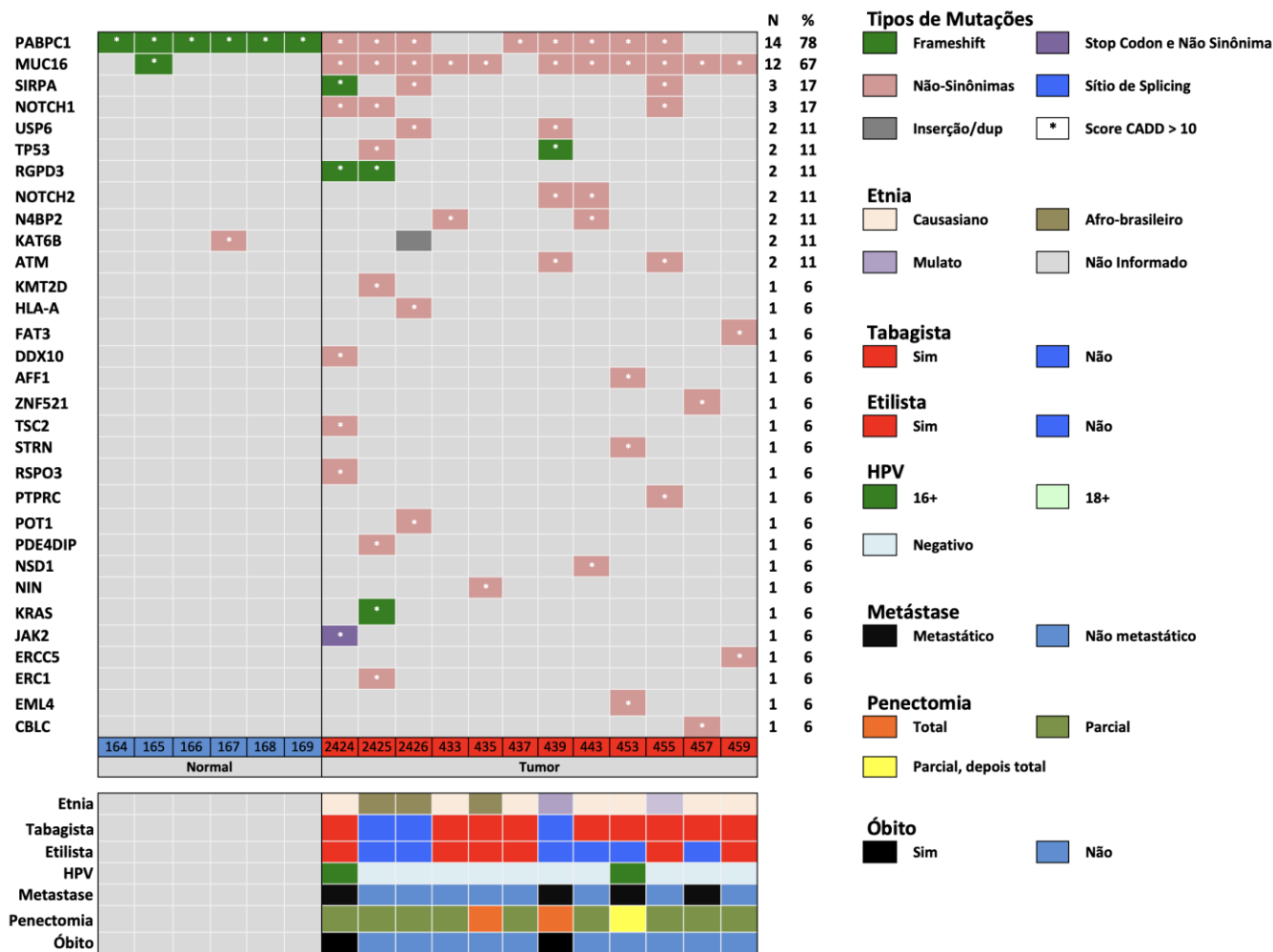


Figura 3. Oncoprint demonstrando os genes mutados em relação a cada paciente.

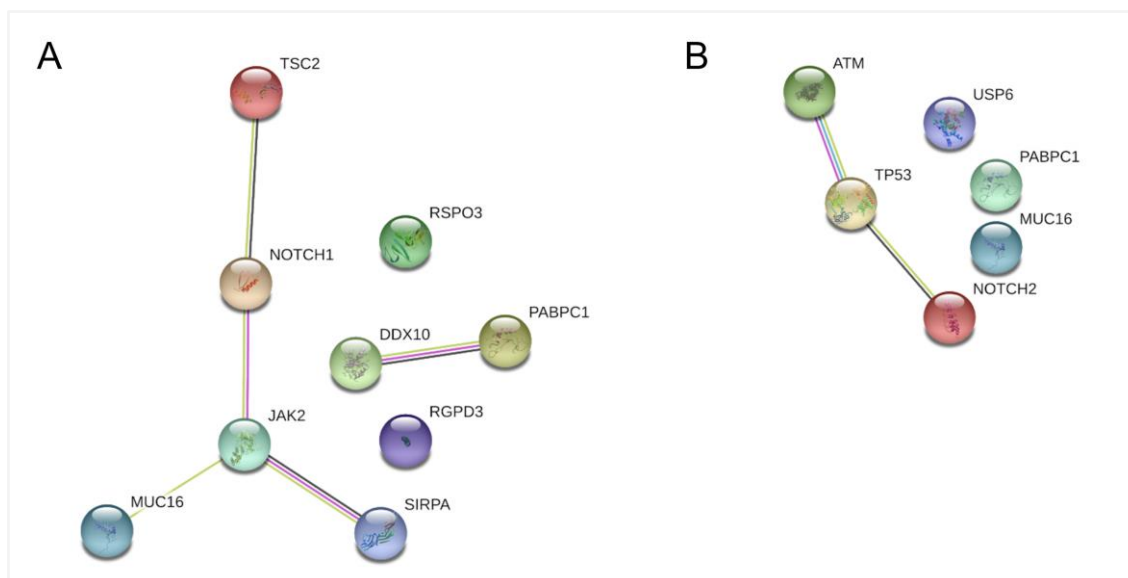


Figura 4. Análise de PPI comparativo dos pacientes A) 2424 e B) 439.

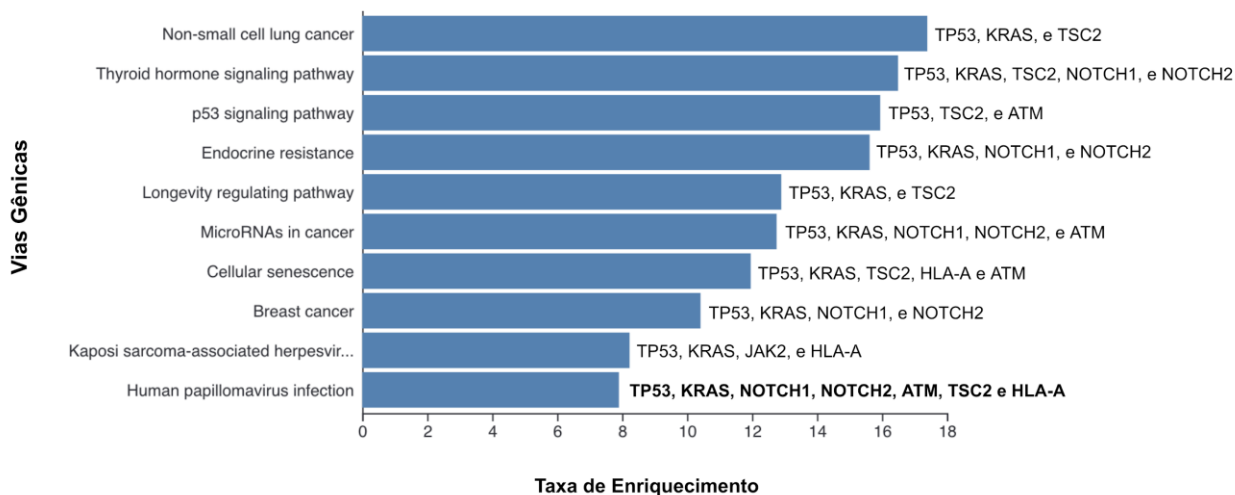


Figura 5. Análise de enriquecimento de vias gênicas usando a lista dos 31 genes mutados nos pacientes da nossa coorte. A análise foi realizada na plataforma WebGestalt (Liao et al. 2019)

Tabela 6. Caracterização molecular das variantes patogênicas encontradas nos pacientes

Gene	Descrição	N	Pos. Nucleot.	Pos. Am. Acido	dbSNP ID	PROVEAN	SIFT	POLYPHEN HDIV
PABPC1	poly(A) binding protein, cytoplasmic 1	3	c.1752G>A	p.Met584Ile	rs112868101	Deleterious	Damaging	Probably damaging
		5	c.1735G>A	p.Gly579Ser	rs78407297	Deleterious	Damaging	Probably damaging
		1	c.1685T>C	p.Leu562Ser	rs80006036	Deleterious	Damaging	Probably damaging
		2	c.1672C>G	p.Gln558Glu	rs75035099	Deleterious	Damaging	Probably damaging
		3	c.1516C>T	p.Arg506Cys	rs62513921	Deleterious	Damaging	Probably damaging
		1	c.1361T>C	p.Ile454Thr	rs72681439	Neutral	Damaging	Benign
		1	c.1205C>T	p.Pro402Leu	rs139094790	Deleterious	Damaging	Benign
		3	c.1120C>T	p.Arg374Cys	rs200409148	Deleterious	Damaging	Probably damaging
		6	c.1115A>G	p.Glu372Gly	rs201076736	Deleterious	Damaging	Probably damaging
		4	c.1093G>T	p.Val365Leu	rs202074479	Deleterious	Damaging	Probably damaging
		7	c.691A>G	p.Lys231Glu	rs140835766	Deleterious	Damaging	Probably damaging
		2	c.619C>T	p.Leu207Phe	rs200538577	Deleterious	Tolerated	Probably damaging
		1	c.541G>A	p.Ala181Thr	rs201575415	Neutral	Tolerated	Possibly damaging
		MUC16	mucin 16, cell surface associated	1	c.42004C>T	p.Leu14002Phe	rs3752141	Neutral
2	c.41869C>A			p.Gln13957Lys	rs3764556	Deleterious	Damaging	Benign
1	c.40754C>G			p.Thr13585Ser	rs75266616	Neutral	Tolerated	Possibly damaging
1	c.40666G>A			p.Asp13556Asn	rs756428204	Deleterious	Tolerated	Probably damaging
3	c.40654A>C			p.Thr13552Pro	rs868660041	Deleterious	Damaging	Probably damaging
8	c.40312A>G			p.Asn13438Asp	rs78327556	Deleterious	Damaging	Possibly damaging
2	c.40000C>A			p.Leu13334Met	rs76660617	Neutral	Damaging	Probably damaging
1	c.39790C>A			p.His13264Asn	rs78831402	Deleterious	Tolerated	Possibly damaging
2	c.39511C>T			p.Leu13171Phe	rs1235718134	Deleterious	Damaging	Probably damaging
1	c.38824C>A			p.Gln12942Lys	-	Neutral	Damaging	Benign
2	c.37658C>A			p.Thr12553Asn	rs112467181	Neutral	Damaging	Probably damaging
1	c.37436A>G			p.Glu12479Gly	rs201453310	Deleterious	Damaging	Probably damaging
1	c.35663C>G			p.Thr11888Arg	rs61746392	Deleterious	Damaging	Possibly damaging

USP6	ubiquitin specific peptidase 6 (Tre-2 oncogene)	4	c.33461C>T	p.Ser11154Phe	rs10417600	Deleterious	Tolerated	Probably damaging
		1	c.26393C>T	p.Ser8798Leu	rs114396204	Deleterious	Damaging	Possibly damaging
		1	c.7618A>C	p.Thr2540Pro	rs28595701	Neutral	Damaging	Probably damaging
		1	c.5857T>C	p.Ser1953Pro	rs1108380	Neutral	Damaging	Possibly damaging
		1	c.1244G>A	p.Cys415Tyr	rs61740308	Deleterious	Damaging	Possibly damaging
SIRPA	signal-regulatory protein alpha	1	c.202C>T	p.Arg68Trp	rs201674756	Neutral	Tolerated	Probably damaging
		1	c.2735G>A	p.Arg912Gln	rs9899177	Neutral	Tolerated	Probably damaging
		1	c.140C>T	p.Ala47Val	rs767147511	Deleterious	Tolerated	Probably damaging
		1	c.145G>A	p.Glu49Lys	rs755263241	Deleterious	Damaging	Benign
NOTCH1	notch 1	2	c.319C>A	p.Arg107Ser	rs17855615	Deleterious	Tolerated	Probably damaging
		1	c.287_288delTC	p.Leu96HisfsTer14	rs749337996	-	-	-
		1	c.3905G>T	p.Arg1302Leu	sem rs	Deleterious	Damaging	Possibly damaging
TP53	tumor protein p53	1	c.5572A>C	p.Met1858Leu	rs779337715	Neutral	Tolerated	Benign
		1	c.796_824dupGGACGGAACAGCTTTGAGGTGCGTGTTTG	p.Cys275fs	sem rs	-	-	-
KMT2D	lysine (K)-specific methyltransferase 2D	1	c.818G>A	p.Arg273His	rs28934576	Deleterious	Damaging	Probably damaging
		1	c.14929C>T	p.Pro4977Ser	rs1212938842	Deleterious	Tolerated	Possibly damaging
RGPD3	RANBP2-like and GRIP domain containing 3	2	c.3826_3830delAGCCC	p.Ser1276fs	rs771658117	-	-	-
NOTCH2	notch 2	2	c.6806G>T	p.Gly2269Val	rs1553193512	Deleterious	Damaging	Possibly damaging
		2	c.57C>G	p.Cys19Trp	rs11810554	Deleterious	Tolerated	Benign
N4BP2	NEDD4 binding protein 2	2	c.302G>T	p.Ser101Ile	rs17511668	Deleterious	Damaging	Possibly damaging
		1	c.352G>A	p.Glu118Lys	rs61748746	Deleterious	Damaging	Possibly damaging
		1	c.1831G>A	p.Asp611Asn	rs794001	Neutral	Tolerated	Benign
KMT2D	lysine (K)-specific methyltransferase 2D	1	c.4059T>G	p.Ser1353Arg	rs61748749	Neutral	Tolerated	Benign
		1	c.14929C>T	p.Pro4977Ser	rs1212938842	Deleterious	Tolerated	Possibly damaging
KAT6B	K(lysine) acetyltransferase	1	c.4097_4105dupAAGAGGAAG	p.Glu1366_Glu1368dup	rs375513122	-	-	-

6B								
HLA-A	major histocompatibility complex, class I, A	1	c.41C>T	p.Ser14Leu	rs2230954	Neutral	Tolerated	Probably damaging
		1	c.238G>A	p.Gly80Arg	rs1059449	Deleterious	Damaging	Possibly damaging
FAT3	FAT atypical cadherin 3	1	c.8263A>G	p.Ile2755Val	rs3847531	Neutral	Tolerated	Benign
		1	c.11434A>G	p.Ser3812Gly	rs4753069	Neutral	Tolerated	Benign
DDX10	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 10	1	c.688A>G	p.Met230Val	rs774518222	Deleterious	Damaging	Probably damaging
ATM	ataxia telangiectasia mutated	2	c.5948A>G	p.Asn1983Ser	rs659243	Neutral	Tolerated	Benign
		1	c.8800A>G	p.Thr2934Ala	rs746351323	Deleterious	Damaging	Probably damaging
		1	c.2746G>A	p.Val916Met	sem rs	Neutral	Tolerated	Benign
AFF1	AF4/FMR2 family, member 1	1	c.1842A>C	p.Lys614Asn	rs779981897	Deleterious	Damaging	Probably damaging
ZNF521	zinc finger protein 521	1	c.953G>A	p.Ser318Asn	sem rs	Neutral	Tolerated	Benign
TSC2	tuberous sclerosis 2	1	c.4911G>C	p.Lys1637Asn	sem rs	Deleterious	Damaging	Probably damaging
STRN	striatin, calmodulin binding protein	1	c.887A>T	p.Glu296Val	rs898678627	Deleterious	Damaging	Possibly damaging
RSPO3	R-spondin 3	1	c.83G>T	p.Arg28Met	sem rs	Deleterious	Damaging	Probably damaging
PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	1	c.2696A>T	p.Glu899Val	sem rs	Deleterious	Damaging	Probably damaging
POT1	protection of telomeres 1	1	c.363G>C	p.Lys121Asn	rs1473942617	Neutral	Damaging	Probably damaging
PDE4DIP	Phosphodiesterase 4D interacting protein	1	c.6316G>A	p.Glu2106Lys	rs150109646	Neutral	Damaging	Probably damaging
		1	c.6007C>T	p.Arg2003Cys	rs1620560	Deleterious	Damaging	Probably damaging
		1	c.5632G>T	p.Ala1878Ser	rs1698605	Neutral	Damaging	Probably damaging
		1	c.3607G>A	p.Ala1203Thr	rs1698647	Neutral	Damaging	Probably damaging
		1	c.2453G>A	p.Arg818His	rs1629011	Deleterious	Tolerated	Probably damaging
		1	c.2018G>C	p.Ser673Thr	rs1747930	Neutral	Damaging	Probably damaging
		1	c.1640A>T	p.Glu547Val	rs1061308	Deleterious	Damaging	Probably damaging

		1	c.485G>T	p.Arg162Leu	rs1664022	Deleterious	Damaging	Probably damaging
		1	c.424C>A	p.Leu142Ile	rs77741369	Neutral	Damaging	Probably damaging
NSD1	nuclear receptor binding SET domain protein 1	1	c.3389A>G	p.Glu1130Gly	rs113856002	Deleterious	Damaging	Probably damaging
NIN	ninein (GSK3B interacting protein)	1	c.3959G>A	p.Gly1320Glu	rs2073347	Neutral	Tolerated	Benign
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	1	p.Cys186fs	c.555dupA	rs1222388629	-	-	-
JAK2	Janus kinase 2	1	c.526G>T	p.Glu176*	rs1006828127	-	-	-
		1	c.1711G>A	p.Gly571Ser	rs139504737	Deleterious	Tolerated	Probably damaging
ERCC5	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 5	1	c.2636A>G	p.Asn879Ser	rs4150342	Deleterious	Tolerated	Possibly damaging
		1	c.3157G>C	p.Gly1053Arg	rs9514066	Neutral	Damaging	Possibly damaging
ERC1	ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 1	1	c.2969A>G	p.Asn990Ser	rs545884646	Neutral	Damaging	Probably damaging
		1	c.3106A>G	p.Thr1036Ala	rs12319376	Neutral	Tolerated	Benign
EML4	echinoderm microtubule associated protein like 4	1	c.804G>C	p.Glu268Asp	sem rs	Neutral	Damaging	Probably damaging
		1	c.880A>G	p.Lys294Glu	rs6736913	Neutral	Tolerated	Benign
		1	c.1177A>G	p.Ile393Val	rs10202624	Neutral	Tolerated	Benign
CBLC	Cbl proto-oncogene C, E3 ubiquitin protein ligase	1	c.1417C>G	p.Pro473Ala	rs1418606115	Neutral	Damaging	Benign



**Tabela 7. Caracterização molecular das variantes patogênicas encontradas nos Controles**

<b>Gene</b>	<b>Descrição</b>	<b>N</b>	<b>HGVS_C</b>	<b>HGVS_P</b>	<b>dbSNP ID</b>	<b>PROVEAN</b>	<b>SIFT</b>	<b>POLYPHEN HDIV</b>
PABPC1	poly(A) binding protein, cytoplasmic 1	6	c.467_468insG	p.Met158fs	-	-	-	-
MUC16	mucin 16, cell surface associated	1	c.40674_40677delAAGC	p.Lys13558fs	rs746055260	-	-	-
KAT6B	K(lysine) acetyltransferase 6B	1	c.2495A>T	p.Asn832Ile	-	Deleterious	Damaging	Probably damaging

## 5.4 PACIENTES DESTACADOS

Dentro de nossa amostra total de 12 pacientes e 6 controles, foram destacados 5 pacientes devido a características específicas: os que apresentaram doença local agressiva, submetidos a penectomia total (435, 439 e 453); os infectados pelo HPV (453 e 2424); os que tiveram metástase (439, 453, 457 e 2424) ou faleceram da doença (439 e 2424). Os outros pacientes nos serviram de base para um quadro de progressão linear do CP.

## 5.5 GENES EM DESTAQUE

Quando olhamos os genes mutados nos pacientes diferenciais verificamos a ocorrência de mutações nos genes; *TP53*, *SIRPa*, *NOTCH 1 E 2*, *JAK2*, *EML*, *DDX10*, *ATM*, *USP6*, *CBLC*, *STRN*, *TSC2*, *RGPD3* E *RSPO3* que são importantes em várias patologias, estando envolvidos em vias relacionadas ao câncer (Tabela 6). Entretanto, muitos ainda não foram relacionados ao CP.

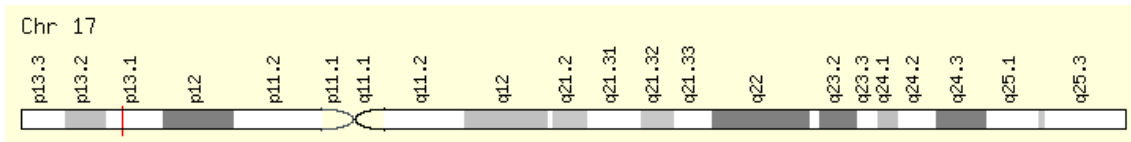
### ***TP53***

Conhecido como *gatekeeper* o gene *TP53* é um dos mais importantes quando se fala em câncer. Mapeado em 17p13.1 e com 12 exons, codifica a proteína p53, que possui domínios de ligação essenciais para a atividade transcricional (CATHERWOOD et al., 2019).

A proteína p53, através de dois domínios de transativação, se liga fortemente a várias seqüências específicas de DNA (BRADY et al., 2010).

A função da p53 é controlar a proliferação celular em resposta ao estresse celular, como dano ao DNA e ativação de oncogenes. Quando ativados, os níveis de proteína p53 ativando o processo de apoptose ou reparo do DNA (CATHERWOOD et al., 2019; CLARKE et al., 1993).

Desta forma o gene *TP53* age como um supressor de tumor quando em estado normal, mas, se mutado, pode perder sua função supressora e contribuir para o aparecimento de vários tipos de neoplasias.



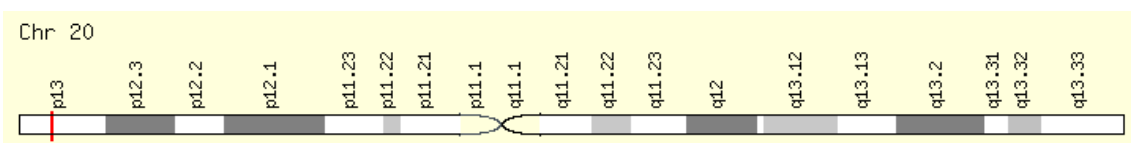
**Figura 6. Localização do gene *TP53*** (Fonte GeneCard)

### ***SIRPa***

Localizado no cromossomo 20p13 contendo 12 exons, o gene *SIRP* produz uma proteína de membrana plasmática expressa principalmente por células mielóides. A ligação da proteína *SIRP $\alpha$*  com alguns receptores de membrana causam inibição das atividades celular, resultando em redução da fagocitose por macrófagos e menor produção do fator de necrose tumoral (OKAZAWA et al., 2004; SMITH et al., 2003).

Alguns estudos demonstram que esse gene tem papel na organização citoesquelética mediada por integrinas, sendo que defeitos na proteína codificada podem levar a perda da homeostase celular contribuindo para o surgimento do câncer (INAGAKI et al., 2000; OSHIMA et al., 2002).

O gene *SIRPa* é muito estudado em alguns tipos de tumor como o câncer de mama, tumores hematopoiéticas, e tumores sólidos, quando se estuda a ligação da proteína do *SIRPa* com a proteína CD47, a mesma modula muitas ações celulares em células hematopoiéticas, incluindo ativação plaquetária, migração e adesão, adesão de leucócitos, produção de citocinas e capacidade de resposta às células T45 (BARCLEY; MARION., 2006; TAKENAKA et al., 2007; WILLINGHAM et al., 2012; YAO et al., 2017; NAGAHARA et al., 2010).



**Figura 7. Localização do gene *SIRPa*** (Fonte GeneCard)

## NOTCH1 E 2

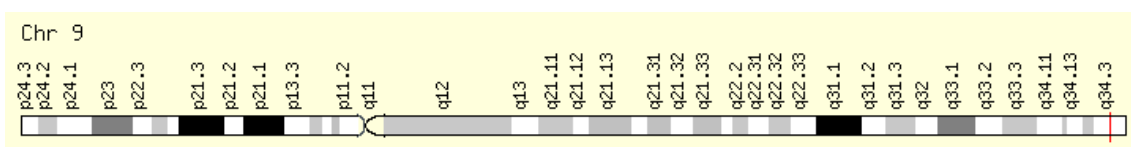
O gene *NOTCH1* está localizado no braço longo do cromossomo 9, mapeado como 9q34.3, contendo 34 exons. O gene *NOTCH2* se encontra no braço curto do cromossomo 1, mapeado em 1p12, e também possuindo 34 exons.

Os genes *NOTCH* pertencem a uma família de receptores transmembranares (*NOTCH1*, 2, 3 e 4) que regulam a diferenciação, proliferação e invasão celular. A sinalização aberrante através de cada um dos receptores *NOTCH* tem sido associada a numerosos tipos de câncer. A via *NOTCH* representa um alvo atraente para novos fármacos (RANGANATHA et al., 2011; ANDERSSON et al., 2011; KATOH., 2007).

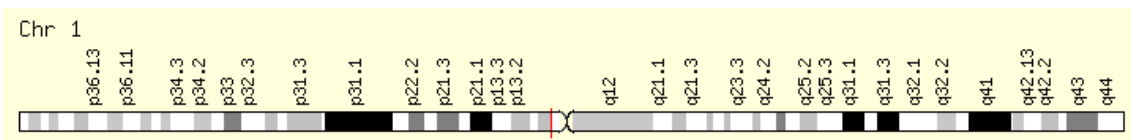
O estudo de Hayashi et al (2016) revelou que a ativação do *NOTCH2* se correlacionou com parâmetros adversos ao câncer de bexiga apresentando um pior prognóstico.

Verificado mutação do *NOTCH1* e 2 in situ e em culturas celulares de CP, as mutações encontradas foram de vários tipos. Entretanto, os genes da família *NOTCH* foram um dos mais acometidos (ZHOU et al., 2018)

Além de neoplasias do sistema nervoso central, também foram encontradas alterações no gene *NOTCH* em outros tumores, incluindo câncer de mama, meduloblastoma, câncer colorretal, carcinoma de pulmão (não pequenas células), melanoma e alguns tipos de leucemia (RANGANATHA et al., 2011; LOBRY; AIFANTIS., 2011).



**Figura 8. Localização do gene *NOTCH1*** (Fonte GeneCard)



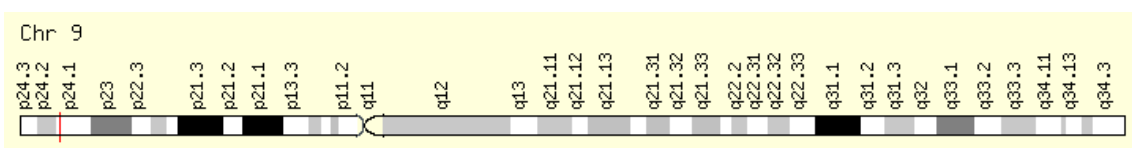
**Figura 9. Localização do gene *NOTCH2*** (Fonte GeneCard)

## **JAK2**

O gene *JAK* contém 26 exons e é um gene localizado em 9p24.1, e são de uma família de tirosina quinases citoplasmáticas envolvidas na via de sinalização *JAK-STAT*, sendo essenciais para manter a hematopoiese normal. Codifica para um receptor predominantemente responsivo a ligantes de citocina tipo I, incluindo eritropoietina, trombopoietina e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos. A ligação do ligante ao *JAK2* leva à auto fosforilação e ativação do *STAT* (transdutores de sinal e ativadores da transcrição) proteínas, que medeiam a expressão de genes envolvidos na hematopoese (SMITH; FAN., 2008; PATNAIK et al., 2010).

A ativação constitutiva de uma via de *JAK*, *JAK-STAT*, tem sido implicada na patogênese das neoplasias mieloproliferativas (SMITH; FAN., 2008; PATNAIK et al., 2010; VIZMANOS et al., 2006). A Janus quinase (*JAK*) é responsável pela ativação do *STAT3* quando estimulado por sinais extracelulares e *STAT* ativado promove a carcinogênese através da regulação de genes a jusante que codificam apoptose celular, ciclo celular, metástase e angiogênese (SMITH; FAN., 2008; PATNAIK et al 2010; VIZMANOS et al., 2006; XIONG et al., 2008; SCHINDLER; DARNELL., 1995).

Além de atuar nos processos inflamatórios e na indução hematopoiética de neoplasias mieloproliferativas, foi verificado a alteração no número de cópias de *JAK2*, em tumores epidermóides como o de pênis (ZHOU et al., 2018).

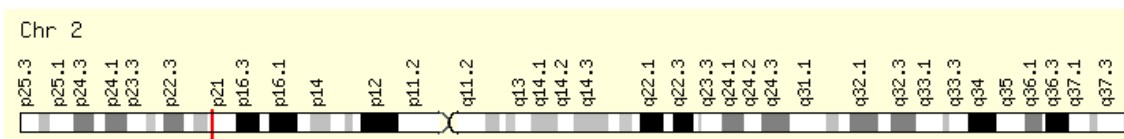


**Figura 10. Localização do gene *JAK2*** (Fonte GeneCard)

## ***EML***

O gene *EML* é um gene pertencente à família dos EMAP, que são genes que produzem proteínas ligadas a formação de microtúbulos durante a divisão celular. Nos humanos, essa família possui 6 genes (*EML1* a *EML6*) (EICHENMULLER et al., 2002).

Localizado no braço curto do cromossomo 2 (2p21), apresenta 26 exons, sendo conhecido em alguns tipos de tumor, principalmente neoplasias de pulmão, onde se encontra uma translocação de *EML4* com o gene *ALK*, formando a proteína de fusão *EML4-ALK*. Existem diversas mutações patogênicas neste gene, mas poucas ainda foram estudadas devido à grande importância dada a fusão (SODA et al., 2007; KOIYUNEN et al., 2008; SHIGEKI et al., 2015).



**Figura 11. Localização do gene *EML4*** (Fonte GeneCard)

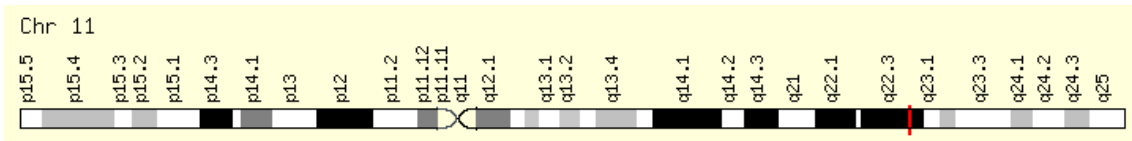
## ***DDX10***

O *DDX10* é um gene localizado no braço curto do cromossomo 11 (11q22–23), possui 18 exons, e pertence à família dos “DEAD box genes” que são genes codificantes de proteínas envolvidas na estrutura secundária de alguns RNAs, além de terem a função de helicase (GODBOUT et al., 2007; SCHMID; LINDER., 1992).

O *DDX10* está envolvido na translocação cromossômica associada à leucemia. A expressão ectópica da fusão com o gene *NUP98*, *NUP98-DDX10*, aumenta a proliferação e a propriedade de auto-renovação das células CD34 + humanas primárias e interrompe sua diferenciação eritróide e mielóide. A fusão *NUP98-DDX10* regula a transcrição de vários oncogenes, incluindo *MYCN* e *COX-2*. A mutação de *DDX10* diminuiu seu potencial de transformação e de ativação transcricional, apresentando um papel importante na oncogênese (YASSIN et al., 2010).

Estudos relacionados ao sequenciamento do genoma demonstraram a presença da fusão *DDX10* e *SKA3* no câncer de mama. Outros estudos utilizando RNA de interferência revelaram que o *DDX10* é um com potencial

cancerígeno, com impacto significativo no crescimento e proliferação de células mamárias malignas (JIAO et al., 2013).



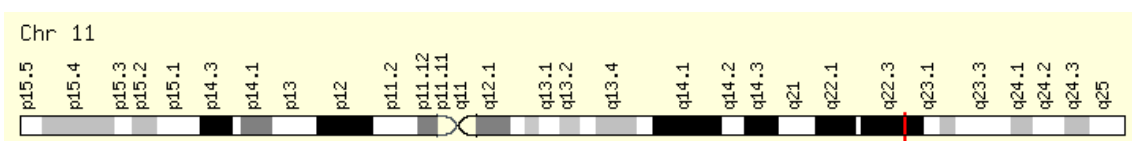
**Figura 12. Localização do gene *DDX10*** (Fonte GeneCard)

### ***ATM***

O Gene *ATM* está localizado no braço longo do cromossomo 11 (11q23), contém 69 exons, e produz uma proteína nuclear encontrado na maioria dos tecidos do corpo humano sendo responsável por participar de vários mecanismos importantes no ciclo celular (BOULTWOOD., 2001; YU et al., 2004). A proteína expressa pelo *ATM* está envolvida no controle do ciclo celular, recombinação mitótica, monitoramento do comprimento dos telômeros e resposta e reparo a danos no DNA (KHANNA., 2000).

A *ATM* e a p53 são duas proteínas que desempenham um papel importante na manutenção da integridade do genoma. Ambos cooperam na imposição do controle do ponto de verificação G1 e G2, sendo que a fosforilação dependente do *ATM* é diretamente responsável pela ativação do p53. Alterações nessas proteínas podem contribuir para um aumento da incidência de alterações genômicas, como deleções, translocações e amplificações, comuns durante a oncogênese (YU et al., 2004; MATEI et al., 2006).

Com essa vasta multifuncionalidade do gene *ATM*, observamos a presença do gene mutado em vários tipos de neoplasias, como nos tumores de pulmão, pênis, de mama e ovário (YANG et al., 2017; ROCHA et al., 2012; MEYN., 1999).



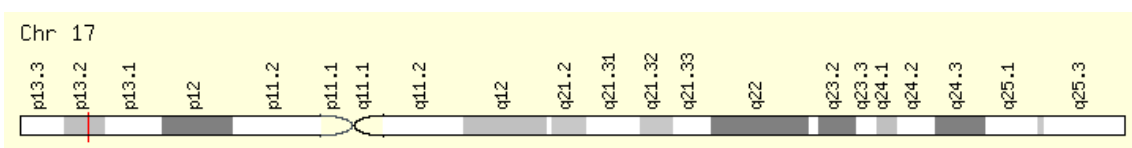
**Figura 13. Localização do gene *ATM*** (Fonte GeneCard)

## USP6

O *USP6* é um gene localizado no cromossomo no braço longo do cromossomo 17 (17p13.2), e possui 41 exons. Este gene que codifica uma proteína peptidase específica na ubiquitinação, ligado a doenças como fibromatose pseudossarcomatosa e fasciíte nodular, que são considerados tumores benignos. Seu rearranjo já foi estudado em tumores de vulva onde serviu de marcador para confirmação do tumor (SEKULIC., 2016; OLIVEIRA et al., 2004).

Além de tumores de vulva o rearranjo do *USP6* é muito estudado em cistos ósseos aneurismáticos onde novamente está associado ao rearranjo deste gene geralmente com o *MYH9*, onde a verificação do rearranjo faz confirmação para a doença (AMARY et al., 2013)

Em relação a carcinogênese, alguns estudos indicam que a desregulação das USPs desempenha papel no desenvolvimento de tumores, como o câncer de ovário, o câncer gástrico e o carcinoma hepatocelular (D'ARCY et al., 2014; CROSAS., 2014). Em seus mecanismos mais conhecidos o *USP6* inicia a tumorigênese através da indução da produção de metaloproteinases da matriz, seguida da NF-kB além de impulsionar o crescimento de neoplasias de enxerto através da ativação da via de sinalização Wnt (MADAN et al., 2016; ZENG et al., 2018).



**Figura 14. Localização do gene *USP6*** (Fonte GeneCard)

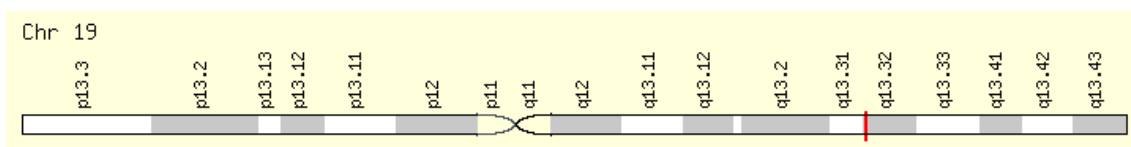
## CBLC

Cbl Proto-Oncogene C (*CBLC*) é um gene, composto por 13 éxons, localizado no braço longo do cromossomo 19 (19q13). As proteínas Cbl desempenham funções importantes na sinalização celular através da ubiquitinação e subsequente regulação negativa das tirosina-quinases. A expressão deste gene pode ser restrita a células epiteliais e foram observadas



variantes transcritas de "splicing" alternativo que codificam múltiplas isoformas desse gene (NAU; LIPKOWITZ., 2003; KEANE et al., 1999).

A expressão desregulada do *CBLC* prejudica todo o funcionamento celular, por regular a proliferação celular, mutações neste gene estão relacionadas aos tumores de mama, ao câncer cervical, e a outros tumores sólidos. O incremento do processo metastático também tem sido relacionado a mutações deste gene (WANG et al., 2016; LEE et al., 2018; DANIELS et al., 2019; HONG et al., 2018).



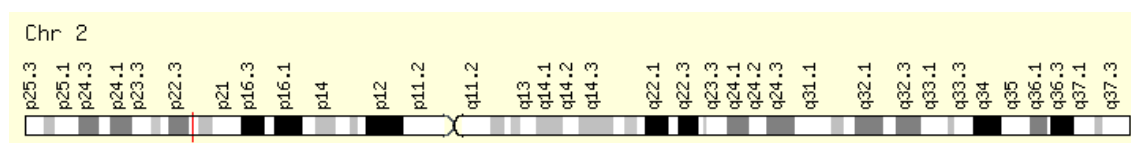
**Figura 15. Localização do gene *CBLC*** (Fonte GeneCard)

## ***STRN***

O gene da estreptina, conhecido como *STRN*, possui 19 éxons, e está localizado no braço curto do cromossomo 2 (2p22.2). É um gene muito conservado entre humanos e fungos, participa de uma variedade processos celulares críticos onde sua perda de função ou desregulação pode levar a perda da homeostase celular (SHI et al., 2016; HWANG; PALLAS., 2016).

O *STRN* é uma molécula muito versátil nas vias de proliferação e age em conjunto com diversos genes envolvidos no câncer como o fator de necrose tumoral 3 (*TRAF3*) e o fator de crescimento de fibroblasto 1 (*FGFR1*), também influencia na via de *DDX3* que fosforila os receptores de interferon (GOUDREULT et al., 2009; SHI et al., 2016).

Em relação ao câncer, o gene *STRN* participa do processo de carcinogênese em vários graus, sendo o mais comum quando ocorre a fusão gênica com o gene *ALK*. Esta fusão é normalmente encontrada em tumores de pulmão e tireoide (HONG et al., 2018; YAKUSHINA et al., 2018). Entretanto, ainda não existem relatos relacionados estes achados com tumores urológicos.



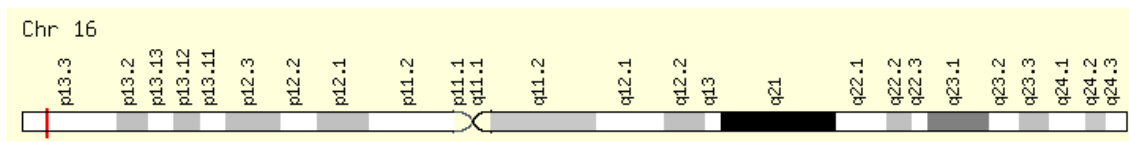
**Figura 16. Localização do gene *STRN*** (Fonte GeneCard)

## **TSC2**

O gene *TSC2* (TSC complex subunit 2), possui 44 éxons e está localizado no braço curto do cromossomo 16 (16p13.3). Este gene está diretamente relacionado a esclerose tuberosa. Acredita-se que seu produto seja um supressor tumoral capaz de estimular GTPases específicas. Estudos em câncer de cólon e reto mostram o envolvimento do *TSC2* em sinalização de receptores de insulina, funções supressoras neoplásicas e regulação do crescimento celular (SLATTERY et al., 2010)

Um estudo sobre esclerose tuberosa, onde foram acompanhados uma coorte de 150 pacientes, foi verificado que 66% das mutações no *TSC2* eram adquiridas, sendo que os pacientes não possuíam histórico familiar da doença (JONES et al., 1999).

Além das neoplasias de pulmão, fígado e de alguns tipos de leucemia aguda, o *TSC2* foi relacionado ao câncer renal (CARSILO et al., 2000; HINO et al., 2001; ZHIFANG et al., 2009; LINEHAN; RICKETTS., 2013).



**Figura 17. Localização do gene *TSC2*** (Fonte GeneCard)

## **RGPD3**

O gene *RGPD3* também nomeado de *RANBP2*, pertence a um "cluster" de genes relacionados a proteínas de ligação a RAN, localizado no braço longo do cromossomo 2 (2q12.2) e possuindo 27 exons. Este gene expressa uma proteína dentro do núcleo celular onde facilita a movimentação de moléculas através dos poros nucleares (GORLICH; KUTAY., 1999). A desregulação dos níveis de proteína de RAN pode causar problemas no transporte núcleo/citoplasma de supressores tumorais e oncogenes. Além disso, também participa de vários mecanismos cruciais, como a montagem das fibras do fuso (mitose e meiose), regulação do ciclo celular, transporte de proteínas citoplasmáticas e facilitação na produção de pré-RNA (CLARKE; ZHANG., 2008; NAKIELNY; DRYFUSS., 1999; FAUSE et al., 2001).

Este é um gene intimamente ligado à esquizofrenia estando expressos nos neurônios, no entanto, algumas variantes também foram encontradas em neoplasias hematológicas como em linfomas, leucemias e meningiomas (ROYAUX et al., 1997; FAUSER et al., 2001; BRASTIANOS et al., 2013).

Um outro aspecto importante é que mutações que desregulam a expressão desse gene, superexpressando-o, favorecem o aparecimento de tumores malignos também (pulmão, próstata, mama, cólon, neuroblastoma) (XIA et al., 2008; SCHNEPP et al., 2015). Entretanto outras mutações, neste gene, também podem favorecer o aparecimento de neoplasias (ZHIGUI et al., 2003).

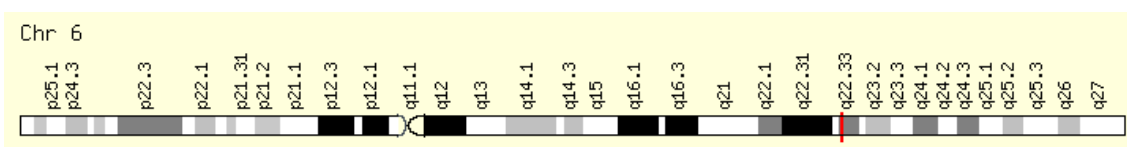


**Figura 18. Localização do gene *RGD3* (Fonte GeneCard)**

### **RSPO3**

Este gene possui 7 exons e está localizado no braço longo do cromossomo 6 (6q22.33) pertencendo à família R-spondina. A proteína codificada desempenha função na regulação das vias de sinalização Wnt / beta-catenina, envolvidas no desenvolvimento, crescimento e sinalização celular (LAU et al., 2011; GLINKA et al., 2011).

Mutações neste gene são frequentemente encontradas em tumores colorretais, assim como as fusões gênicas envolvendo genes da via Wnt (FISHER et al., 2017). No entanto este gene ainda não relacionado ao CP.



**Figura 19. Localização do gene *RSPO3*** (Fonte GeneCard)

## **5.6 RESULTADO MOLECULAR DO HPV 16 E HPV 18**

Por causar danos no DNA e gerar lesões, o HPV é comprovadamente um dos fatores principais no surgimento das neoplasias de colo de útero e laringe, chegando a estar presente em 100% dos casos em alguns estudos (WALBOOMERS et al., 1999; MUNOZ et al., 2003). No CP a infecção pelo HPV é considerada um fator de risco variável, não sendo um fator decisivo para o aparecimento do CP (CUBILLA et al., 2000)

Em nossos resultados, verificamos a presença do HPV 16 em apenas 16,67% (n = 2) dos pacientes e em nenhum indivíduo do grupo controle. Nenhuma amostra positiva para o HPV 18 foi identificada, apesar destes serem os principais subtipos do HPV relacionados ao câncer (MIRALLES-Guri et al., 2009)

Vários estudos correlacionam a presença do HPV 16 e 18 em pacientes com CP, por este motivo existe uma divergência dos nossos encontrados em relação a literatura. No entanto a grande maioria dos relatos demonstram a presença do vírus em mais de 30% dos pacientes com CP (MIRALLES-GURI et al., 2009; BACKES et al., 2009; HERNANDEZ; MACHICADO., 2014).

Inclusive no Brasil, existem publicações referindo que a positividade para o HPV ultrapassa os 30% nos pacientes portadores de CP (SCHEINER et al., 2008).

Essa disparidade entre nossos dados e os descritos na literatura, podem ser atribuídas ao tamanho da nossa amostra.

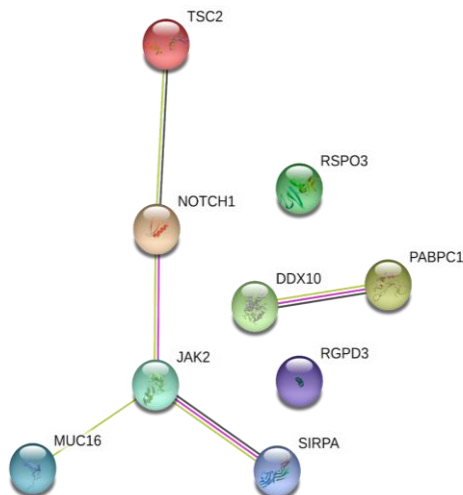
### 5.6.1 PACIENTE 2424

O paciente 2424, caucasiano, tabagista e etilista, positivo para HPV 16, negativo para HPV 18, não apresentava lesões macroscópicas sugestivas de HPV, foi diagnosticado com CP avançado aos 52 anos e fez a cirurgia para retirada do tumor 3 meses após o diagnóstico, um ano após a cirurgia foi observado metástase óssea e disseminação pulmonar, vindo a falecer dois anos após o diagnóstico devido a insuficiência respiratória.

Dados da literatura apontam que pacientes em casos mais avançados apresentam sobrevida média de dois anos. (GRAAFLAND et al., 2011)

Este paciente continha maior número de genes mutados. Verificamos mutações patogênicas nos genes, *PABPC1*, *MUC16*, *SIRPa*, *NOTCH1*, *RGPD3*, *DDX10*, *TSC2*, *RSPO3* e *JAK2*.

Este paciente, devido as interações gênicas, tem uma importância grande do diagnóstico molecular relacionado ao desfecho clínico. Quando olhamos o PPI (*Protein-Protein Interaction*) (Figura 20) observamos dois núcleos de interação, um formado entre os genes *TSC2*, *NOTCH1*, *JAK2*, *SIRPA* e *MUC16* e outra interação entre *DDX10* e *PABPC1*.



**Figura 20. PPI do paciente 2424 gerado pelo StringDB**

Não foi observada interação direta estão os genes *RGPD3* e *RSPO3*. Entretanto, apesar de não participarem das redes representadas no PPI, estes genes possuem importância no processo tumoral, visto que também fazem parte de outras vias ligadas a estabilidade celular.

O gene *RGPD3* sintetiza uma proteína semelhante a *RANBP2* com domínio *GRIP*; domínio de repetição de tetratricopeptídeo contendo 1758 aa, ou seja, a maior parte da sequência é homóloga às regiões de *RANBP2*, exceto o terminal C, que inclui o domínio *GRIP* (CICARELLI et al., 2005).

No nosso paciente ela se apresentou como uma mutação *frameshift* na posição c.3826\_3830delAGCCC onde de acordo com o snpEff e o varsome tem um alto impacto, apresentando uma possível patogenicidade. No entanto essa mutação ainda não foi descrita em nenhum banco de dados, impossibilitando avaliar o grau de patogenicidade em outras doenças. Uma informação relevante da importância deste gene, disponível no banco de dados OMIM, é sua hiperexpressão no testículo de mamíferos. Essa expressão pode ser devido ao importante papel que este gene exerce na divisão celular (ARNAOUTOV et al., 2005; JOSEPH et al., 2004).

Além de estar relacionado ao transporte de proteínas, esse gene também é considerado um supressor tumoral (NAVARRO et al., 2005).

Em relação ao gene *RSPO3*, este já se apresenta com mutação importante do tipo não sinônima na posição c.83G>T.

O gene *RSPO3* não interage com nenhum dos outros genes destacados nas vias de interação deste paciente. A variante aqui apresentada é apontada em todos os preditores como sendo uma variante provavelmente patogênica, e ainda não catalogada no banco de dados dbSNP pertencente ao ncbi (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). Este é um banco de dados robusto onde são cadastradas SNPs conhecidas para que se obtenha informações genéticas e funcionais. Por não ter sido identificada no banco de dados consideramos esta mutação como não descrita.

Este gene é ainda pouco estudado. Theodouros e colaboradores, verificaram que a presença de mutações no *RSPO3* induzia um aumento de tumorigênese em células epiteliais mamárias de camundongos, classificando o *RSPO3* como oncogene.

Além desta característica, o *RSPO3* participa diretamente da via da família de genes Wnt, que são descritos na literatura também como proto oncogenes potentes (THEODOUROS et al, 2007). Um fato que evidencia esta associação é o estudo de Seshagiri e colaboradores, os autores detectaram uma fusão gênica entre o gene *RSPO3/PTPRK* que aumentava a expressão dos genes da família Wnt em casos de câncer de cólon.

O *RSPO3* ainda não foi estudado em CP, no entanto sua presença em outros tipos de câncer, principalmente de células epiteliais, nos anima a relacioná-lo ao CP.

Além dos genes selecionados sem interação entre eles, nós também observamos mutações nos genes *DDX10* e *PABPC1*, onde ocorreram mutações do tipo não sinônima em ambos.

O *DDX10* está presente em vários tipos de neoplasias, no tumor de ovário, o gene age como um supressor tumoral e sua baixa expressão induz os tumores a se desenvolverem mais rapidamente (GAI et al., 2016).

O *DDX10* foi apontado como patogênico em todos os nossos preditores, inclusive no CADD onde apresentou um valor acima de 10, sugerindo tratar-se de mutação patogênica.

O gene *PABPC1* foi o gene mais mutado de nosso estudo, ele foi encontrado em todos os controles e em 9 dos 12 pacientes. Nosso *oncoprint* revelou uma mutação do tipo *frameshift* como sendo a principal nos controles e mutações não sinônimas nos pacientes, no entanto não nos ateremos a esse

gene, pois a presença de mutações tanto nos controles quanto nos pacientes, reduz a importância deste achado. As mutações do gene *PABC1* estão descritas na tabela 7.

No terceiro grupo de genes desse paciente, foram encontradas mutações nos genes *TSC2*, *NOTCH1*, *JAK2*, *SIRPA* e *MUC16*, havendo um núcleo de interação entre os genes *JAK2* e *NOTCH1*.

Da mesma forma que o gene *PABPC1*, o gene *MUC16* mutado esteve presente em 11 de 12 pacientes, e pelos motivos acima também não nos ateremos a este gene.

A análise do gene *TSC2* revelou uma a presença de uma mutação provavelmente patogênica, CADD acima de 10, além de também ter sido classificada como provavelmente patogênica nos outros preditores. Esta mutação não sinônima apresentada na posição c.4911G>C, tem importância no desenvolvimento da esclerose tuberosa tipo 2, doença esta que tem como um dos achados o aparecimento de tumores benignos.

Conhecido como um supressor de tumor, o *TSC2* tem função importante como inibidor da via de *mTORC1*. Mutações de perda de função no *TSC2* resultam na inativação do complexo hamartina-tuberina que levam à ativação constitutiva da via *mTORC1* (Lan et al., 2017). Quando ativado, o *mTORC1* promove processos anabólicos, como síntese de proteínas, nucleotídeos e lipídios, e inibe processos catabólicos, como autofagia, por meio da fosforilação de diversas proteínas (KIDA et al., 2005; LAN et al., 2017).

Inoki e colaboradores identificaram uma via de é importante para crescimento celular, e quando desregulada leva a tumorigênese. Jian e colaboradores descreveram uma associação entre o gene *TSC2* com câncer renal.

Goncharova e colaboradores em 2006, demonstraram que o *TSC2* também pode estar ligado a remodelação da actina, e assim também ligado a migração e invasividade celular, sendo estas propriedades fundamentais no mecanismo de metástase.

Outros dados relacionados ao HPV 16, onde um complexo de proteínas E6 do hpv 16 se liga à *TSC2* degradando-a e estimulando a via *MTOR* e, por conseguinte o crescimento celular. Nesta mesma via também inibem as



proteínas pró apoptóticas *Bad* and *Bax* facilitando a proliferação celular, e o processo de metástase (CHEN., 2015; RAMALHO et al., 2010).

Apesar do gene *TSC2* ter uma ligação com o *NOTCH1*, nenhuma via comum relacionada ao câncer foi ainda descrita, entretanto estes genes participam em vias independentes de carcinogênese. Corroborando com nosso achado, outros estudos também encontraram estes genes mutados, e também sem apresentar interação entre si (CRABTREE et al., 2016; BOORA et al., 2015).

Quando verificamos o gene *NOTCH1*, vemos que ele aparece exclusivamente mutado nos pacientes na posição c.3905G>T de maneira não sinônima, possui um impacto deletério onde o CADD aplicado a esse gene chega a ser maior que 10, sendo classificada como provavelmente uma mutação patogênica. O SIFT e o polyphen também classificaram essa variante como uma mutação possivelmente patogênica.

Selecionamos esta mutação para análise mais detalhada pois o gene *NOTCH1* está intimamente relacionado a vias importantes na carcinogênese. Em nosso trabalho esta mutação foi identificada em um paciente o qual apresentou defecho desfavorável da doença.

Muitos são os relatos do gene *NOTCH1* mutados no CP, inclusive no banco de dados do Cosmic existe uma referência direta do gene *NOTCH1* ao CP.

O *NOTCH1* quando mutado, geralmente está envolvido em alguma via desregulada, que auxilia no aparecimento do câncer, no entanto este gene tem características que fazem com que possa possuir função tanto de supressor tumoral, quanto de oncogene, dependendo das células onde esta sendo expresso (ASTER et al., 2017; SIGNORETTI; ASTER., 2018).

Nos tumores epidermóides o gene *NOTCH1* encontra-se hipo expresso, no entanto Signoretti & Aster (2018) demonstraram, através de um relato clínico, que o *NOTCH1* também pode funcionar como um oncogene em pacientes com carcinoma epidermóide de pênis também com defecho desfavorável. Os autores sugeriram que inibidores de NOTCH1 poderiam auxiliar plano terapêutico.

Assim como em nossa amostra, um trabalho de Ali et al (2016) traçou um perfil genético de pacientes portadores do CP com o mesmo tipo histológico

que o nosso. Os autores encontraram mutações do gene *NOTCH1* em 25% dos pacientes, exatamente a mesma porcentagem de pacientes mutados em nossa amostra. Os autores sugeriram que este gene poderia ser um dos responsáveis pelo desenvolvimento do CP, podendo ser também um alvo terapêutico.

O funcionamento adequado da via de *NOTCH*, responsável pela interação direta célula a célula, é essencial para o desenvolvimento, diferenciação, proliferação e apoptose (PREVIS et al., 2015; KOVEITYPOUR et al., 2019). Desta forma acreditamos que por estar envolvidos em vários tipos de neoplasias como, tumores de mama, renais, de colo de útero e pênis, e devido a suas interações, podemos inferir que este gene foi um dos responsáveis pela pior evolução da doença neste paciente.

Foram encontradas, somente no paciente 2424, duas mutações importantes no gene *JAK2*. A Primeira mutação foi classificada como “*Stop-Codon*”, esse tipo de mutação é muito perigoso, pois produz proteínas truncadas que não cumprem com sua função.

A mutação c.526G>T foi classificada como de alto impacto, deletéria e patogênica, devido ao CADD de maior que 39, mutações com CADD acima de 10 já são consideradas como possivelmente patogênica, o índice bem mais alto reforça o grau de patogenicidade, podendo causar danos graves ao paciente.

De acordo com o banco de dados do COSMIC, esse tipo de mutação é considerado rara pois está descrita em apenas 0.12% do total de amostra do banco de dados.

A proteína *JAK2* funciona como uma molécula sinalizadora, a via *JAK-STAT* é um dos principais mecanismos pelos quais os fatores de crescimento e os receptores de citocinas traduzem sinais intracelulares. Esse mecanismo regula a proliferação, diferenciação, migração, apoptose (GHORESCHI et al., 2009, LIU et al., 1998).

Grande parte dos estudos que relacionam o *JAK2* ao câncer, principalmente mama e gástrico, mostram que as vias alteradas do *JAK2* quando este encontra-se superexpresso, se relacionam ao desenvolvimento de neoplasias (YU et al., 2004; BEHERA et al., 2010; HARRY et al., 2012).

Alguns estudos também relacionaram a baixa expressão do *JAK2* ao desenvolvimento do câncer. Ranieri e colaboradores em 2014

demonstraram que pacientes com adenocarcinoma de pulmão apresentavam mutações *stop-codon* no gene *JAK2*, onde ocorreu a diminuição da expressão desse gene, perdendo sua função como supressor tumoral. Já Akada e colaboradores em 2014 demonstraram que a perda dos alelos normais de *JAK2* em camundongos pode favorecer um pior prognóstico em neoplasias mieloproliferativas, relacionando também a maior sintomatologia da doença (AKADA et al., 2014).

A mutação mais comum encontrada no gene *JAK2*, na maioria dos tumores, é a mutação V617F, entretanto não encontramos esta mutação neste paciente. No entanto, a mutação *stop-codon* aqui encontrada, nos possibilita abrir novos estudos para esse gene em relação ao CP, visto suas importantes funções dentro do nosso genoma.

Uma outra mutação encontrada neste paciente, foi a mutação *frameshift* no gene *SIRPa* na posição c.287\_288delTC. Este gene é o quarto mais mutado da nossa amostra, estando presente em 3 pacientes.

Nenhuma descrição em relação a este gene e o CP foi encontrada até o momento. O estudo de Kannan e colaboradores em 2017 revelou que a superexpressão do gene *SIRPa* em pacientes portadores de câncer de orofaringe, também acometidos pelo HPV. Os autores não estabeleceram nenhuma hipótese da interação entre o HPV e a hiperexpressão do gene *SIRPa* e nem se essas alterações foram resultado da presença do vírus.

Podemos inferir, que esta mutação associada a infecção pelo HPV, possa auxiliar no desenvolvimento do câncer e/ou resultar num pior prognóstico, como no nosso paciente.

A presença da interação entre as proteínas geradas por esses genes é importante pois demonstram a complexidade estabelecida entre um bom funcionamento e a desregulação da homeostasia celular (CANZAR; RINGELING., 2020).

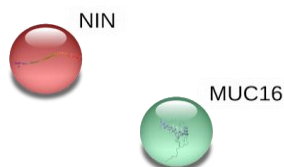
Quando um gene está mutado de forma que sua rede de interação só apresenta genes íntegros, existe a possibilidade de um outro gene suprir a deficiência dependendo da via afetada, no entanto quando mais de um gene na mesma via está afetado existe uma maior que possam ocorrer danos celulares mais graves.

### 5.6.2 PACIENTE 435

O paciente 435, de etnia negra, fazia uso de álcool e tabaco, negativo para o HPV. Foi diagnosticado com CP aos 54 anos, sendo submetido a penectomia parcial. Após um ano do tratamento cirúrgico, apresentou recidiva local da doença sem doença metastática, sendo submetido a penectomia total.

Neste paciente após a filtragem dos dados, foram selecionados 2 genes de interesse, os genes *MUC16* e *NIN* que possuíam mutações de tipo não sinônima.

Quando avaliamos a interação proteica (Figura 21), verificamos que os genes mutados *NIN* e *MUC16* não interagem entre si, no entanto estão envolvidos em outras vias normais onde a desregulação pode um gerar desequilíbrio favorecendo o ambiente para o aperecimento de neoplasias.



**Figura 21. PPI do paciente 435.**

Como já visto anteriormente, o gene *MUC16* está mutado em grande parte de nossa amostra. A mutação não sinônima c.33461C>T foi classificada como possivelmente patogênica pelos filtros preditores.

*MUC16* foi inicialmente considerado um biomarcador específico para o câncer de ovário, pacientes portadores deste tumor apresentam *MUC16* superexpresso em mais de 80% dos casos (CAPSTICK et al., 1991; BAST et al., 1998).

A superexpressão da superfície celular de *MUC16* foi identificada também em diversos cânceres, incluindo, pâncreas, esôfago, estômago, cólon e pulmão, e acredita-se que as proteínas sintetizadas por este gene promovam o crescimento e a sobrevivência das células tumorais (KUFÉ., 2009; JONCKHEERE; SEUNINGEN., 2010; STREPPPEL et al.,2012; PATEL et al.,

2019). Shen e colaboradores em 2012 demonstraram o papel migratório onde a invasão celular facilita a ação metastática com a superexpressão do *MUC16*.

Devine e McKenzie em 1992 descreveram o papel do gene *MUC16* na proteção do tecido epitelial pela degradação de patógenos e de alterações genéticas controlando o crescimento celular. Seu mau funcionamento prejudicaria as características do tecido deixando-o mais exposto as agressões neste paciente, a mutação do *MUC16* possivelmente tenha tido um papel de destaque no desenvolvimento da doença, que se encontrava localmente avançada, resultando na remoção total do órgão. Desta forma, acreditamos que esta mutação possa ter contribuído para a agressividade do CP neste paciente.

O gene *NIN* foi encontrado mutado somente neste paciente. Foi observada uma mutação não sinônima na posição c.3959G>A. Este gene *NIN* atua no posicionamento e na ancoragem dos microtúbulos e centríolos no centróssomo, este papel é fundamental para um bom funcionamento celular, principalmente para que ocorra o processo de divisão celular (KODANI et al., 2013).

Este gene também atua em vias importantes na carcinogênese, como a via WNT/beta catenina e nas vias *AKT/mTOR/PI3K*, vias essas responsáveis pela resposta celular ao dano no DNA, apoptose e invasão celular (YOST et al., 1996; WANG et al., 2016; HERMIDA et al., 2017).

Alguns estudos relatam que o *NIN* pode atuar como supressor tumoral em cânceres como a de pele, mama e pulmão, ou como um oncogene nos tumores de pâncreas, rim e colorretal (QIU et al., 2016; SHEN et al., 2016; ZHENG et al., 2007; LI et al., 2016).

Yu e colaboradores em 2009 observaram que o *NIN* mutado estava superexpresso no carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, e associou a características mais graves da doença. O mesmo foi encontrado em neoplasias de ovário onde a superexpressão aumentada foi correlacionada a um grau alto de patogenicidade, ocorrendo a diminuição na taxa de sobrevivência, no câncer de mama, o aumento da expressão resultou em um fenótipo mais agressivo (proliferação e a invasão celular) (QU et al., 2008; LIU et al., 2015).

Em relação ao CP, Sahin e colaboradores em 2019, identificaram o gene *NIN* mutado em 15% dos tumores. Trabalhos relacionando o *NIN* ao CP são

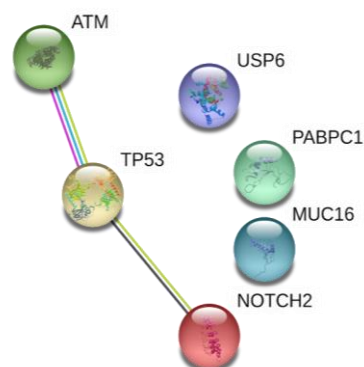
escassos, no entanto é observada relação entre outros de tipos de tumor e um pior prognóstico. Este paciente apresentou progressão da local da doença, sendo necessária uma segunda cirurgia. Estudos histopatológicos e citogenéticos em tumores com o *NIN* mutado, poderiam esclarecer o que de fato ocorre nestes tecidos em relação a rearranjos cromossômicos e/ou acúmulo da proteína alterada.

### 5.6.3 PACIENTE 439

O Paciente 439 era o mais jovem, não consumia álcool e nem tabaco, foi diagnosticado com CP localmente avançado aos 33 anos, foi submetido a penectomia total após 3 meses do diagnóstico, no momento da cirurgia já se detectava metástases ósseas e pulmonares. Após a cirurgia, foi submetido a quimioterapia paliativa, no entanto veio a óbito dois meses após a retirada do tumor primário devido a insuficiência respiratória.

Em seu quadro genético apresentou mutações nos genes *TP53*, *NOTCH2*, *ATM* e *USP6* além do *PABPC1* e do *MUC16*.

Pudemos observar uma rede de interação interessante onde o gene *TP53* que é um dos mais importantes genes relacionados diretamente com o câncer, está no centro e outros dois genes também responsáveis pelo controle celular ligam-se a ele diretamente (Figura 22).



**Figura 22. PPI do paciente 439.**

O gene *USP6* é um dos que não interage com os outros mutados encontrados neste paciente. Está presente em 2 pacientes, no entanto a

mutação encontrada é diferente. No paciente 2426 encontra-se uma mutação de tipo não sinônima na posição c.202C>T de impacto neutro, já no paciente 439 encontra-se uma mutação mapeada na posição c.1244G>A com um alto impacto patogênico.

Descoberto como oncogene associado ao sarcoma de Ewing's, o *USP6* atualmente é constantemente ligado a outra doença quando sua expressão esta aumentada, o cisto ósseo aneurismático, uma doença que produz tumores benignos (NAKAMURA et al., 1992; PANAGOPOULOS et al., 2008; KUMTA et al., 2003).

Madan e colaboradores em 2016 confirmaram em seu estudo que o *USP6* está envolvido na via do WNT, uma via de desenvolvimento embrionário e de homeostasia em tecidos adultos, que quando desregulada pode levar ao aparecimento de várias doenças em especial o câncer. No entanto, outras vias de migração e proliferação celular também são afetadas pela superexpressão do *USP6* favorecendo a migração celular e metástase.

Zeng e colaboradores em 2018 revelaram que a presença do *USP6* superexpresso e mutado, gerou um pior prognóstico nos tumores de cólon (ZENG et al., 2018).

Não se sabe ao certo o papel deste gene no CP, no entanto Zhou e colaboradores em 2018 apresentaram um estudo onde foi feita a caracterização genética de linhagens celulares de câncer de pênis. As mutações no gene *USP6* foi uma das mais frequentes nas linhagens estudadas (ZHOU et al., 2018).

Acreditamos que a presença de mutações no gene *USP6* possa estar envolvida na invasão, migração celular e metástase, como já descrito em outros tipos de neoplasia. Desta forma pode ter contribuído de maneira decisiva para o aparecimento das metástases neste paciente.

A mutação c.302G>T encontrada no gene *NOTCH2*, apresentou CADD acima de 20, sendo considerada possivelmente patogênica também nos outros preditores.

O paciente 2424 foi o outro paciente com o pior desfecho da doença. Em comum com o paciente 439, além do desfecho desfavorável, ambos apresentavam o gene *NOTCH* mutado, mas diferente do paciente 439, o paciente 2424 apresentava o gene *NOTCH1* mutado.

Já vimos que a família do gene *NOTCH* é formada por 4 genes incluindo *NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3* e *NOTCH4* os quais possuem várias funções dentro da célula, codificando proteínas transmembranares que ativam vias de sinalização ligadas principalmente a regulação da sobrevivência, proliferação e diferenciação celular (GRIDLEY., 2007).

Alguns estudos relacionam mutações no gene *NOTCH2* ao aparecimento e evolução em câncer de pulmão, cabeça e pescoço e tumores de células escamosas da pele, nestes estudos eles apontam o *NOTCH2* como um supressor tumoral demonstrando que mutações que inativam o *NOTCH2* se relacionam de fato com o aparecimento de neoplasias (WANG et al., 2011; KAPAN; ILAGAN., 2009; DEMEHRI et al., 2009; NICOLAS et al., 2003).

Parr e colaboradores em 2014 fizeram uma comparação da presença do *NOTCH1* e *NOTCH2* em pacientes com câncer de mama. Os autores verificaram que os pacientes apresentavam aumento da expressão do gene *NOTCH1* e baixa expressão do *NOTCH2*, demonstrando que de fato a falta da proteína PNOTCH2 favorece a carcinogênese. Outro achado relaciona o pior prognóstico com a ausência ou diminuição de expressão do gene *NOTCH2*. O Mesmo foi verificado por Solus et al (2016) e Chu et al (2009) quando observaram que a baixa expressão do *NOTCH2* no carcinoma cutâneo e tumores colorretais se relacionava ao pior prognóstico.

Em relação ao CP apenas um trabalho faz menção ao gene *NOTCH2*. Os autores observaram que este gene se encontra frequentemente alterado no tecido tumoral, no entanto, não foi descrita relação ao desfecho ou apresentação da doença (ZHOU et al., 2018).

Da mesma forma que o trabalho acima, nos limitamos a demonstrar que a mutação no *NOTCH2* está presente em pacientes com carcinoma epidermóide de pênis, e que pode estar sujeito a um pior prognóstico do paciente. Este achado é importante pois revela uma nova via a ser estudada no CP.

Na outra ponta de interação com o *TP53* está o gene *ATM*, nosso paciente apresentou mutação na posição c.8800A>G, uma mutação de tipo não sinônima predita como provavelmente patogênica, com CADD acima de 20.



O *ATM* é um dos principais genes que controlam a estabilidade genômica, é um supressor de tumor que coordena vários processos celulares. Sua função mais estudada é em relação ao monitoramento rigoroso do ciclo celular e da fidelidade à replicação do DNA. Quando erros e lesões no DNA são detectados ocorre recrutamento de proteínas de reparo para o conserto das fitas. Uma outra função importante ocorre na mitose, onde a ativação do *ATM* promove o início da verificação do *checkpoint*, permitindo que a transição das fases do ciclo celular seja correta (BOOHAKER; XU., 2013; JACKSON; BARTEK., 2009).

Também foi observado uma série de evidências mostrando que o *ATM* faz parte de muitas outras redes de sinalização, incluindo metabolismo, crescimento celular, estresse oxidativo e remodelação da cromatina, todos estes mecanismos afetam diretamente a progressão do câncer. Os diversos efeitos aqui descritos revelam que a predisposição ao câncer de vários tipos e seu curso clínico possam estar ligados as mutações do gene *ATM* (CREMONA; BEHRENS., 2013).

As mutações no *ATM* são comumente encontradas em vários tipos de câncer sejam hematológicos ou não, onde sua superexpressão geralmente é atribuído a um pior prognóstico e a uma menor sobrevida dos pacientes (BHATIA et al., 2012; RIPKA et al., 2010; VADNAIS et al., 2012; SKOWRONSKA et al., 2012).

Sun e colaboradores em 2012 observaram que pacientes de câncer de mama com hiperexpressão do gene *ATM* apresentavam maior índice de metástases. O mesmo foi verificado por Yang e colaboradores em 2017 que também observaram esta relação em tumores avançados de cabeça e pescoço.

Em uma análise feita por Yang e colaboradores em 2017, os autores verificaram que mutações não sinônimas no gene *ATM* representam um risco maior no surgimento do CP e pior prognóstico.

Já Jacob e colaboradores em 2018 observaram numa coorte de pacientes portadores de CP metastático a presença de mutações em genes de reparo do DNA. Os genes *BRCA2* e *ATM* estavam mutados em 7% das amostras. Da mesma forma, Agarwal e colaboradores em 2019, traçaram o

panorama genético do CP metastático e igualmente encontrou mutações no gene *ATM* como uma das principais e mais presentes.

Nossos dados, somados ao da literatura, nos levam a acreditar que a associação do gene *ATM* mutado com o gene *P53* mutado, foi um dos fatores que mais influenciou o desfecho ruim do nosso paciente.

Por fim, verificamos no centro da rede de interação o gene *TP53*, no paciente 439 observamos uma mutação do tipo *frameshit*, localizada na posição c.796\_824dupGGACGGAACAGCTTTGAGGTGCGTGTTTG considerada como patogênica pelas ferramentas utilizadas.

Em resposta ao dano ao DNA, o *ATM* fosforila o p53, levando à sua dissociação da ubiquitina ligase e, conseqüentemente, ao aumento dos níveis de proteína p53. Quando os níveis de proteína p53 aumentam em resposta a danos no DNA, levam à ativação de genes-alvo que induzem a parada do ciclo celular, senescência ou apoptose (LEVINE; OREN., 2009). Como em nosso paciente estes dois genes estão mutados, certamente foi crucial para a má evolução do tumor.

O gene *TP53* é bastante estudado no câncer devido a sua função em regular a expressão de inúmeros genes responsáveis principalmente pela proliferação e manutenção da integridade e estabilidade do genoma, sendo assim classificado como um importante supressor de tumor (Lane & Levine., 2010). Dentre todos os outros genes envolvidos na carcinogênese, o *TP53* de fato é o mais importante pois a presença do gene mutado já foi encontrada em praticamente todos os tipos de câncer (HOLLSTEIN et al., 1991; OLIVER et al., 2010).

O *TP53* é ativado normalmente em resposta a uma variedade de sinais de estresse, como dano ao DNA, sinais hiper proliferativos, hipóxia, estresse oxidativo e suprime a transformação e proliferação celular principalmente desencadeando a parada do ciclo celular, reparo do DNA e apoptose (Bieging et al., 2014). Funções estas que se não controladas e corrigidas, devido a falhas no *TP53*, levam a célula a uma grande proliferação em clones que possuem a capacidade de escapar do reparo assim iniciando a carcinogênese.

Emmanuel e colaboradores em 2019 os autores revelaram a presença de mutações do gene *TP53* em 19% dos pacientes portadores de CP.

Guimarães e colaboradores em 2011 encontram uma semelhança dos dados acima onde observaram 20% de positividade para proteína p53 no tecido tumoral e relacionaram com acometimento linfonodal. Em nossa amostra a mutação do deste gene foi encontrada em 17% dos pacientes, corroborando dados da literatura. Em contrapartida Prapiska e Warli observaram uma grande presença do *TP53* mutado chegando a 39,4% da sua amostra, esses dados mostram que a presença do *TP53* no CP não segue um padrão constante no CP.

Acreditamos que a mutação no *TP53* possa estar envolvida diretamente com o mau prognóstico deste paciente pois juntamente com o *ATM* mutado pode ter gerado um colapso nos mecanismos de reparo do DNA e nas vias de apoptose. Além dos dois genes estarem mutados, a interação entre eles potencializa outras vias celulares (ANGÈLE et al., 2000).

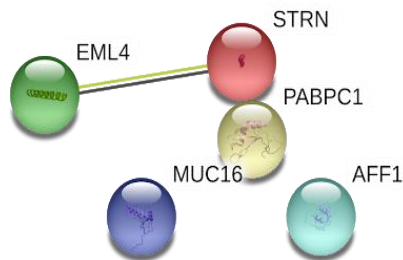
#### **5.6.4 PACIENTE 453**

O paciente 453, de etnia branca, etilista, negava tabagismo, foi diagnosticado com CP localmente avançado aos 65 anos sendo submetido a penectomia parcial e posteriormente a penectomia total, sendo também detectado o acometimento linfonodal.

Ao diagnóstico o paciente mostrava lesões macroscópicas indicativas da presença de HPV, fato confirmado pelos achados moleculares (positividade para o HPV 16).

Foram detectadas também mutações associadas ao câncer nos genes *PABPC1*, *MUC16*, *AFF1*, *STRN* e *EML4*. Todos os genes possuíam uma mutação não sinônima, sendo que as mutações nos genes *EML4* e *STRN* somente foram encontradas neste paciente.

Observamos apenas uma interação entre os genes *EML4* e *STRN* de acordo com o PPI do paciente (Figura 23).



**Figura 23. PPI do paciente 453**

O gene *AFF1* também conhecido como *AF4* é da mesma família do gene *AFF4*, desta forma verificamos uma semelhança das funções do gene em outros tipos de câncer e onde ele já foi relacionado.

A mutação não sinônima c.1842A>C, não foi considerada patogênica pelo preditor CADD, no entanto os outros preditores utilizados informaram possibilidade de patogenicidade desta mutação, logo selecionamos este gene para análise.

O gene *AFF1* assim como o *AFF4* é um gene relacionado a tumores hematológicos, onde verifica-se a fusão do gene *MLL* com o gene *AFF1* (*MLL/AF4*) sendo um marcador de leucemia aguda e linfomas (NILSON et al., 1997; PUI et al., 2002; TWARD et al., 2007). Além desse papel, o *AFF1* mutado pode regular erroneamente o alongamento transcricional de genes importantes de reparo de DNA resultando também em casos de leucemia, ainda a superexpressão deste gene pode favorecer a fuga da apoptose e o crescimento celular desordenado nos tumores de ovário (DOU et al., 2013; IBRAHIM et al., 2015). Este gene também realiza regulação da transcrição de maneira epigenética, atuando diretamente na remodelação da cromatina (MULLER et al., 2007; ZHOU et al., 2017).

Além das neoplasias hematológicas, principalmente a leucemia aguda, não encontramos trabalhos onde associam o gene *AFF1* a outros tipos de tumores epidermóides. Devido ao exposto, acreditamos que este gene foi importante para o desenvolvimento e evolução do CP.

O PPI revelou a interação entre os genes *EML4* e *STRN*, o primeiro encontrava-se mutado na na posição c.804G>C, a avaliação da patogenicidade revelou CADD acima de 20, sendo classificada como provavelmente

patogênica em todos os preditores, já no no gene *STRN* a mutação c.887A>T também apresentou CADD acima de 20 também sendo classificada como possível patogênica.

O gene *EML4* também é visto no COSMIC como um *Hallmark* do câncer pois tem propriedade de se fundir com o gene *ALK* (*EML4/ALK*) sendo encontrado em vários pacientes com câncer de pulmão (OTA et al., 2015). Amostra de 75 pacientes.

Em um estudo de Loong e colaboradores em 2018, os autores demonstraram a presença da fusão *EML4/ALK* nos vários tipos de câncer de pulmão (adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas, câncer de células não pequenas e um grupo não especificado) Além disto, neste mesmo trabalho foi demonstrado que a fusão também estava presente em pacientes metastáticos, indicando que possivelmente este gene esteja atuando na mobilidade celular.

Em outros estudos foram demonstrados o potencial metastático de pacientes com câncer de pulmão onde se verificou a presença de metástase cerebral, na tireoide e na mama em pacientes com a presença da fusão *EML4/ALK* (MAILLET et al., 2013; KAWAMOTO et al., 2016; LIU et al., 2016).

O paciente 453 apresentou metástase linfonodal com progressão local do tumor, no entanto não pudemos verificar a presença da proteína de fusão *EML4/ALK* devido a não fazer parte de nossos experimentos iniciais.

Quando olhamos para os preditores, todos classificam a mutação do gene *EML4* como possivelmente patogênico, isto fortalece nossas buscas entendendo que essa predição *in silico* possa ter uma relação com a realidade no ambiente tumoral.

O *STRN* foi mais um gene mutado exclusivo deste paciente, este gene assim como o *EML4* também gera uma proteína de fusão com o gene *ALK* (*STRN/ALK*). A fusão *STRN/ALK* também é encontrada como um marcador em tumores de pulmão, onde sua presença está bem definida, assim como no câncer de tireoide, onde a presença da proteína de fusão está associada a formas mais agressivas da doença (MAJEWSKI et al., 2013; KELLY et al., 2014).

Em uma análise integrativa de genes de fusão ligados a oncogênese, Choi e colaboradores em 2018 observaram a presença do gene de fusão *STRN/ALK* em tumores colorretais, os autores verificaram que a superexpressão dessa fusão aumentava a proliferação celular nestes pacientes, mas não relatou metástase. Kusano e colaboradores em 2016 observaram a presença da fusão *STRN/ALK* em pacientes portadores de câncer renal, relacionando a presença de metástase linfonodais.

Um papel interessante para a mutação do gene *STRN* é no caso do câncer de mama, onde foi identificado que o gene *STRN* auxilia na sinalização do estrógeno e a interrupções na sinalização e no metabolismo do estrogênio são consideradas risco para progressão, desta forma mutações no gene *STRN* também podem estar envolvidas na gênese desse tumor (PYLKÄS et al., 2012).

Além do papel de marcador molecular nos tumores de pulmão e tireoide, a presença da mutação no gene *STRN* está ligada também a presença de metástase linfonodal (PÉROT et al., 2014; JEON et al., 2019). Por apresentar relação a presença de doença metástática, sugerimos também que este gene possa estar envolvido na metástase linfonodal ocorrida neste paciente, porém, necessitaríamos de um número de amostras maior para poder comprovar essa hipótese.

Os três genes possivelmente patogênicos mutados neste paciente estão presentes no banco de dados do COSMIC como *hallmark* do câncer por ter alta capacidade de se fundir, principalmente a outros genes reguladores de transcrição como o *MLL* ou *ALK*, gerando proteínas oncogênicas.

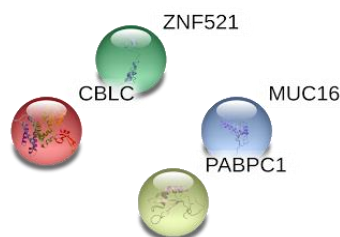
Observamos a existência de genes ainda não descrito no CP que possam desempenhar o papel de biomarcadores prognósticos, assim como oferecer oportunidades de novos alvos terapêuticos.

#### **5.6.5 PACIENTE 457**

O paciente 457, era de etnia branca, possuía hábitos tabagista, mas não etilista, foi diagnosticado aos 62 anos onde foi submetido a uma penectomia parcial 2 meses após o diagnóstico, e era negativo para o HPV 16 e 18. Teve

como diferencial apenas uma metástase presente nos linfonodos, que não resultou em óbito até finalização do estudo.

Foram identificadas mutações não sinônimas nos genes *MUC16*, *ZNF521* e *CBLC*. No PPI do paciente (Figura 24.), não encontramos interação das proteínas geradas por eles, nem vias interdependentes. Desta forma decidimos por discutir as mutações apenas *ZNF521* e *CBLC* por serem mutações exclusivas deste paciente.



**Figura 24. PPI do paciente 435**

A mutação do gene *ZNF521* está localizada na posição c.953G>A, classificada como não sinônima e possivelmente patogênica.

O gene *ZNF521* foi inicialmente encontrado em células do sistema hematopoiético onde se verificou uma grande expressão da proteína. Possui como função principal o papel de co-repressor de transcrição junto de outras proteínas onde age no complexo de remodelação das histonas no nucleossomo (LIN et al., 2004; BOND et al., 2008). O gene *ZNF521* também possui funções importantes no desenvolvimento do câncer. Nas leucemias agudas, mieloblastoma e meduloblastomas, afeta a expressão do HLA de classe I na superfície das células tumorais impedindo o reconhecimento pelas células *natural killer*, o que favorece a sobrevivência das células cancerígenas (La ROCCA et al., 2009; MESURACA et al., 2015).

Este gene que também possui um papel patogênico no câncer de mama, de pulmão e colorretal onde, apesar de pouco estudados, pode estar envolvido na perda de função na via da remodelação de cromatina levando a uma instabilidade do genoma e início da tumorigênese (BOND et al, 2018; HUANG et al, 2014; SATAR; MAJID, 2019; YAMAGISHI et al, 2016).

O estudo de Huan e colaboradores em 2019, os autores verificaram que o tecido gástrico com acometimento tumoral apresentava aumento das proteínas *ZNF521* em relação ao tecido normal, a presença deste gene mutado também favorecia a presença de metástase linfonodal. Este estudo torna-se importante pois o paciente 457 apresentou presença de metástase linfonoda, sugerindo que este gene possa estar envolvido nesse papel também no CP.

A mutação não sinônima c.1174G>A, no gene *CBLC*, foi classificada com de impacto moderado. Muitas são as funções sugeridas do gene *CBLC* na carcinogênese, já foram descritas funções de supressor tumoral, modulador do ciclo celular, proliferação e até reparo do DNA (FRANKUM et al., 2015; PETROCHILOS et al., 2013). No entanto poucos são os estudos em que relacionam diretamente este gene a tipos específicos de câncer. Tanto que em estudos onde houveram sequenciamento total do exoma, o gene *CBLC* foi encontrado mutado em aproximadamente 2% dos tumores (GAO et al., 2013; NAKAMURA et al., 2011), não sendo descrita em nenhum caso de CP.

Foi demonstrado que mutações no *CBLC* estão também presentes em tumores de mama, onde estão envolvidos em defeitos na resposta inflamatória e no crescimento celular, e no adenocarcinoma de pulmão onde é encontrado superexpresso, funcionando com marcador para o tratamento com fármacos frequentemente utilizados no tratamento desta doença. (HONG et al., 2018; PETROCHILOS et al., 2013; LIN et al., 2018). Entretanto ainda não se conhece bem o papel do gene *CBLC* no processo de carcinogênese.

Desta forma, os genes aqui descritos têm sua importância dentro do aparecimento e progressão no tumoral. Apesar de alguns genes ainda não terem sido relacionados ao CP, eles possuem papel chave para o equilíbrio e estabilidade celular.



### 5.6.6 PACIENTES 2425, 2426, 433, 437, 443, 455, 459

Os demais pacientes, após a retirada do tumor primário, não apresentaram piora na progressão da doença, não possuíam durante o diagnóstico nenhuma anormalidade no tumor ou algum aspecto clínico relevante. Todos foram submetidos a penectomia parcial com a retirada apenas do tumor com margem cirúrgica de segurança, sem a necessidade posterior de tratamentos adjuvantes.

Apresentavam também uma grande heterogeneidade genética entre eles, tanto em relação aos genes mutados quanto no tipo de mutação encontrada (Tabela 6 e 8). As mutações mais frequentes foram do tipo não sinônima, seguidas por mutações *frameshift* e inserções.

**Tabela 8. Relação dos genes mutados e tipo de mutação nos pacientes com desenvolvimento normal do CP**

PACIENTE	GENE MUTADO	TIPO DA MUTAÇÃO
2425	<i>PABPC1</i>	não sinônima
	<i>MUC16</i>	não sinônima
	<i>NOTCH1</i>	não sinônima
	<i>TP53</i>	não sinônima
	<i>RGPD3</i>	frameshift
	<i>KMT2D</i>	não sinônima
	<i>PDE4DIP</i>	não sinônima
	<i>KRAS</i>	frameshift
	<i>ERC1</i>	não sinônima
2426	<i>PABPC1</i>	não sinônima
	<i>MUC16</i>	não sinônima
	<i>USP6</i>	não sinônima
	<i>SIRPA</i>	frameshift
	<i>KAT6B</i>	inserção
	<i>HLA-A</i>	frameshift
	<i>POT1</i>	não sinônima
433	<i>MUC16</i>	não sinônima
	<i>N4BP2</i>	não sinônima
437	<i>PABPC1</i>	não sinônima

443	<i>PABPC1</i>	não sinônima
	<i>MUC16</i>	não sinônima
	<i>NOTCH2</i>	não sinônima
	<i>N4BP2</i>	não sinônima
	<i>NSD1</i>	não sinônima
455	<i>PABPC1</i>	não sinônima
	<i>MUC16</i>	não sinônima
	<i>SIRPA</i>	não sinônima
	<i>NOTCH1</i>	não sinônima
	<i>ATM</i>	não sinônima
	<i>PTPRC</i>	não sinônima
459	<i>MUC16</i>	não sinônima
	<i>FAT3</i>	não sinônima
	<i>ERCC5</i>	não sinônima

---

Mutações nos genes *PABPC1*, *MUC16* e *SIRPa* estavam presentes em 5/7 pacientes (71,4 %), 6/7 pacientes (85,7 %), e 3/7 pacientes (42,8 %). Essas mutações estavam presentes também nos controles dessa maneira não podemos ligá-las de modo definitivo ao CP.

Alguns genes mutados como *NOTCH1*, *TP53*, *RGPD3*, *USP6*, *NOTCH2* E *ATM* também foram encontrados nesses pacientes mostrando que as vias de interação muitas vezes estão ligadas a um pior prognóstico. Possivelmente as vias afetadas ou as variantes encontradas, não foram suficientemente patogênicas a fim de gerar danos maiores nestes pacientes, ou o diagnóstico e tratamento precoce, evitaram o desfecho desfavorável.

Outro aspecto interessante que neste grupo estavam os pacientes com maior idade e também pacientes com maior número de genes mutados, estes dados nos permitem dizer que nem a quantidade de genes mutados nem o aumento da idade, que apesar de ser um fator de risco para o aparecimento do câncer, não contribuíram decisivamente para uma pior evolução da doença. Em relação aos genes alterados, ao invés de darmos importância ao número de genes mutados, focamos nos genes "chave" e suas interações, que podem potencializar os efeitos patogênicos das mutações.

Estes dados, apesar de não ainda validados, nos permite a criação de um painel genético diferencial onde observamos mutações que possam estar

envolvidas diretamente com a carcinogênese e agressividade do CP. Conhecendo melhor a doença, podemos estabelecer protocolos de tratamento com maior segurança de modo personalizado.

### 5.6.7 CONTROLES

A escolha de controles saudáveis, sem hábitos tabagistas e etilistas, sem lesões penianas sugestivas de HPV ou doenças venéreas, nos permitiu verificar a presença de mutações encontradas igualmente nos pacientes que não serviram de gatilho para o aparecimento do CP até o presente momento.

Estes genes mutados encontrados são vistos também em outros tipos de câncer de acordo com o COSMIC, apesar de ainda não relacionadas ao CP, possivelmente por não participarem de vias importantes neste tipo de tumor.

Observamos que apenas 3 genes são mutados nos controles (*PABPC1*, *MUC16* e *KAT6B*) estando também mutado nos pacientes, no entanto a variante e o tipo de mutação encontrados são distintos o que nos remete a mutações menos agressivas e que muitas vezes estão insoladas.

Essa diferença nos possibilita mostrar que o padrão de mutações entre controles e pacientes são distintos, e que existe uma grande heterogeneidade em genes importantes caracterizados como supressores de tumor e oncogenes, e responsáveis por funções importantes dentro da célula como apoptose, reparo do DNA e migração celular.

## 5.7 PAINEL GENÉTICO

A tecnologia do exoma é uma técnica robusta, no entanto ainda é muito cara devido ao valor dos insumos utilizados e desta forma dificilmente possa ser utilizada na rede pública em larga escala.

Uma alternativa ao exoma, seria a utilização de painéis genéticos onde seriam usados genes alvos já descritos como possíveis causadores do câncer de pênis e/ou preditores de mau prognóstico, barateando assim o valor utilizado nos testes.

Desta forma, ao observar os genes mutados em nosso trabalho, verificamos que existe de fato uma relação dos mesmos ao CP, seja ele de pênis ou não, e

assim selecionamos os principais com o intuito de sugerir um painel para testes e estudos futuros.

Inicialmente os genes sugeridos para o painel são os genes mutados em todos pacientes. Assim, os genes são, **PABPC1, NOTCH1, TP53, NOTCH2, N4BP2, DDX10, ATM, ZNF521, TSC2, STRN, RSPO3, PTPRC, POT1, PDE4DIP, NSD1, NIN, KRAS, JAK2, ERCC5, ERC1, EML4, CBLC e MUC16**. O MUC16 e PABPC1 apesar de aparecerem também nos controles, possuem variantes importantes relacionadas a evolução do câncer, e por isso foram incluídos.

O painel tem a limitação inicial da histologia do câncer, pois foi extraído de lesões tumorais de pacientes portadores de carcinoma espinocelular do pênis (tipo histológico mais frequente).

Mesmo para um painel, o número de genes ainda é grande, no entanto essa quantidade será ajustada de acordo com as necessidades e os resultados encontrados.

Desta forma, após definido, esta ferramenta será adicionada ao arsenal já disponível, visando obter informações com o intuito de melhorar e individualizar (medicina personalizada) os protocolos de tratamento e seguimento dos pacientes portadores de CP, criando dessa forma uma medicina translacional aplicada.

# **Considerações Finais**

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O câncer de pênis é um tipo de câncer raro e muito agressivo, porém ainda é negligenciado por estar presente em sua maioria em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, desta forma poucos são os estudos genéticos que proporcionam dados moleculares a fim de desvendar o mecanismo da carcinogênese neste tipo de tumor.

Observamos em nosso estudo uma grande heterogeneidade genética mutacional tanto dentro dos pacientes quanto em nossos controles. Esta heterogeneidade nos faz acreditar que o CP possa surgir e se desenvolver a partir de diversas vias relacionadas a homeostasia celular.

Apesar de possuir muitos fatores de risco, não pudemos apresentar uma tendência relacionada a algum deles devido ao tamanho de nossa amostra, no entanto verificamos que não existe um padrão social em relação a agressividade e a evolução do tumor.

Observamos também que a presença do HPV não gera nenhum *hotspot* ou causa uma maior agressividade nos pacientes portadores desse vírus, desta forma acreditamos que a presença do HPV no CP é apenas mais um fator sugestivo no aparecimento do tumor pela geração de lesões benignas.

O estudo do exoma do CP nos traz inicialmente uma visão geral dos genes relacionados ao CP e nos fornecem material para estudos dirigidos de novos marcadores moleculares e por consequência a criação de terapias e fármacos voltados diretamente para as vias genéticas alteradas e assim melhorar o prognóstico e sobrevida dos pacientes

### 6.1 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Apesar de ser um estudo inédito em relação ao CP, tivemos algumas limitações em nosso estudo, as principais limitações foram:

1. O tamanho da amostra
2. A presença de poucos pacientes portadores de metástases
3. A falta de validação dos dados

Mesmo com essas limitações, obtivemos dados satisfatórios que nos impulsionam a continuar nosso estudo aumentando o número de amostras e posteriormente validando nossos dados.

# Conclusões



## 7. CONCLUSÕES

→ A tecnologia do exoma é muito robusta na detecção de mutações e doenças e foi possível observar um novo panorama genético relacionado ao CP

→ alguns genes estavam mutados tanto nos pacientes quanto nos controles, no entanto as vias atingidas eram diferentes motivo este que os mesmos genes não atuaram da mesma forma nos diferentes grupos

→ existe uma grande heterogeneidade genética em relação ao tecido tumoral do CP, no entanto os genes mutados presentes neste tecido são em sua maioria responsáveis pelo início e evolução da carcinogênese

→ os genes atribuídos a câncer mais mutados tanto nas amostras quanto os pacientes foram os genes *PABPC1*, *MUC16* e *SIRPa*

→ pelos dados obtidos foi possível sugerir um painel genético para o carcinoma epidermóide de pênis

## **Referências Bibliográficas**

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, A. et al. Genomic landscape of circulating tumor (ct)-DNA alterations in patients with penile cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 37, n. 15\_suppl, p. e16027–e16027, 20 maio 2019.

AKADA, H. et al. Loss of wild-type Jak2 allele enhances myeloid cell expansion and accelerates myelofibrosis in Jak2V617F knock-in mice. **Leukemia**, v. 28, n. 8, p. 1627–1635, 2014.

ALI, S. M. et al. Comprehensive Genomic Profiling of Advanced Penile Carcinoma Suggests a High Frequency of Clinically Relevant Genomic Alterations. **The Oncologist**, v. 21, n. 1, p. 33–39, 1 jan. 2016.

ANGELE, S. et al. Abnormal expression of the ATM and TP53 genes in sporadic breast carcinomas. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 9, p. 3536–3544, 2000.

ARNAOUTOV, A. et al. Crm1 is a mitotic effector of Ran-GTP in somatic cells. **Nature Cell Biology**, v. 7, n. 6, p. 626–632, 2005.

ARYA, M. et al. Long-term trends in incidence, survival and mortality of primary penile cancer in England. **Cancer causes & Control: CCC**, v. 24, n. 12, p. 2169–2176, 2013.

ASTER, J. C.; PEAR, W. S.; BLACKLOW, S. C. The Varied Roles of Notch in Cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 12, n. 1, p. 245–275, 2017.

AUDENET, F.; SFAKIANOS, J. P. Psychosocial impact of penile carcinoma. **Translational Andrology and Urology**, v. 6, n. 5, p. 874–878, 2017.

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

BARNES, K. T. et al. **Obesity and invasive penile cancer European Urology**, mar. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23219085>>. Acesso em: 2 abr. 2020

BARNES, K. T. et al. Obesity is associated with increased risk of invasive penile cancer. **BMC Urology**, v. 16, n. 1, p. 7–10, 2016.

BASEN-ENGQUIST, K.; CHANG, M. Obesity and cancer risk: Recent review and evidence. **Current Oncology Reports**, v. 13, n. 1, p. 71–76, 2011.

BAST, J. et al. CA 125: The past and the future. **International Journal of Biological Markers**, v. 13, n. 4, p. 179–187, 1998.

BASU, A.; MONDAL, A.; KELA, H. Penile cancer: a case series in two tertiary care teaching hospitals with review of literature. **Sri Lanka Journal of Surgery**, v. 35, n. 4, p. 12, 29 dez. 2017.

BEHERA, R. et al. Activation of JAK2/STAT3 signaling by osteopontin promotes tumor growth in human breast cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 2, p. 192–200, 2010.

BERK, B. et al. **Circumcision: Pros and cons Indian Journal of Urology** Wolters

Kluwer -- Medknow Publications, , 1 jan. 2010.

BHATIA, N. et al. MAGE-C2 promotes growth and tumorigenicity of melanoma cells, phosphorylation of KAP1, and DNA damage repair. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 3, p. 759–767, 2013.

BLEEKER, M. C. G. et al. Penile cancer: Epidemiology, pathogenesis and prevention. **World Journal of Urology**, v. 27, n. 2, p. 141–150, 2009.

BOND, H. M. et al. Early hematopoietic zinc finger protein (EHZF), the human homolog to mouse Evi3, is highly expressed in primitive human hematopoietic cells. **Blood**, v. 103, n. 6, p. 2062–2070, 2004.

BOND, H. M. et al. ZNF423: A new player in estrogen receptor-positive breast cancer. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, n. MAY, p. 1–10, 2018.

BOOHAKER, R.; XU, B. The versatile functions of ATM kinase. **Biomedical Journal**, v. 37, n. 1, p. 3–9, 2014.

BOORA, G. K. et al. Exome-level comparison of primary well-differentiated neuroendocrine tumors and their cell lines. **Cancer Genetics**, v. 208, n. 7–8, p. 374–381, 2015.

BOSCH, F. X.; CARDIS, E. Cancer incidence correlations: Genital, urinary and some tobacco-related cancers. **International Journal of Cancer**, v. 46, n. 2, p. 178–184, 1990.

BROMAGE, S. J.; CRUMP, A.; PEARCE, I. Phimosi as a presenting feature of diabetes. **BJU International**, v. 101, n. 3, p. 338–340, 2008.

BURGERS, J. K.; BADALAMENT, R. A.; DRAGO, J. R. Penile cancer. Clinical presentation, diagnosis, and staging. **The Urologic clinics of North America**, v. 19, n. 2, p. 247–56, 1 maio 1992.

CANTOR, S. B. et al. BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function. **Cell**, v. 105, n. 1, p. 149–160, 2001.

CANZAR, S.; RINGELING, F. R. **Protein-Protein Interaction Networks**. [s.l.: s.n.].

CAPSTICK, V. et al. Clinical evaluation of a new two-site assay for CA 125 antigen. **International Journal of Biological Markers**, v. 6, n. 2, p. 129–135, 1991.

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.

CHEN, H. Y.; CHEN, R. H. Cullin 3 ubiquitin ligases in cancer biology: Functions and therapeutic implications. **Frontiers in Oncology**, v. 6, n. MAY, 2016.

CHEN, S.-H. et al. Mucin 16 is a functional selectin ligand on pancreatic cancer cells. **The FASEB Journal**, v. 26, n. 3, p. 1349–1359, 2012.

CHENG, J. et al. Functional analysis of Cullin 3 E3 ligases in tumorigenesis. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1869, n. 1, p. 11–28, 2018.

CHENG, M. et al. The m6A methyltransferase METTL3 promotes bladder cancer progression via AFF4/NF- $\kappa$ B/MYC signaling network. **Oncogene**, v. 38, n. 19, p. 3667–3680, 2019.

CHIN, L. K. et al. 11q23 rearrangement and duplication of MLLT1-MLL gene fusion in therapy-related acute myeloid leukemia. **Leukemia and Lymphoma**, v. 53, n. 10, p.

2066–2068, 2012.

CHOI, Y. et al. Integrative analysis of oncogenic fusion genes and their functional impact in colorectal cancer. **British Journal of Cancer**, v. 119, n. 2, p. 230–240, 2018.

CHU, D. et al. Notch2 expression is decreased in colorectal cancer and related to tumor differentiation status. **Annals of Surgical Oncology**, v. 16, n. 12, p. 3259–3266, 2009.

CICCARELLI, F. D. et al. Complex genomic rearrangements lead to novel primate gene function. **Genome Research**, v. 15, n. 3, p. 343–351, 2005.

CIMADAMORE, A. et al. Molecular characterization and diagnostic criteria of renal cell carcinoma with emphasis on liquid biopsies. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 20, n. 2, p. 141–150, 2020.

COELHO, R. W. P. et al. Penile cancer in Maranhão, Northeast Brazil: The highest incidence globally? **BMC Urology**, v. 18, n. 1, p. 1–7, 2018.

CRABTREE, J. S.; SINGLETON, C. S.; MIELE, L. Notch signaling in neuroendocrine tumors. **Frontiers in Oncology**, v. 6, n. APR, p. 1–11, 2016.

CREMONA, C. A.; BEHRENS, A. ATM signalling and cancer. **British Dental Journal**, v. 217, n. 1, p. 3351–3360, 2014.

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. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 24, n. 4, p. 505–512, 2000.

D’HAUWERS, K. W. M. et al. Human papillomavirus, lichen sclerosus and penile cancer: A study in Belgium. **Vaccine**, v. 30, n. 46, p. 6573–6577, 2012.

DEMEHRI, S.; TURKOZ, A.; KOPAN, R. Epidermal Notch1 Loss Promotes Skin Tumorigenesis by Impacting the Stromal Microenvironment. **Cancer Cell**, v. 16, n. 1, p. 55–66, 2009.

DENG, P. et al. AFF4 promotes tumorigenesis and tumor-initiation capacity of head and neck squamous cell carcinoma cells by regulating SOX2. **Carcinogenesis**, v. 39, n. 7, p. 937–947, 2018.

DEVINE, P. L.; MCKENZIE, I. F. C. Mucins: Structure, function, and associations with malignancy. **BioEssays**, v. 14, n. 9, p. 619–625, 1992.

DILLNER, J. et al. Etiology of squamous cell carcinoma of the penis. **Scandinavian Journal of Urology and Nephrology, Supplement**, v. 34, n. 205, p. 189–193, 2000.

DO 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.

DORR, C. et al. Transposon mutagenesis screen identifies potential lung cancer drivers and CUL3 as a tumor suppressor. **Molecular Cancer Research**, v. 13, n. 8, p. 1238–1247, 2015.

DOU, L. et al. Methylation-mediated repression of microRNA-143 enhances MLL-AF4 oncogene expression. **Oncogene**, v. 31, n. 4, p. 507–517, 2012.

DOUGLAWI, A.; MASTERSON, T. A. Updates on the epidemiology and risk factors for penile cancer. **Translational Andrology and Urology**, v. 6, n. 5, p. 785–790, 2017.

DOUGLAWI, A.; MASTERSON, T. A. Penile cancer epidemiology and risk factors: a

- contemporary review. **Current opinion in urology**, v. 29, n. 2, p. 145–149, 2019.
- EMMANUEL, A. et al. The molecular pathogenesis of penile carcinoma—current developments and understanding. **Virchows Archiv**, 2019.
- ERB, M. A. et al. Transcription control by the ENL YEATS domain in acute leukaemia. **Nature**, v. 543, n. 7644, p. 270–274, 2017.
- FAN, Z. et al. BCOR regulates mesenchymal stem cell function by epigenetic mechanisms. **Nature Cell Biology**, v. 11, n. 8, p. 1002–1009, 2009.
- FAVORITO, L. A. et al. Epidemiologic study on penile cancer in Brazil. **International Braz J Urol**, v. 34, n. 5, p. 587–591, 2008.
- FERLAY, J. et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **International journal of cancer**, v. 144, n. 8, p. 1941–1953, 2019.
- FICARRA, V. et al. [Comparison of the quality of life of patients treated by surgery or radiotherapy in epidermoid cancer of the penis]. **Progres en urologie : journal de l'Association francaise d'urologie et de la Societe francaise d'urologie**, v. 9, n. 4, p. 715–20, 1 set. 1999.
- FICARRA, V. et al. Prognostic factors in penile cancer. **Urology**, v. 76, n. SUPPL. 2, p. S66–S73, 2010.
- FLAHERTY, A. et al. Implications for human papillomavirus in penile cancer. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 32, n. 1, p. 53.e1-53.e8, 2014.
- FONSECA, A. G. DA et al. Estudo epidemiológico do câncer de pênis no Estado do Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, p. 85–90, jun. 2010.
- FOUAD, Y. A.; AANEI, C. Revisiting the hallmarks of cancer. **Am J Cancer Res**, v. 7, n. 5, p. 1016–1036, 2017.
- FRANKUM, J. et al. Complementary genetic screens identify the E3 ubiquitin ligase CBLC, as a modifier of PARP inhibitor sensitivity. **Oncotarget**, v. 6, n. 13, p. 10746–10758, 2015.
- FRISCH, M. et al. Falling incidence of penis cancer in an uncircumcised population (Denmark 1943-90). **BMJ**, v. 311, n. 7018, p. 1471, 2 dez. 1995.
- FUJIMOTO, A. et al. Whole-genome mutational landscape and characterization of noncoding and structural mutations in liver cancer. **Nature Genetics**, v. 48, n. 5, p. 500–509, 2016.
- GADD, S. et al. A Children's Oncology Group and TARGET initiative exploring the genetic landscape of Wilms tumor. **Nature Genetics**, v. 49, n. 10, p. 1487–1494, 2017.
- GAI, M.; BO, Q.; QI, L. Epigenetic down-regulated DDX10 promotes cell proliferation through Akt/NF-κB pathway in ovarian cancer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 469, n. 4, p. 1000–1005, 2016.
- GAO, J. et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. **Science Signaling**, v. 6, n. 269, 2013.
- GENSCHIK, P.; SUMARA, I.; LECHNER, E. The emerging family of CULLIN3-RING ubiquitin ligases (CRL3s): Cellular functions and disease implications. **EMBO Journal**, v. 32, n. 17, p. 2307–2320, 2013.
- GHORESCHI, K.; LAURENCE, A.; O'SHEA, J. J. Janus kinases in immune cell

- signaling. **Immunological Reviews**, v. 228, n. 1, p. 273–287, 2009.
- GONCHAROVA, E. A. et al. Modulation of cell migration and invasiveness by tumor suppressor TSC2 in lymphangiomyomatosis. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 34, n. 4, p. 473–480, 2006.
- GRAAFLAND, N. M. et al. Incidence trends and survival of penile squamous cell carcinoma in the Netherlands. **International Journal of Cancer**, v. 128, n. 2, p. 426–432, 2011.
- GRIDLEY, T. Notch signaling in vascular development and physiology. **Development**, v. 134, n. 15, p. 2709–2718, 2007.
- GUIMARÃES, G. C. et al. Penile cancer: Epidemiology and treatment. **Current Oncology Reports**, v. 13, n. 3, p. 231–239, 2011.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 7 jan. 2000.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, 2011.
- HARRY, B. L.; ECKHARDT, S. G.; JIMENO, A. JAK2 inhibition for the treatment of hematologic and solid malignancies. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 21, n. 5, p. 637–655, 2012.
- HAUSEN, H. ZUR. The role of papillomaviruses in anogenital cancer. **Scandinavian journal of infectious**, v. 69, p. 107–111, 1990.
- HERMIDA, M. A.; DINESH KUMAR, J.; LESLIE, N. R. GSK3 and its interactions with the PI3K/AKT/mTOR signalling network. **Advances in Biological Regulation**, v. 65, p. 5–15, 2017.
- HONG, S. Y. et al. Upregulation of E3 ubiquitin ligase CBLC enhances EGFR dysregulation and signaling in lung adenocarcinoma. **Cancer Research**, v. 78, n. 17, p. 4984–4996, 2018.
- HUAN, C.; XIAOXU, C.; XIFANG, R. Zinc Finger Protein 521, Negatively Regulated by MicroRNA-204-5p, Promotes Proliferation, Motility and Invasion of Gastric Cancer Cells. **Technology in cancer research & treatment**, v. 18, n. 4, p. 1–10, 2019.
- HUANG, H. T. et al. Loss of function of SWI/SNF chromatin remodeling genes leads to genome instability of human lung cancer. **Oncology Reports**, v. 33, n. 1, p. 283–291, 2015.
- IBRAHIM, F. F. et al. MicroRNA-200c and microRNA-31 regulate proliferation, colony formation, migration and invasion in serous ovarian cancer. **Journal of Ovarian Research**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2015.
- INCA 2019. **Atlas On-line de Mortalidade**. Disponível em: <https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/>. Acesso em: 15 out. 2019.
- INCA 2019. **Câncer de pênis**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-penis>. Acesso em: 20 set. 2019.
- JACKSON, S. P.; BARTEK, J. The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature**, v. 461, n. 7267, p. 1071–1078, 2009.
- JEON, M. J. et al. Mutational profile of papillary thyroid microcarcinoma with extensive lymph node metastasis. **Endocrine**, v. 64, n. 1, p. 130–138, 2019.

JONCKHEERE, N.; VAN SEUNINGEN, I. The membrane-bound mucins: From cell signalling to transcriptional regulation and expression in epithelial cancers. **Biochimie**, v. 92, n. 1, p. 1–11, 2010.

JOSEPH, J. et al. The RanGAP1-RanBP2 complex is essential for microtubule-kinetochore interactions in vivo. **Current Biology**, v. 14, n. 7, p. 611–617, 6 abr. 2004.

KANNAN, A. et al. Genetic Mutation and Exosome Signature of Human Papilloma Virus Associated Oropharyngeal Cancer. **Scientific Reports**, v. 7, n. March, p. 1–10, 2017.

KAWAMOTO, H. et al. Thyroid metastasis from lung adenocarcinoma with EML4-ALK rearrangement. **BMJ Case Reports**, v. 2016, p. 4–7, 2016.

KAYES, O. et al. Molecular and genetic pathways in penile cancer. **Lancet Oncology**, v. 8, n. 5, p. 420–429, 2007.

KELLY, L. M. et al. Identification of the transforming STRN-ALK fusion as a potential therapeutic target in the aggressive forms of thyroid cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 11, p. 4233–4238, 2014.

KIDA, Y. et al. Tuberous sclerosis, associated with renal cell carcinoma and angiomyolipoma, in a patient who developed endstage renal failure after nephrectomy. **Clinical and Experimental Nephrology**, v. 9, n. 2, p. 179–182, 2005.

KIM, B. et al. Breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1) is destabilized by the Cul3-SPOP E3 ubiquitin ligase complex. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 415, n. 4, p. 720–726, 2011.

KIM, H. et al. Mutation Analysis for BRIP1 in Korean Patients with BRCA1/2 Mutations-Negative High-Risk Breast Cancer. **Annals of Oncology**, v. 25, n. Supplement 1, p. i5, 2014.

KODANI, A. et al. Kif3a interacts with Dynactin subunit p150 Glued to organize centriole subdistal appendages. **EMBO Journal**, v. 32, n. 4, p. 597–607, 2013.

KOIFMAN, L. et al. Epidemiological aspects of penile cancer in Rio de Janeiro: Evaluation of 230 cases. **International Braz J Urol**, v. 37, n. 2, p. 231–240, 2011.

KOPAN, R.; ILAGAN, M. X. G. The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. **Cell**, v. 137, n. 2, p. 216–233, 2009.

KOVEITYPOUR, Z. et al. Signaling pathways involved in colorectal cancer progression. **Cell and Bioscience**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2019.

KROON, B. K.; HORENBLAS, S.; NIEWEG, O. E. Contemporary management of penile squamous cell carcinoma. **Journal of Surgical Oncology**, v. 89, n. 1, p. 43–50, 2005.

KUFE, D. W. Mucins in cancer: Function, prognosis and therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 12, p. 874–885, 2009.

KUMTA, S. M. et al. Expression of VEGF and MMP-9 in giant cell tumor of bone and other osteolytic lesions. **Life Sciences**, v. 73, n. 11, p. 1427–1436, 2003.

KUSANO, H. et al. Two cases of renal cell carcinoma harboring a novel STRN-ALK fusion gene. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 40, n. 6, p. 761–769, 2016.

LA ROCCA, R. et al. Early Hematopoietic Zinc Finger Protein Prevents Tumor Cell Recognition by Natural Killer Cells. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 8, p.



4529–4537, 2009.

LAM, H. C.; NIJMEH, J.; HENSKE, E. P. New developments in the genetics and pathogenesis of tumours in tuberous sclerosis complex. **Journal of Pathology**, v. 241, n. 2, p. 219–225, 2017.

LANE, D.; LEVINE, A. p53 Research: the past thirty years and the next thirty years. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 12, p. 1–11, 2010.

LEVINE, A. J.; OREN, M. The first 30 years of p53: Growing ever more complex. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 10, p. 749–758, 2009.

LI, J. et al. Long noncoding RNA ZFPM2-AS1 is involved in lung adenocarcinoma via miR-511-3p/AFF4 pathway. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 121, n. 3, p. 2534–2542, 2020.

LI, T. et al. MicroRNA-224 sustains Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and promotes aggressive phenotype of colorectal cancer. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 35, n. 1, p. 21, 29 jan. 2016.

LIAO Y. et al. WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs. **Nucleic Acids Res.** 2019 Jul 2;47(W1):W199-W205.

LIN, A. C. et al. The N termini of Friend of GATA (FOG) proteins define a novel transcriptional repression motif and a superfamily of transcriptional repressors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 53, p. 55017–55023, 2004.

LIN, C. et al. AFF4, a Component of the ELL/P-TEFb Elongation Complex and a Shared Subunit of MLL Chimeras, Can Link Transcription Elongation to Leukemia. **Molecular Cell**, v. 37, n. 3, p. 429–437, 2010.

LIN, Y.-P. et al. **Abstract 2642: CBLC is a potential biomarker for the susceptibility to paclitaxel in lung adenocarcinoma.** Cancer Research. **Anais...American Association for Cancer Research (AACR)**, 1 jul. 2018

LIU, C. et al. Bilateral breast adenocarcinomas with EML4–ALK fusion in a patient with multiple metastases successfully treated with crizotinib: Is lung the primary site? **Oncotargets and Therapy**, v. 9, p. 3589–3593, 2016.

LIU, K. D.; GAFFEN, S. L.; GOLDSMITH, M. A. JAK/STAT signaling by cytokine receptors. **Current Opinion in Immunology**, v. 10, n. 3, p. 271–278, 1 jun. 1998.

LIU, Q. et al. Effects of the ninein-like protein centrosomal protein on breast cancer cell invasion and migration. **Molecular medicine reports**, v. 12, n. 2, p. 1659–1664, 2015.

LOIGNON, M. et al. Cul3 overexpression depletes Nrf2 in breast cancer and is associated with sensitivity to carcinogens, to oxidative stress, and to chemotherapy. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 8, n. 8, p. 2432–2440, 2009.

LOONG, H. H. et al. Clinical Application of Genomic Profiling With Circulating Tumor DNA for Management of Advanced Non–Small-cell Lung Cancer in Asia. **Clinical Lung Cancer**, v. 19, n. 5, p. e601–e608, 2018.

LUO, Z. et al. The Super Elongation Complex Family of RNA Polymerase II Elongation Factors: Gene Target Specificity and Transcriptional Output. **Molecular and Cellular Biology**, v. 32, n. 13, p. 2608–2617, 2012.

MACDONALD, F.; DOWNING, R.; ALLUM, W. H. Expression of CA125 in pancreatic carcinoma and chronic pancreatitis. **British Journal of Cancer**, v. 58, n. 4, p. 505–506, 1988.

- MADDINENI, S. B.; LAU, M. M.; SANGAR, V. K. Identifying the needs of penile cancer sufferers: A systematic review of the quality of life, psychosexual and psychosocial literature in penile cancer. **BMC Urology**, v. 9, n. 1, p. 1–6, 2009.
- MAILLET, D. et al. Ineffectiveness of crizotinib on brain metastases in two cases of lung adenocarcinoma with EML4-ALK rearrangement. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 8, n. 4, p. e30–e31, 2013.
- MAJEWSKI, I. J. et al. Identification of recurrent FGFR3 fusion genes in lung cancer through kinome-centred RNA sequencing. **Journal of Pathology**, v. 230, n. 3, p. 270–276, 2013.
- MANN, M. B. et al. Sleeping Beauty mutagenesis: Exploiting forward genetic screens for cancer gene discovery. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 24, n. 1, p. 16–22, 2014.
- MARCHI, F. A. et al. Multidimensional integrative analysis uncovers driver candidates and biomarkers in penile carcinoma. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.
- MESURACA, M. et al. ZNF423 and ZNF521: EBF1 antagonists of potential relevance in B-lymphoid malignancies. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.
- MEYER, A. et al. ATM não sinônima variant P1054R predisposes to prostate cancer. **Radiotherapy and Oncology**, v. 83, n. 3, p. 283–288, 2007.
- MIRALLES-GURI, C. et al. Human papillomavirus prevalence and type distribution in penile carcinoma. **Journal of Clinical Pathology**, v. 62, n. 10, p. 870–878, 2009.
- MUELLER, D. et al. A role for the MLL fusion partner ENL in transcriptional elongation and chromatin modification. **Blood**, v. 110, n. 13, p. 4445–4454, 2007.
- MUÑOZ, N. et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 6, p. 518–527, 2003.
- MURIEL, B.; MACHICADO, C. G. Employment and labor regulation: Evidence from manufacturing firms in Bolivia, 1988 - 2007. In: **Development Research Working Paper Series**. [s.l.: s.n.]. v. 7p. 1–46.
- NAKAMURA, T. et al. A novel transcriptional unit of the *trc* oncogene widely expressed in human cancer cells. **Oncogene**, v. 7, n. 4, p. 733–741, 1 abr. 1992.
- NARAMURA, M. et al. Mutant Cbl proteins as oncogenic drivers in myeloproliferative disorders. **Oncotarget**, v. 2, n. 3, p. 245–250, 2011.
- NAVARRO, M. S.; BACHANT, J. RanBP2: A Tumor Suppressor with a New Twist on Topoll, SUMO, and Centromeres. **Cancer Cell**, v. 13, n. 4, p. 293–295, 2008.
- NICOLAS, M. et al. Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. **Nature Genetics**, v. 33, n. 3, p. 416–421, 2003.
- NILSON, I. et al. Exon/intron structure of the human AF-4 gene, a member of the AF-4/LAF-4/FMR-2 gene family coding for a nuclear protein with structural alterations in acute leukaemia. **British Journal of Haematology**, v. 98, n. 1, p. 157–169, 1997.
- NOVAC, B. et al. Psychological/psychiatric trauma in patients with penile cancer and partial or total penectomy. **Archives of Biological Sciences**, v. 65, n. 4, p. 1293–1298, 2013.
- OLIVIER, M.; HOLLSTEIN, M.; HAINAUT, P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. **Cold Spring Harbor perspectives in**

**biology**, v. 2, n. 1, p. 1–18, 1 jan. 2010.

OTA, K. et al. Induction of PD-L1 expression by the EML4-ALK oncoprotein and down stream signaling pathways in non-small cell lung cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 17, p. 4014–4021, 2015.

OUHTIT, A.; GUPTA, I.; SHAIKH, Z. BRIP1, a potential candidate gene in development of non-BRCA1/2 breast cancer. **Frontiers in Bioscience - Elite**, v. 8, n. 2, p. 289–298, 2016.

PABALAN, N.; JARJANAZI, H.; OZCELIK, H. Association between BRIP1 (BACH1) polymorphisms and breast cancer risk: A meta-analysis. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 137, n. 2, p. 553–558, 2013.

PANAGOPOULOS, I. et al. Fusion of the COL1A1 and USP6 genes in a benign bone tumor. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 180, n. 1, p. 70–73, 2008.

PARKIN, D. et al. Cancer incidence in five continents. **International Agency for Research on Cancer World Health Organization**, v. 143, n. 3, p. 1028–1029, 1997.

PARR, C.; WATKINS, G.; JIANG, W. G. The possible correlation of Notch-1 and Notch-2 with clinical outcome and tumour clinicopathological parameters in human breast cancer. **International journal of molecular medicine**, v. 14, n. 5, p. 779–786, 2004.

PATEL, J. S. et al. Matrix-Metalloprotease Resistant Mucin-16 (MUC16) Peptide Mutants Represent a Worse Lung Adenocarcinoma Outcome. **Proteomics - Clinical Applications**, v. 13, n. 4, p. 1–8, 2019.

PÉROT, G. et al. Identification of a recurrent STRN/ALK fusion in thyroid carcinomas. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2014.

PETROCHILLOS, D. et al. Using random walks to identify cancer-associated modules in expression data. **BioData Mining**, v. 6, n. 1, 2013.

PIZZOCARO, G. et al. EAU Penile Cancer Guidelines 2009. **European Urology**, v. 57, n. 1, p. 1002–1012, 2010.

POW-SANG, M.; ASTIGUETA, J. HPV infection and the risk of penile cancer. **Journal of Andrological Sciences**, v. 16, n. 1, p. 1–6, 2009.

PREVIS, R. A. et al. Molecular pathways: Translational and therapeutic implications of the notch signaling pathway in cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 5, p. 955–961, 2015.

PUI, C. H. et al. Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region. **Lancet**, v. 359, n. 9321, p. 1909–1915, 2002.

PYLKÄS, K. et al. Rare copy number variants observed in hereditary breast cancer cases disrupt genes in estrogen signaling and TP53 tumor suppression network. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 6, 2012.

QIU, H. JIANG et al. MiR-769 promoted cell proliferation in human melanoma by suppressing GSK3B expression. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 82, p. 117–123, 2016.

QU, D. et al. Increased expression of Nlp, a potential oncogene in ovarian cancer, and its implication in carcinogenesis. **Gynecologic Oncology**, v. 110, n. 2, p. 230–236, 2008.

RAMALHO, A. S. et al. Molecular targets for therapeutic interventions in human

papillomavirus-related cancers. **Oncology Reports**, v. 24, n. 6, p. 1419–1426, 26 out. 2010.

REDDY, D. G.; BARUAH, I. K. Carcinogenic action of human smegma. **Archives of pathology**, v. 75, p. 414–20, abr. 1963.

RENIERI, A. et al. Oligogenic germline mutations identified in early non-smokers lung adenocarcinoma patients. **Lung Cancer**, v. 85, n. 2, p. 168–174, 2014.

RIPKA, S. et al. CUX1: Target of Akt signalling and mediator of resistance to apoptosis in pancreatic cancer. **Gut**, v. 59, n. 8, p. 1101–1110, 2010.

ROCKS, N. et al. ADAMTS-1 metalloproteinase promotes tumor development through the induction of a stromal reaction in vivo. **Cancer Research**, v. 68, n. 22, p. 9541–9550, 2008.

RODNEY, S. et al. molecular markers in penile cancer. **Current Problems in Cancer**, v. 39, p. 137–145, 2015.

ROWLEY, J. D. the Critical Role of Chromosome Translocations in Human Leukemias. **Annual Review of Genetics**, v. 32, n. 1, p. 495–519, 1998.

SAHIN, I. et al. Glycogen synthase kinase-3 beta inhibitors as novel cancer treatments and modulators of antitumor immune responses. **Cancer Biology and Therapy**, v. 20, n. 8, p. 1047–1056, 2019.

SATTAR, M.; MAJID, A. Lung Cancer Classification Models Using Discriminant Information of Mutated Genes in Protein Amino Acids Sequences. **Arabian Journal for Science and Engineering**, v. 44, n. 4, p. 3197–3211, 2019.

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. 467–474, 2008.

SCHIFFMAN, M. et al. **Human papillomavirus and cervical cancer** *Lancet* Elsevier, , 8 set. 2007.

SESHAGIRI, S. et al. Recurrent R-spondin fusions in colon cancer. **Nature**, v. 488, n. 7413, p. 660–664, 2012.

SHEN, H. et al. MicroRNA-29a contributes to drug-resistance of breast cancer cells to adriamycin through PTEN/AKT/GSK3 $\beta$  signaling pathway. **Gene**, v. 593, n. 1, p. 84–90, 2016.

SHILATIFARD, A.; CONAWAY, R. C.; CONAWAY, J. W. The RNA Polymerase II Elongation Complex. **Annual Review of Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 693–715, 2003.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2019. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 69, n. 1, p. 7–34, 2019.

SIGNORETTI, S. et al. Metastatic penile carcinoma associated with convergent gain-of-function mutations in NOTCH1. **Human Pathology: Case Reports**, v. 11, n. 2, p. 19–20, 2018.

SIMPSON, W. G. et al. Analysis of Suicide Risk in Patients with Penile Cancer and Review of the Literature. **Clinical Genitourinary Cancer**, v. 16, n. 2, p. e257–e261, 1 abr. 2018.

SKOWRONSKA, A. et al. Biallelic ATM inactivation significantly reduces survival in patients treated on the United Kingdom leukemia research fund chronic lymphocytic leukemia 4 trial. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n. 36, p. 4524–4532, 2012.

SODA, M. et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. **Nature**, v. 448, n. 7153, p. 561–566, 2007.

SOLUS, J. F. et al. Cutaneous squamous cell carcinoma progression is associated with decreased GATA-3 immunohistochemical staining. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 43, n. 4, p. 347–353, 2016.

SPIESS, P. E. et al. Pathophysiological basis of human papillomavirus in penile cancer: Key to prevention and delivery of more effective therapies. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 66, n. 6, p. 481–495, 2016.

SRINIVASAN, R. S.; DE ERKENEZ, A. C.; HEMENWAY, C. S. The mixed lineage leukemia fusion partner AF9 binds specific isoforms of the BCL-6 corepressor. **Oncogene**, v. 22, n. 22, p. 3395–3406, 2003.

STREPPPEL, M. M. et al. Mucin 16 (cancer antigen 125) expression in human tissues and cell lines and correlation with clinical outcome in adenocarcinomas of the pancreas, esophagus, stomach, and colon. **Human Pathology**, v. 43, n. 10, p. 1755–1763, 2012.

SUN, M. et al. Activation of the ATM-Snail pathway promotes breast cancer metastasis. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 5, p. 304–315, 2012.

TENNEY, K.; SHILATIFARD, A. A COMPASS in the voyage of defining the role of trithorax/MLL-containing complexes: Linking leukemogenesis to covalent modifications of chromatin. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 95, n. 3, p. 429–436, 2005.

THEODOROU, V. et al. MMTV insertional mutagenesis identifies genes, gene families and pathways involved in mammary cancer. **Nature Genetics**, v. 39, n. 6, p. 759–769, 2007.

**UICC | Leading the global fight against cancer.** Disponível em: <<https://www.uicc.org/>>. Acesso em: 2 março. 2020.

TSENG, L. W. A.; BIXBY, J. L. Interaction of an intracellular pentraxin with a BTB-Kelch protein is associated with ubiquitylation, aggregation and neuronal apoptosis. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 47, n. 4, p. 254–264, 2011.

VAN DER AUWERA GA, et al. From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinformatics*. 43:11.10.1-11.10.33.2013; TWARD, J. et al. Incidence, risk factors, and pathogenesis of second malignancies in patients with non-Hodgkin lymphoma. **Leukemia and Lymphoma**, v. 48, n. 8, p. 1482–1495, 2007.

WALBOOMERS, J. M. M. et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **The Journal of Pathology**, v. 189, n. 1, p. 12–19, 1 set. 1999.

WALLINGFORD, M. C. et al. Identification of a novel isoform of the leukemia-associated MLLT1 (ENL/LTG19) protein. **Gene Expression Patterns**, v. 17, n. 1, p. 11–15, 2015.

WANG, J. et al. FBW7 regulates DNA interstrand cross-link repair by modulating FAAP20 degradation. **Oncotarget**, v. 7, n. 24, p. 35724–35740, 2016.

WANG, N. J. et al. Loss-of-function mutations in Notch receptors in cutaneous and lung squamous cell carcinoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 43, p. 17761–17766, 2011.

WHO 2019. **CANCER TOMORROW**. Disponível em: <http://gco.iarc.fr/tomorrow/home>. Acesso em: 6 set. 2019.

WITTY, K. et al. The impact of surgical treatment for penile cancer - Patients' perspectives. **European Journal of Oncology Nursing**, v. 17, n. 5, p. 661–667, 2013.

YAMAGISHI, H. et al. Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers. **Chinese Journal of Cancer**, v. 35, n. 1, p. 1–8, 2016.

YANG, E. S. et al. Kinase analysis of penile squamous cell carcinoma on multiple platforms to identify potential therapeutic targets. **Oncotarget**, v. 8, n. 13, p. 21710–21718, 2017.

YANG, M. H. et al. Overexpression of NBS1 induces epithelial-mesenchymal transition and co-expression of NBS1 and Snail predicts metastasis of head and neck cancer. **Oncogene**, v. 26, n. 10, p. 1459–1467, 2007.

YOST, C. et al. The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of  $\beta$ -catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. **Genes and Development**, v. 10, n. 12, p. 1443–1454, 15 jun. 1996.

YU, C. et al. Sexual Function after Partial Penectomy: A Prospectively Study from China. **Scientific Reports**, v. 6, p. 4–7, 2016.

YU, L. et al. [Constitutive activation and clinical significance of Stat3 in human gastric cancer tissues and cell lines]. **Zhonghua yi xue za zhi**, v. 84, n. 24, p. 2064–9, 17 dez. 2004.

YU, L. et al. Ninein-like protein is overexpressed in head and neck squamous cell carcinoma and contributes to cancer growth and resistance to apoptosis. **Oncology Reports**, v. 22, n. 4, p. 789–798, 1 out. 2009.

ZENG, H. et al. As an independent prognostic factor, USP6 promotes the invasion and metastasis of colon cancer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2018.

ZHENG, H. et al. Phosphorylated GSK3 $\beta$ -ser9 and EGFR are good prognostic factors for lung carcinomas. **Anticancer Research**, v. 27, n. 5 B, p. 3561–3569, 2007.

ZHOU, C. C. et al. AFF1 and AFF4 differentially regulate the osteogenic differentiation of human MSCs. **Bone Research**, v. 5, n. April, p. 1–10, 2017.

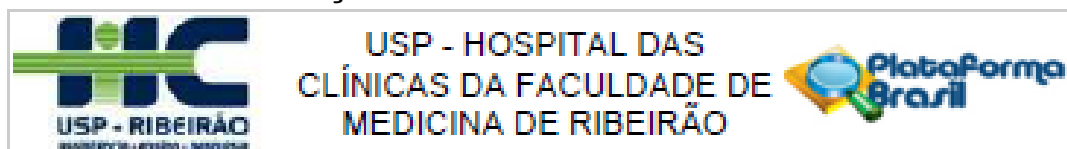
ZHOU, J. et al. Cullin 3 overexpression inhibits lung cancer metastasis and is associated with survival of lung adenocarcinoma. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 37, n. 1, p. 115–124, 2020.

ZHOU, Q.-H. et al. Molecular characterization and integrative genomic analysis of a panel of newly established penile cancer cell lines. **Cell death & disease**, v. 9, n. 6, p. 684, 2018.

# Anexos

## 9. ANEXOS

### ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Estudo do exoma do carcinoma epidermóide de pênis

**Pesquisador:** RENATO MENDES ROSSI DE LUCCA

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 60513616.2.0000.5440

**Instituição Proponente:** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.909.052

##### Apresentação do Projeto:

O Câncer de pênis (CP) é uma doença rara, sendo o tipo histológico mais comum o Carcinoma epidermóide, que responde por aproximadamente 95% dos casos relatados. No Brasil o CP representa cerca de 2 a 4% dentre todos os tipos de câncer no sexo masculino, sendo mais frequente nas regiões Norte (3,8%) e Nordeste (5,3%), onde ultrapassa até mesmo os casos de câncer da próstata e bexiga. São conhecidos atualmente alguns fatores de risco para o desenvolvimento do CP (tabagismo, a promiscuidade sexual (múltiplos parceiros; zoofilia), a infecção genital pelo papiloma vírus humano (principalmente os subtipos 16 e 18), e as inflamações crônicas do pênis (balanopostites; liquen esclero-atrófico e balanite xerótica obliterante). O CP, se não tratado nos seus estágios iniciais, pode ser muito agressivo e acarretar grande morbidade, tanto pela doença em si quanto pelo tratamento. O tratamento desde quimioterapia tópica ou ablação a laser, mas pode ser necessário ressecção cirúrgica. A penectomia parcial, total ou até mesmo a emasculação são procedimentos cirúrgicos frequentemente utilizados e que causam grande impacto na autoestima e qualidade de vida dos pacientes. A busca por fatores de risco para o desenvolvimento do tumor são extensos sendo alguns genes ligados ao aparecimento do mesmo. Não há porém ainda estudos de equenciamento em larga escala para este tipo de tumor

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO		CEP: 14.048-900
Bairro: MONTE ALEGRE		
UF: SP	Município: RIBEIRÃO PRETO	
Telefone: (16)3802-2228	Fax: (16)3833-1144	E-mail: cep@hcrp.usp.br





USP - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA FACULDADE DE  
MEDICINA DE RIBEIRÃO



Continuação do Parecer: 1.909.052

#### Objetivo da Pesquisa:

##### 2.1 OBJETIVO GERAL

-Avaliar o exoma de lesões de carcinoma epidermóide de pênis visando identificar mutações que possam estar envolvidas na gênese ou progressão desta neoplasia.

##### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Buscar mutações não descritas na literatura envolvidas e ligadas ao CP
- Fazer um comparativo do exoma de tecido normal e tumoral
- Validar mutações já descritas no CP
- Produzir bibliografia com o intuito de auxiliar em tratamentos, prognósticos e informações novas sobre a gênese e desenvolvimento do CP

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Tendo em vista que as amostras biológicas serão retiradas durante procedimento cirúrgico de caráter terapêutico e não serão necessários procedimentos adicionais, não há risco adicional ao paciente. Os pesquisadores se comprometeram a manter os dados dos pacientes em sigilo.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

**AMOSTRAS BIOLÓGICAS** Serão utilizadas amostras de 6 pacientes que foram submetidos à penectomia parcial ou total por tumor peniano assim como amostras de regiões isentas do tumor, atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Preto/USP. As regiões tumorais serão coletadas e dissecadas pelo médico responsável pela cirurgia. **ISOLAMENTO DO DNA** DNA total será obtido de fragmentos de tecido peniano normal e tumoral através da homogeneização do tecido em solução TRIzol® seguindo as especificações e as instruções do fabricante. **ANÁLISE DO EXOMA** As bibliotecas de exoma serão preparadas com o kit Nextera Exome Rapid Capture (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). O DNA genômico deve ser corretamente quantificado por método fluorimétrico (Quantus) e 50ng de DNA de cada amostra serão utilizados na preparação das bibliotecas, seguindo as instruções do fabricante. Em seguida será feita a etapa de captura e enriquecimento do exoma com um conjunto de sondas altamente otimizadas para obtenção de cobertura igual ou maior que 50x abrangendo todo exoma. Sondas de 95pb são usadas na captura de 62Mb de regiões codificadoras de 20.794 genes. A primeira etapa consiste na mistura do DNA devidamente quantificado com as sondas de captura. Em seguida, serão usadas esferas de estreptavidina para capturar as regiões alvos e aplicação de duas lavagens para remoção de ligações não específicas, deixando o material pronto para a segunda hibridação. O passo seguinte visará a amplificação por PCR da biblioteca. Nessa fase, é crítica a quantificação da biblioteca e para isso recomenda-se, além da quantificação fluorimétrica, uma quantificação absoluta por PCR.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA FACULDADE DE  
MEDICINA DE RIBEIRÃO



Continuação do Parecer: 1.909.052

em tempo real, utilizando-se o kit comercial KAPA SYBR FAST (KAPA Biosystems). Após a quantificação precisa, as bibliotecas serão diluídas e 1,8 pM de cada uma serão usados para desnaturação, clusterização em uma flow cell e sequenciamento no equipamento Illumina NextSeq 500 Sequencing System utilizando o Kit High Output NextSeq 500 V2 (300 cycles). A clusterização consiste de 3 etapas: 1) amplificação dos clusters, 2) linearização, bloquelo e 3) hibridação dos primers. Durante a geração dos clusters, cada fragmento de cDNA das bibliotecas é incorporado à superfície da flow cell (suporte sólido), que está coberta com oligonucleotídeos complementares aos adaptadores, usados para amplificar o cDNA de forma isotérmica, dando origem aos clusters, ou seja, grupos ou colônias de fragmentos ligados a flow cell. A linearização é uma reação feita para retirar os adaptadores para assegurar que a hibridação e o sequenciamento ocorram somente em uma das fitas de cada cluster. A etapa de bloquelo refere-se à neutralização das hidroxilas presentes nas extremidades 3' dos clusters linearizados, para evitar a adição de substratos de fluoróforos ou qualquer outro segmento que não seja o primer de sequenciamento. Uma desnaturação garantirá a formação de templates de fita simples, que são hibridados aos primers de sequenciamento. Nesse ponto, a biblioteca estará pronta para o sequenciamento, na configuração paired-end 2 x 150bp (de cada extremidade dos transcritos serão sequenciados 150 nucleotídeos), baseado na tecnologia Solexa ou SBS ("Sequencing-by-Synthesis").

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os pontos questionados quando do primeiro parecer foram contemplados e corrigidos nesta versão tanto no corpo do projeto, quanto no TCLE. Foi proposta a criação do biorrepositório conforme legislação vigente.

#### Recomendações:

Não há.

#### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa Versão 1.2 31-10-2016 e Criação de Biorrepositório, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Versão 1.2 31-10-2016 e Termo de consentimento Livre e esclarecido para Guarda de Material biológico podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

#### Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3632-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA FACULDADE DE  
MEDICINA DE RIBEIRÃO



Continuação do Parecer: 1.909.052

forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_796343.pdf	24/11/2016 11:48:08		Aceito
Outros	24_11TCLE_biorepositorio_renato_de_l ucca_2016.pdf	24/11/2016 11:47:12	RENATO MENDES ROSSI DE LUCCA	Aceito
Outros	24_11carta_pendencias_resolvidas_GE P_Renato_de_lucca_2016.pdf	24/11/2016 11:44:56	RENATO MENDES ROSSI DE LUCCA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	24_11projeto_CEP1_2_2016.pdf	24/11/2016 11:43:28	RENATO MENDES ROSSI DE LUCCA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	24_11TCLE_1_2_REnato_de_lucca_20 16.pdf	24/11/2016 11:41:33	RENATO MENDES ROSSI DE LUCCA	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	24_11pedido_criaca_biorepositor_renat o_de_lucca_2016.pdf	24/11/2016 11:38:49	RENATO MENDES ROSSI DE LUCCA	Aceito
Orçamento	orcamento_financieiro_detalhado_renato de_lucca.pdf	29/09/2016 21:53:57	RENATO MENDES ROSSI DE LUCCA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	aprovacao_upc_renato_de_lucca.pdf	29/09/2016 21:47:14	RENATO MENDES ROSSI DE LUCCA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado_renato_de_lucca_20 16_2.pdf	29/09/2016 21:45:47	RENATO MENDES ROSSI DE LUCCA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Renato_PROJETO_2016.pdf	26/09/2016 19:37:34	RENATO MENDES ROSSI DE LUCCA	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_assinada_renato_de_luc ca_2016.pdf	26/09/2016 19:32:49	RENATO MENDES ROSSI DE LUCCA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900  
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO  
Telefone: (16)3602-2328 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA FACULDADE DE  
MEDICINA DE RIBEIRÃO



Continuação do Protocolo: 1.808.022

RIBEIRÃO PRETO, 06 de Fevereiro de 2017

---

Assinado por:  
**MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA**  
(Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900  
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO  
Telefone: (16)3802-2228 Fax: (16)3833-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



## ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado Senhor,

Estamos realizando o trabalho de pesquisa chamado “**ESTUDO DO EXOMA DO CARCINOMA EPIDERMÓIDE PENIANO**”.

Nesse trabalho, caso o senhor ou seu familiar concorde em participar, estudaremos o DNA de fragmentos dos tumores e/ou de epitélio normal retirado durante a cirurgia para verificarmos melhor a maneira de progressão do câncer epidermóide de pênis a partir do sequenciamento do DNA extraído dos fragmentos de material retirado.

O material utilizado é um pedaço do tecido retirado durante a cirurgia de rotina, e não serão necessários procedimentos extras ou posteriores de coleta de material biológico visto que será retirado um fragmento do tumor e da margem cirúrgica (tecido normal) durante o procedimento normal.

Para obter um maior conhecimento clínico e científico dos carcinomas epidemóides de pênis, o corpo clínico deste hospital (médicos e pesquisadores), desenvolve pesquisa clínica científica. Através desta pesquisa é possível conhecer melhor os mecanismos da doença com o objetivo de oferecer novas possibilidades de diagnóstico e tratamento. Este trabalho envolve a busca, em carcinomas epidermóides de pênis, de novos genes (DNA) ou lesões genéticas em genes já existentes possibilitando o desenvolvimento de novas estratégias clínicas e terapêuticas.

Caso o senhor ou seu familiar, concorde em participar do estudo é importante que saiba que:

Garantimos ao senhor que sua participação não implicará em nenhum procedimento extra além da cirurgia já programada ou despesa adicional e que sua identidade será sempre mantida em sigilo. Tanto os materiais coletados como as informações registradas serão usadas, futuramente, apenas em pesquisas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMRP-USP, após seu consentimento para participação na pesquisa, bem como consentimento para guarda de seu material biológico no “Banco de amostras de tumores urogenitais”, vinculado ao Departamento de Cirurgia e Anatomia desta instituição.

Reafirmamos que sua participação é voluntária e que o senhor pode recusar-se a ceder o material ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem penalidades, sem prejuízos e sem mudança no seu tratamento nesta instituição.

Estou ciente que minha participação é isenta de despesas ou ganhos financeiros e que isto não irá interferir no meu tratamento.

Se o senhor tiver alguma consideração ou dúvida sobre este trabalho, entre em contato com os responsáveis por esta pesquisa: Prof. Dr. Rodolfo Borges dos Reis (16)36022506; Renato Mendes Rossi De Lucca (Biólogo) (16) 36023298 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP (16) 36022-2228.

Declaro estarem claros para mim quais são os objetivos desta atividade, como participarei, terei garantia de confidencialidade e a certeza de que obterei esclarecimentos a qualquer momento.

**TERMO DE CONSENTIMENTO**

Ribeirão Preto, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

Eu, \_\_\_\_\_, aceito espontaneamente participar deste trabalho, podendo desistir a qualquer momento, se assim achar conveniente.

**Pesquisadores responsáveis pelo desenvolvimento da pesquisa**

**Prof. Dr. Rodolfo Borges dos Reis (16)36022506**

\_\_\_\_\_

**Msc. Renato Mendes Rossi De Lucca (Biólogo) (16) 36023298**

\_\_\_\_\_

**ANEXO C – APOIO FINANCEIRO**

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”.