

CLAUDIO BOVOLENTA MURTA

**Correlação da expressão de microRNAs através da varredura por
microarray e de seus alvos preditos com a carcinogênese e o
prognóstico do carcinoma espinocelular peniano**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Orientador: Prof. Dr. William Carlos Nahas

São Paulo
2021

CLAUDIO BOVOLENTA MURTA

**Correlação da expressão de microRNAs através da varredura por
microarray e de seus alvos preditos com a carcinogênese e o
prognóstico do carcinoma espinocelular peniano**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Orientador: Prof. Dr. William Carlos Nahas

São Paulo
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Murta, Claudio Bovolenta

Correlação da expressão de microRNAs através da
varredura por microarray e de seus alvos preditos
com a carcinogênese e o prognóstico do carcinoma
espinocelular peniano / Claudio Bovolenta Murta. --
São Paulo, 2021.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Urologia.

Orientador: William Carlos Nahas.

Descritores: 1.Neoplasias penianas 2.microRNAs
3.Carcinogênese 4.Prognóstico 5.Biomarcadores

USP/FM/DBD-456/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Aos meus amados filhos, Rafael e Beatriz, que me inspiram com sua inocência, alegria e carinho e que me fazem querer ser melhor para ensiná-los através do exemplo. Papai ama vocês.

À minha esposa, Regina, que me apoia e incentiva, garante a tranquilidade de nosso lar enquanto estou trabalhando e ainda me recebe todos os dias com amor e um sorriso inspirador. Te amo.

Aos meus pais, que desde cedo incentivaram-me aos estudos e curiosidade científica bem como mostraram-me o caminho do trabalho digno e honestidade. Vocês são o alicerce do meu caráter e o que me tornei hoje é o reflexo do esforço de vocês.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos pacientes que, durante seu momento de dor e sofrimento, doaram seu tempo e material permitindo que este estudo fosse realizado.

Ao Dr. José Pontes Jr., um irmão que a vida me presenteou e que foi o idealizador deste projeto, bem como esteve comigo em todos os momentos ensinando-me e elevando a qualidade desta tese através do seu brilhantismo científico.

Ao Prof. Dr. Roger Chammas, às Dras. Tatiane Furuya e Miyuki Uno e doutorando Alexis Murillo, os quais tive o prazer de conhecê-los durante o desenvolvimento desta tese e foram fundamentais para sua execução. Conseguiram transformar um trabalho árduo em algo leve e ajudaram sobremaneira na obtenção dos resultados e confecção dos manuscritos.

Ao Prof. Dr. Willian C. Nahas, que em todos os momentos me apoiou para que a tese fosse concluída com êxito, bem como esteve presente em grande parte da minha formação como urologista.

"What we know is a drop, what we don't know is an ocean."

Sir Isaac Newton

"Life without love, is no life at all."

Leonardo Da Vinci

Esta tese está de acordo com as seguintes normas em vigor no momento de sua publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

ÍNDICE

ÍNDICE	8
LISTA DE ABREVIATURAS	10
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE FIGURAS	14
RESUMO	16
ABSTRACT	18
1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Câncer de pênis	21
1.1.1 Epidemiologia	21
1.1.2 Fatores de risco	21
1.1.3 Câncer de pênis e HPV	21
1.1.4 Patologia.....	22
1.1.5 Avaliação diagnóstica	23
1.1.6 Estadiamento do câncer de pênis	23
1.1.7 Fatores prognósticos	26
1.1.8 Tratamento do tumor primário.....	27
1.1.9 Tratamento dos linfonodos regionais	28
1.1.10 Tratamento da doença metastática	30
1.2 Biologia molecular no câncer de pênis	31
1.3 MicroRNAs.....	34
1.3.1 Introdução aos microRNAs.....	34
1.3.2 MicroRNAs na fisiologia humana	36
1.3.3 MicroRNAs em oncologia	37
1.3.4 MicroRNAs no tumor de pênis	38
2 OBJETIVOS.....	43
2.1 Objetivo primário.....	43
2.2 Objetivos secundários	43
3 MÉTODOS.....	45
3.1 Pacientes	45
3.2 Processamento de espécimes cirúrgicos	46
3.3 Extração e isolamento do RNA total	47
3.4 Perfil de Expressão de miRNA por <i>Microarray</i>	48
3.5 Validação dos DEmiRs por qRT-PCR.....	49
3.6 Confirmação <i>in silico</i> da expressão de miRNA através do banco de dados <i>ArrayExpress</i>	52
3.7 Análise de enriquecimento de vias dos alvos preditos dos DEmiRs e identificação das redes de interações miRNA-mRNA.....	52
3.8 Perfil de expressão de mRNA pela plataforma de alto rendimento de qRT-PCR nanofluídica 53	
3.9 Validação <i>in silico</i> da expressão gênica alterada em CaPe através do banco de dados GEO .	57
3.10 Análise de enriquecimento de vias de genes alterados em CaPe.....	57
3.11 Análise da expressão proteica	58
3.12 Extração de DNA e detecção de DNA de HPV	60
3.13 Análise Estatística.....	61
4 RESULTADOS.....	65
4.1 Resultados clínico-patológicos cirúrgicos	65
4.2 Análise de expressão de miRNAs por <i>microarray</i>	72
4.2.1 Tecido tumoral versus tecido não neoplásico adjacente	72
4.2.2 Pacientes com doença metastática versus localizada	75
4.3 Resultados da validação em amostra independente e expandida da expressão de miRNAs ...	77
4.3.1 Validação dos miRNAs do tecido tumoral versus tecido não neoplásico.....	77
4.3.2 Validação dos miRNAs dos grupos metastático versus localizado	86
4.4 Análise de expressão dos mRNAs por qRT-PCR.....	88
4.4.1 Diferença de expressão de mRNA entre tecido tumoral versus tecido não neoplásico adjacente88	
4.4.2 Diferença de expressão de mRNA nos pacientes com doença metastática versus localizada 97	
4.5 Associação entre os miRNAs e mRNAs e as variáveis clínico-patológicas.....	103

4.5.1	Análise comparativa da expressão dos miRNAs com as variáveis clínico-patológicas ...	103
4.5.2	Análise comparativa da expressão dos mRNAs com as variáveis clínico-patológicas	104
4.6	Associação entre os miRNAs e mRNAs com sobrevida livre de recorrência, câncer-específica e sobrevida global	107
4.6.1	Associação entre os níveis de expressão dos miRNAs com SLR, SCE e SG.....	107
4.6.2	Associação entre os níveis de expressão dos genes selecionados com SLR, SCE e SG ..	111
4.7	Expressão proteica	125
4.8	Resultados dos DNAs de HPV encontrados	127
5	DISCUSSÃO.....	129
6	CONCLUSÃO	146
7	REFERÊNCIAS	148
8	ANEXOS: PÔSTERES, APRESENTAÇÕES EM CONGRESSOS E PUBLICAÇÕES.....	160
8.1	Pôster apresentado no Annual Meeting of American Association of Cancer Research em Chicago, Il, 2018.....	160
8.2	Resumo publicado nos anais do <i>Annual Meeting of American Society of Clinical Oncology</i> em Chicago, Il, 2018.....	161
8.3	Pôster apresentado no “ <i>Second AACR International Conference</i> ” em São Paulo, Brasil, Setembro de 2018.....	162
8.4	Pôster apresentado no <i>American Urological Association Annual Meeting</i> em Chicago, Il, Maio de 2019.	163
8.5	Manuscrito publicado na revista <i>Cancers</i> em setembro de 2021	164

LISTA DE ABREVIATURAS

CaP	Câncer de próstata
CaPe	Câncer de pênis
cDNA	DNA complementar
CEC	Carcinoma espinocelular
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DEG	<i>Differentially expressed gene</i> (Gene diferencialmente expresso)
DEmiR	<i>Differentially expressed miRNA</i> (miRNA diferencialmente expresso)
DP	Desvio Padrão
DST	Doença sexualmente transmissível
EAU	<i>European Association of Urology</i> (Associação Européia de Urologia)
ECOG PS	<i>Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status</i>
FC	<i>Fold change</i>
FDR	<i>False discovery rate</i>
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i> (hibridização <i>in situ</i> por fluorescência)
GSEA	<i>Gene Set Enrichment Analysis</i>
HBV	<i>Hepatitis B virus</i> (vírus da hepatite B)
HCV	<i>Hepatitis C virus</i> (vírus da hepatite C)
HE	Hematoxilina e eosina
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i> (vírus da imunodeficiência humana)
HPV	<i>Human papilloma virus</i> (vírus do papiloma humano)
HR	<i>Hazard ratio</i> (taxa de risco)
IC	Intervalo de confiança
ICESP	Instituto do Câncer do Estado de São Paulo
IHQ	Imunohistoquímica
IMV	Invasão microvascular
ISUP	<i>International Society of Urological Pathology</i> (Sociedade Internacional de Patologia Urológica)
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome</i> (Enciclopédia de genes e genoma de Kyoto)
LIMMA	<i>Linear Models for Microarrays</i> (Modelos lineares para <i>microarrays</i>)
miRNA	microRNA maduro
mRNA	RNA mensageiro
MTI	<i>miRNA target interaction</i> (interações miRNA-alvo)
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i> (alvo mamífero da rapamicina)
NGS	<i>Next-generation sequencing</i> (sequência de nova geração)
NT	Nucleotídeo
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>Odds ratio</i> (razão de chances)
PCA	<i>Principal component analysis</i> (análise de componentes principais)
PCR	Proteína C reativa
PeCa	<i>Penile cancer</i> (câncer de pênis)
PeIN	<i>Penile intraepithelial neoplasia</i> (Neoplasia peniana intraepitelial)
PET-CT	<i>Positron emission tomography – computed tomography</i> (tomografia por emissão de pósitrons)
pre-miRNA	miRNA precursor
pri-miRNA	miRNA primitivo
qRT-PCR	<i>Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction</i> (Transcrição reversa de reação em cadeia de polimerase quantitativa)
RIN	<i>RNA integrity number</i> (número de integridade de RNA)
RISC	<i>RNA induced silence complex</i> (complexo de silenciamento induzido por RNA)
RNA Pol II	RNA polimerase II
RNM	Ressonância nuclear magnética
SCC	<i>Squamous cell carcinoma</i> (carcinoma de células escamosas)
SCE	Sobrevida câncer específica
SG	Sobrevida global
SLG	Sobrevida livre de recorrência
TAC	<i>Transcriptome analysis console</i>

TC	Tomografia computadorizada
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TEP	Tromboembolismo pulmonar
TMA	<i>Tissue microarray</i> (microarranjo tecidual)
TNM	Tumor-node-metastasis
TNN	Tecido não neoplásico
TT	Tecido tumoral
UICC	<i>The Union for International Cancer Control</i> (União Internacional para Controle do Câncer)
USG	Ultrassonografia

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação clínica e patológica do CaPe, 2016.	25
Tabela 2 – Ensaios Taqman® Advanced miRNA Assays dos DEmiRs selecionados para validação por qRT-PCR.	51
Tabela 3 – Lista completa dos genes incluídos em nosso painel (89 genes de interesse e sete controles endógenos) para investigação dos níveis de expressão dos transcritos na amostra total de TT (N=24) e TNN (N=24), e tumores localizados (N=12) e tumores metastáticos (N=12) dos pacientes com CaPe. Em negrito, os genes que não apresentaram amplificação e foram excluídos da análise final.	53
Tabela 4 – Anticorpos utilizados para marcação imuno-histoquímica das proteínas escolhidas na amostra total de tumores dos 24 pacientes e motivos de sua seleção.	60
Tabela 5 – Motivos de não inclusão dos pacientes no protocolo de estudo.	65
Tabela 6 – Dados clínico-demográficos dos pacientes participantes do estudo.	66
Tabela 7 – Dados cirúrgicos-patológicos dos pacientes participantes do estudo separados por amostras.	68
Tabela 8 – Associação entre sobrevida livre de recorrência, câncer específica e global através do teste de log-rank e o cálculo do HR com IC de 95% por regressão de Cox para as características clínicas e patológicas, considerando a amostra total de casos com CaPe (n=24).	70
Tabela 9 – Complicações da linfadenectomia inguinal (N=16).	72
Tabela 10 – Lista dos 69 diferentemente expressos miRNAs (DEmiRs) identificados pelo microarray na comparação entre tecido tumoral (N=11) e tecido não tumoral adjacente (N=11).	73
Tabela 11 – Lista dos 21 DEmiRs da comparação entre os grupos metastático versus localizado.	76
Tabela 12 – Dados do microarray dos nove DEmiRs escolhidos para validação em amostras independente e expandida entre os grupos de tecido tumoral e não neoplásico.	78
Tabela 13 – Comparação da expressão dos 9 DEmiRs identificados pela técnica de microarray na comparação entre TT e TNN adjacentes na análise por microarray (N=11), validação com amostra independente (N=13) e na amostra total (N=24) por técnica de qRT-PCR.	79
Tabela 14 – Análise da expressão de miRNA representada pela razão log ₂ (contagem normalizada +1) entre amostras de CaPe e seus tecidos não neoplásicos da base de dados E-MTAB-3087.	80
Tabela 15 – Dez principais vias enriquecidas com os genes alvos validados (validação funcional fraca e forte) dos DEmiRs detectados na comparação de tecido tumoral (N=24) e não neoplásico (N=24) de acordo com o miRTarBase 8.0.	84
Tabela 16 – Dados obtidos no microarray dos sete DEmiRs escolhidos para validação em amostras independente e expandida entre os grupos de pacientes com tumor metastático versus localizado.	86
Tabela 17 – Comparação da expressão dos 7 DEmiRs identificados pela técnica de microarray na comparação entre tumores metastáticos e tumores localizados na análise por microarray (n=11), validação com amostra independente (n=13) e na amostra total (n=24) por técnica de qRT-PCR.	87
Tabela 18 – DEGs detectados na comparação entre TT (N=24) e TNN (N=24) de CaPe por qRT-PCR.	89
Tabela 19 – Lista dos 69 DEmiRs detectados na comparação de TT com TNN na análise de microarray com expressão oposta em relação aos 37 DEGs descritos como alvos experimentalmente validados de acordo com o miRTarBase 8.0.	91
Tabela 20 – Lista das vias enriquecidas do Gene Ontology (GO) com os DEGs detectados por qRT-PCR na comparação entre TT (N=24) e TNN adjacente (N=24).	94
Tabela 21 – Lista dos sete DEGs identificados na comparação dos grupos de tumores metastáticos (N=12) em relação aos tumores localizados (N=12).	97
Tabela 22 – Resultado das associações significativas entre os níveis de expressão dos 14 DEmiRs escolhidos para validação por qRT-PCR e as variáveis clínicas investigadas na amostra total de pacientes com CaPe (N=24).	103
Tabela 23 – Resultado das associações significativas entre os níveis de expressão dos mRNAs e as variáveis clínicas investigadas no estudo.	105
Tabela 24 – Associação entre sobrevida livre de recorrência através do teste de log-rank e o cálculo do HR com IC de 95% por regressão de Cox para os níveis de expressão de cada miRNA avaliado, considerando a amostra total de casos com CaPe (n=24).	108
Tabela 25 – Associação entre sobrevida câncer específica através do teste de log-rank e o cálculo do HR com IC de 95% por regressão de Cox para os níveis de expressão de cada miRNA avaliado, considerando a amostra total de casos com CaPe (n=24).	109
Tabela 26 – Associação entre sobrevida global através do teste de log-rank e o cálculo do HR com IC de 95% por regressão de Cox para os níveis de expressão de cada miRNA avaliado, considerando a amostra total de casos com CaPe (n=24).	110

Tabela 27 – Associação entre sobrevida livre de recorrência através do teste de log-rank e o cálculo do HR com IC de 95% por regressão de Cox com os níveis de expressão dos genes escolhidos, considerando a amostra total de casos com CaPe (n=24).	114
Tabela 28 – Associação entre sobrevida câncer específica através do teste de log-rank e o cálculo do HR com IC de 95% por regressão de Cox com os níveis de expressão dos genes escolhidos, considerando a amostra total de casos com CaPe (n=24).	117
Tabela 29 – Associação entre sobrevida global através do teste de log-rank e o cálculo do HR com IC de 95% por regressão de Cox com os níveis de expressão dos genes escolhidos, considerando a amostra total de casos com CaPe (n=24).	122
Tabela 30 – Associação entre as proteínas escolhidas para análise nas 24 amostras de TT e as características clínico-patológicas (presença da expressão da proteína nos diferentes grupos).	126
Tabela 31 – Associação da expressão das proteínas selecionadas nos tecidos tumorais dos 24 pacientes com CaPe e sobrevida câncer específica e sobrevida global pelo teste de Log Rank.	127

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Biogênese do miRNA (cedida pela Profa. Dra. Kátia R. M. Leite)	35
Figura 2 – Curvas de Kaplan-Meier de sobrevida livre de recorrência (A); sobrevida câncer-específica (B) e global (C).....	69
Figura 3 – Sobrevida livre de recorrência associada à metástase linfonodal. Curva de Kaplan-Meier mostra que a presença de metástase linfonodal tem pior sobrevida livre de recorrência.	70
Figura 4 – Sobrevida câncer específica (SCE) associadas às variáveis clínicas. Curvas de Kaplan-Meier mostram que a presença de metástase linfonodal (A) e invasão perineural (B) tem pior SCE.....	71
Figura 5 – Agrupamento hierárquico mostrando que os nove DEmiRs são capazes de separar os grupos de acordo com a presença ou não de tumor. N: número de pacientes; programa <i>Transcriptome Analysis Console</i> , Affymetrix.....	74
Figura 6 – Agrupamento hierárquico demonstrando que os sete DEmiRs escolhidos para validação foram capazes de separar os pacientes de acordo com os grupos de prognóstico. N: número de pacientes. Ao lado dos nomes dos miRNAs está descrito o critério de escolha utilizado para a seleção de cada um deles; programa <i>Transcriptome Analysis Console</i> , Affymetrix.	77
Figura 7 – Gráficos <i>box-plot</i> da expressão dos nove miRNAs diferencialmente expressos (DEmiRs) identificados na comparação entre os TT e TNN por <i>microarray</i> (N=11) e escolhidos para validação na amostra independente (N=13); somente o miR-149-5p não foi validado. * $p < 0,05$	78
Figura 8 – Curvas ROC dos 8 miRNAs diferencialmente expressos (DEmiRs) validados por qRT-PCR. Todos DEmiRs subexpressos (miR-30a-5p, miR-432-5p, miR-487b-3p e miR-145-5p) demonstraram boa acurácia para diferenciar TT de TNN em pacientes com CaPe. ROC: receiver operating characteristic; AUC: area under the curve.....	80
Figura 9 – Alvos validados experimentalmente dos miRNAs diferencialmente expressos (DEmiRs) da comparação entre TT versus TNN. (A e B) Dados do miRTarBase 8.0 das redes de miRNA e seus genes alvos validados experimentalmente com níveis de evidência fraca e forte para os DEmiRs subexpressos (A) e superexpressos (B); (C e D) Gráfico de enriquecimento de vias para os alvos validados experimentalmente dos miRNAs com níveis de evidência fraca e forte para os DEmiRs subexpressos (C) e superexpressos (D) pela ferramenta Mienturnet. Os pontos são coloridos pelo valor de p ajustado e dimensionados pela razão de gene por via.	82
Figura 10 – Gráficos <i>box-plot</i> da expressão dos sete DEmiRs por qRT-PCR identificados no <i>microarray</i> e selecionados para validação na amostra independente entre os grupos de pacientes com doença metastática (n=6) versus localizada (n=7). Todas as comparações com $p > 0,05$	87
Figura 11 – Curvas ROC dos DEmiRs validados por qRT-PCR na amostra expandida com 24 pacientes. Os dois demonstraram boa acurácia para diferenciar os pacientes com doença metastática da localizada. ROC: receiver operating characteristics; AUC: area under de curve.	88
Figura 12 – Expressão gênica por razão de sinal de \log_2 entre amostras de CaPe (N=39) e uma amostra de 5 glandes de autópsia (grupo controle) da base de dados GSE7955. Todos os valores medianos acima de 1,0 ou abaixo de -1,0 foram considerados como diferencialmente expressos. As barras de cada gene foram coloridas de acordo com sua regulação em nosso estudo (vermelho como subexpressos e azuis com superexpressos).	90
Figura 13 – Análise de enriquecimento de vias (Gene Set Enrichment Analysis – GSEA) para os DEGs no banco de dados Gene Ontology (GO). (A) Rede biológica dos termos do GO mais representativos dos 37 DEGs detectados em nosso estudo. Pontos são coloridos pelo valor de p e dimensionados pelo número de genes envolvidos; (B) Gráfico do GSEA indicando a distribuição dos DEGs incluídos em cada via. As linhas azuis representam a flutuação da pontuação de enriquecimento para cada via selecionada indicando qual está superexpresso (acima da barra horizontal) ou subexpresso (abaixo da barra horizontal).	93
Figura 14 – Curvas ROC dos DEGs que demonstraram ter boa acurácia para diferenciação do TT do TNN em pacientes com CaPe; ROC: receiver operating characteristic; AUC: area under the curve.....	95
Figura 15 – Correlações entre as expressões dos nove miRNAs e 83 genes nos TT e TNN considerando a amostra de 24 pacientes com CaPe. (A) Coeficientes de correlação de Pearson entre os níveis de expressão entre miRNAs e genes mostrando diferentes perfis entre amostras de TT e TNN. (B) Os valores de R foram colocados no gráfico de equação linear e oito pares miRNA-gene fora do intervalo de confiança foram selecionados para nova análise; (C) Valores da expressão dos miRNA e gene (-delta CT) dos TT e TNN foram colocados em gráfico. Foram escolhidos os oito pares selecionados em (B).....	96
Figura 16 – Oito pares miRNA-mRNA alterados na carcinogênese peniana e suas curvas ROC para discriminação de TT e TNN. ROC: receiver operating characteristic; AUC: area under the curve.....	97
Figura 17 – Curvas ROC dos sete DEGs detectados na comparação entre tumores de pacientes com doença metastática e localizada. ROC: receiver operating characteristic; AUC: area under the curve.....	98

Figura 18 – Correlações entre as expressões dos sete miRNAs e 83 genes nas amostras de tumores dos pacientes com doença metastática e localizada de 24 pacientes com CaPe. (A) Coeficientes de correlação de Pearson entre os níveis de expressão dos miRNAs e genes entre doença metastática e localizada. As cores e tamanhos de cada ponto representam o valor de R e p; (B) Os valores de R foram colocados no gráfico de dispersão. Cada ponto foi colorido de acordo com valor de p para o tecido.; (C) Gráfico de dispersão para os pares mRNA-miRNA com correlações significativas em pelo menos um tecido. Os pontos foram coloridos de acordo com a área sob a curva para discriminação entre doença metastática (N=12) e localizada (N=12).....	100
Figura 19 – Dez correlações inversas de pares miRNA-mRNA identificados pela correlação de Pearson entre expressão de sete miRNAs e 83 genes nos pacientes com tumores de pacientes com doença metastática e localizada na amostra total de 24 pacientes com CaPe.	101
Figura 20 – Curvas ROC das razões dos dez pares mRNA-miRNA alterados e candidatos a biomarcadores para metástase em CaPe. na evolução para metástase do CaPe e suas curvas ROC para discriminação entre os pacientes com doença metastática e localizada. ROC: receiver operating characteristic; AUC: area under de curve.	102
Figura 21 – Curvas ROC demonstrando que o nível de expressão do gene MMP1 é um bom fator preditor de presença de invasão perineural, pior estágio pT (T2+T3), maior grau histológico (G3) e maior tamanho tumoral (>5cm); ROC: receiver operating characteristics; AUC: area under de curve.	106
Figura 22 – Curvas ROC demonstrando que o nível de expressão dos genes SRC, CCND1, EGFR, TP53 e IL1A são bons fatores preditores de maior grau histológico (G3), presença de invasão perineural e microvascular, respectivamente; ROC: receiver operating characteristics; AUC: area under de curve...	107
Figura 23 – Sobrevida global de acordo com a expressão do miR-421. Curva de Kaplan-Meier mostra que a alta expressão do miR-421 está associada com menor sobrevida global.	111
Figura 24 – Curvas de sobrevida livre de recorrência de acordo com a expressão dos genes. A) CCND1; B) CDH1; C) CDKN1A; D) EGFR; E) GADD45A; F) KLF4; G) MYC; H) SNAI2; I) SRC; e J) TP63. Teste de log-rank.....	112
Figura 25 – Curvas de sobrevida câncer específica de acordo com a expressão dos genes. A) CCND1; B) CDH1; C) CDKN1A; D) EGFR; E) GADD45A; F) KLF4; G) MYC; H) SNAI2; I) SRC; e J) TP63. Teste de log-rank.	113
Figura 26 – Curvas de sobrevida global de acordo com o nível de expressão dos genes. A) CDH1; B) FGF2; C) GADD45A; D) IL6; E) MYC; F) NES; e G) NRP1. Teste de log-rank.....	121

RESUMO

Murta CB. *Correlação da expressão de microRNAs através da varredura por microarray e de seus alvos preditos com a carcinogênese e o prognóstico do carcinoma espinocelular peniano* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS: O câncer de pênis (CaPe) é uma doença rara com alta morbidade e mortalidade. A carcinogênese não é totalmente compreendida e, embora alguns biomarcadores relacionados a prognóstico tenham sido descritos, até o momento nenhum foi adotado na prática clínica. Nosso objetivo foi identificar, através de varredura por *microarray*, os miRNAs diferencialmente expressos (DEmiR) entre tecido tumoral (TT) versus não neoplásico (TNN) e pacientes com doença metastática versus localizada, bem como identificar os genes diferencialmente expressos (DEG) entre estes grupos e realizar análise integrativa miRNA-mRNA propondo assim elucidar a via de tumorigênese e a descoberta de novos biomarcadores para o CaPe. **MÉTODOS:** Foram coletadas prospectivamente amostras frescas de TT e TNN adjacente de 24 pacientes com carcinoma espinocelular (CEC) de pênis operados em nossa instituição entre julho de 2015 a janeiro de 2018. Inicialmente, foram selecionados 5 pacientes com doença localizada e 6 com doença metastática linfonodal para realização do *microarray*. O RNA foi purificado e a análise de varredura com o *microarray* utilizou o miRNA 4.0 Genechip (Affymetrix). Foram identificados os DEmiRs entre TT e TNN utilizando-se o programa TAC (Affymetrix) com *fold change* (FC) > 2,0, $p < 0,01$ e *false discovery rate* (FDR) < 0,05. Foram também identificados os DEmiRs entre os grupos de doença metastática versus localizada com FC > 1,5 e $p < 0,05$. As expressões dos DEmiRs selecionados para validação independente (N=13) e em amostra expandida (N=24) nos grupos foram avaliadas através de qRT-PCR. Oitenta e três genes foram escolhidos para as comparações entre os grupos, baseados em suas relações com miRNAs encontrados no *microarray* pelo miRTarBase 8.0, descrição em CaPe e envolvidos em carcinogênese. A expressão dos genes escolhidos foi avaliada através da plataforma nanofluídica por qRT-PCR e comparadas entre os grupos de TT com TNN e com doença metastática e localizada. Foram correlacionados a expressão dos DEmiRs e os DEGs com os fatores clássicos de prognóstico no CaPe e a sobrevida câncer específica e global. Avaliação *in silico* foi realizada comparando-se os DEmiRs da comparação TT vs TNN com banco de dados *ArrayExpress* (E-MTAB-3087) previamente publicados em CaPe, bem como os DEGs no banco de dados *Gene Expression Omnibus*. **RESULTADOS:** A idade média dos 24 pacientes foi de 61,8 anos. O seguimento mediano foi de 39,8 meses. O tratamento local foi a penectomia parcial em 17 (70,8%) casos, o restante foi submetido à penectomia total. O estadiamento patológico foi pT1, pT2, pT3 em 4 (16,6%), 13 (54,2%) e 7 (29,2%) casos, respectivamente. Dezesesseis (66,7%) pacientes foram submetidos a linfadenectomia inguinal. Destes, 11 (68,7%) tinham doença metastática pN+. Na análise de varredura por *microarray* entre TT versus TNN, encontramos 69 DEmiRs (41 sub e 28 superexpressos), dos quais 9 foram selecionados para validação baseado em maior FC, presença na lista dos tumores metastáticos versus localizados, publicação prévia em CaPe e CEC (miR-145-5p, miR-432-5p, miR-487b-3p, miR-30a-5p, miR-149-5p, miR-200a-5p, miR-224-5p, miR-31-3p, miR-31-5p). Na validação independente somente o miR-149-5p não confirmou resultado do *microarray*. Cinco DEmiRs foram validados *in silico* no banco de dados E-MTAB-3087 (miR-30a-5p, miR-432-5p, miR-487b-3p, miR-145-5p e miR-31-5p). Na comparação entre tumor metastático versus localizado, 21 DEmiRs (5 sub e 16

superexpressos) foram identificados. Foram selecionados 7 deste grupo para validação de acordo com maior FC e relevância biológica (miR-181c-5p, 744-5p, 196b-5p, 200a-5p, 152-3p, 421, 149-5p). Na validação independente através de qRT-PCR nenhum manteve significância estatística, entretanto na amostra expandida com todos os 24 casos, houve confirmação dos miR-744-5p ($p=0,003$) e miR-421 ($p=0,005$). Nas correlações entre DEmiRs e o prognóstico, observamos que a menor expressão do miR-31-3p estava correlacionado ao grupo de maior estágio T ($p=0,043$) e que a maior expressão do miR-421 reduzia a sobrevida global ($p=0,038$). Avaliamos a expressão de 83 genes por qRT-PCR e encontramos 37 DEGs entre TT e TNN. Seis deles com boa acurácia para distinguir os grupos com $AUC>0,78$ (*IL1A*, *MCM2*, *MMP1*, *MMP12*, *SFN* e *VEGFA*). Na análise integrativa, encontramos 8 pares de miRNA-mRNA que mudaram significativamente sua relação, sendo a maior alteração observada para o par miR-432-5p-*TP53*. Entre os DEGs da comparação entre os pacientes metastáticos e localizados encontramos 7 DEGs (*CCND1*, *EGFR*, *ENTPD5*, *HOXA10*, *IGF1R*, *MYC*, *SNAI2*), todos com boa acurácia ($AUC>0,74$) na distinção entre os grupos. Observamos correlações significativas entre maior expressão do *MMP1* com tamanho tumoral ($p=0,042$), grau ($p=0,045$), estágio T patológico ($p=0,018$) e invasão perineural ($p=0,007$). O gene *MMP1* é regulado pelo miR-145-5p que está subexpresso na amostra tumoral. Observamos também correlação entre maior expressão do *CCND1* ($p=0,006$) e *EGFR* ($p=0,001$) com grau tumoral; e menor expressão de *MMP9* com invasão microvascular ($p=0,044$). Nas curvas de sobrevida, a maior expressão dos genes *CCND1*, *EGFR*, *GADD45A*, *MYC*, *SNAI2* e *SRC* e menor dos *CDHI*, *CDKN1A*, *KLF4* e *TP63* estavam associados a mortalidade por CaPe. A maior expressão dos genes *FGF2*, *GADD45A*, *IL6*, *MYC*, *NES* e *NRP1* e a subexpressão do *CDHI* foram correlacionadas a menor sobrevida global. CONCLUSÕES: Descrevemos uma assinatura molecular relacionada à carcinogênese do pênis baseada nas expressões dos miR-432-5p, miR-478b-3p, miR-145-5p, miR-30a-5p, miR-200a-5p, miR-224-5p, miR-31-3p e miR-31-5p e dos genes *IL1A*, *MCM2*, *MMP1*, *MMP12*, *SFN* e *VEGFA*. Identificamos um painel de potenciais biomarcadores de prognóstico no CaPe baseada na expressão dos miR-421, miR-744-5p, miR31-3p e dos genes *CCND1*, *CDHI*, *CDKN1A*, *EGFR*, *ENTPD5*, *FGF2*, *GADD45A*, *HOXA10*, *IGF1R*, *KLF4*, *MMP1*, *MYC*, *NES*, *NRP1*, *SNAI2*, *SRC* e *TP63*.

DESCRITORES: Neoplasias penianas; microRNAs; Carcinogênese; Prognóstico; Biomarcadores.

ABSTRACT

Murta CB. *Correlation of microRNA expression through microarray and their predicted targets with carcinogenesis and prognosis of penile squamous cell carcinoma* [thesis]. Sao Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

INTRODUCTION AND OBJECTIVES: Penile cancer (PeCa) is a rare disease with high morbidity and mortality. Its carcinogenesis is not fully understood and, although some prognostic-related biomarkers have been described, none have been adopted in clinical practice to date. Our objective was to identify, through microarray scanning, the differentially expressed miRNAs (DEmiR) between tumor tissue (TT) versus non-neoplastic tissue (NNT) and patients with metastatic versus localized disease, as well as to identify the differentially expressed genes (DEG) between these groups and perform integrative miRNA-mRNA analysis thus proposing to elucidate the tumorigenesis pathway and the discovery of new biomarkers for PeCa. **METHODS:** Fresh samples of TT and adjacent NNT were prospectively collected from 24 patients with squamous cell carcinoma (SCC) of the penis operated on at our institution between July 2015 and January 2018. Initially, 5 patients with localized disease and 6 with metastatic disease were selected for microarray performance. The RNA was purified and microarray scanning analysis used the miRNA 4.0 Genechip (Affymetrix). The DEmiRs between TT and NNT were identified using the TAC program (Affymetrix) with fold change (FC) >2.0 , $p < 0.01$ and false discovery rate (FDR) < 0.05 . DEmiRs were also identified between the groups of metastatic versus localized disease with $FC > 1.5$ and $p < 0.05$. The expressions of DEmiRs selected for independent validation (N=13) and in an expanded sample (N=24) groups were evaluated using qRT-PCR. Eighty-three genes were chosen for comparisons between groups, based on their relationships with miRNAs found in the microarray by miRTarBase 8.0, described in PeCa and involved in carcinogenesis. The expression of the chosen genes was evaluated using the nanofluidic platform by qRT-PCR and compared between groups of TT with NNT and with metastatic and localized disease. The expression of DEmiRs and DEGs were correlated with classical prognostic factors in PeCa and cancer-specific and overall survival. In silico evaluation was performed by comparing the DEmiRs of the TT vs NNT comparison with the ArrayExpress database (E-MTAB-3087) previously published in CaPe, as well as the DEGs in the Gene Expression Omnibus database. **RESULTS:** The average age of the 24 patients was 61.8 years. The median follow-up was 39.8 months. Local treatment was partial penectomy in 17 (70.8%) cases, the remainder underwent total penectomy. The pathological staging was pT1, pT2, pT3 in 4 (16.6%), 13 (54.2%) and 7 (29.2%) cases, respectively. Sixteen (66.7%) patients underwent inguinal lymphadenectomy. Of these, 11 (68.7%) had pN+ metastatic disease. In microarray scanning analysis between TT versus NNT, we found 69 DEmiRs (41 under and 28 overexpressed), of which 9 were selected for validation based on higher FC, presence in the list of metastatic versus localized tumors, previous publication in PeCa and SCC (miR-145-5p, miR-432-5p, miR-487b-3p, miR-30a-5p, miR-149-5p, miR-200a-5p, miR-224-5p, miR-31-3p, miR-31-5p). In the independent validation, only miR-149-5p did not confirm the microarray result. Five DEmiRs were validated in silico in the E-MTAB-3087 database (miR-30a-5p, miR-432-5p, miR-487b-3p, miR-145-5p and miR-31-5p). In the comparison between metastatic versus localized tumor, 21 DEmiRs (5 under and 16 overexpressed) were identified. Seven from this group were selected for validation according to higher FC and

biological relevance (miR-181c-5p, 744-5p, 196b-5p, 200a-5p, 152-3p, 421, 149-5p). In the independent validation through qRT-PCR, none of them maintained statistical significance, however in the expanded sample with all 24 cases, there was confirmation of miR-744-5p (p=0.003) and miR-421 (p=0.005). In the correlations between DE miRs and prognosis, we observed that the lower expression of miR-31-3p was correlated with the higher stage T group (p=0.043) and that the higher expression of miR-421 with reduced overall survival (p=0.038). We evaluated the expression of 83 genes by qRT-PCR and found 37 DEGs between TT and NNT. Six of them presented good accuracy to distinguish groups with AUC>0.78 (*IL1A*, *MCM2*, *MMP1*, *MMP12*, *SFN* and *VEGFA*). In the integrative analysis, we found 8 pairs of miRNA-mRNA that significantly changed their relationship, with the greatest change being observed for the pair miR-432-5p-*TP53*. Among the DEGs in the comparison between metastatic and localized patients, we found 7 DEGs (*CCND1*, *EGFR*, *ENTPD5*, *HOXA10*, *IGF1R*, *MYC*, *SNAI2*), all with good accuracy (AUC>0.74) in the distinction between groups. We observed significant correlations between increased *MMP1* expression and tumor size (p=0.042), grade (p=0.045), pathological T stage (p=0.018) and perineural invasion (p=0.007). The *MMP1* gene is regulated by miR-145-5p which is under expressed in the tumor sample. We also observed a correlation between higher expression of *CCND1* (p=0.006) and *EGFR* (p=0.001) with tumor grade; and lower *MMP9* expression with microvascular invasion (p=0.044). In the survival curves, higher expression of genes *CCND1*, *EGFR*, *GADD45A*, *MYC*, *SNAI2* and *SRC* and lower expression of *CDHI*, *CDKN1A*, *KLF4* and *TP63* were associated with mortality from PeCa. Higher expression of *FGF2*, *GADD45A*, *IL6*, *MYC*, *NES* and *NRP1* genes and under expression of *CDHI* were correlated with lower overall survival. CONCLUSIONS: We described a molecular signature related to penile carcinogenesis based on the expressions of miR-432-5p, miR-478b-3p, miR-145-5p, miR-30a-5p, miR-200a-5p, miR-224-5p, miR-31-3p and miR-31-5p and *IL1A*, *MCM2*, *MMP1*, *MMP12*, *SFN* and *VEGFA* genes. We identified a panel of potential prognostic biomarkers in PeCa based on the expression of miR-421, miR-744-5p, miR31-3p and the genes *CCND1*, *CDHI*, *CDKN1A*, *EGFR*, *ENTPD5*, *FGF2*, *GADD45A*, *HOXA10*, *IGF1R*, *KLF4*, *MMP1*, *MYC*, *NES*, *NRP1*, *SNAI2*, *SRC* and *TP63*.

DESCRIPTORS: Penile neoplasms; MicroRNAs; Carcinogenesis; Prognosis; Biomarkers.

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de pênis

1.1.1 Epidemiologia

O câncer de pênis (CaPe) é uma patologia pouco frequente. No mundo, em 2020, estima-se que a incidência de CaPe foi de 36 mil casos novos(1). No Brasil, esta doença representa 2% dos casos novos de câncer no homem, sendo mais frequente nas regiões norte e nordeste do país(2).

1.1.2 Fatores de risco

Entre os principais fatores de risco para o desenvolvimento do CaPe, a presença de fimose eleva o risco desta neoplasia em 16 vezes. Entretanto, a postectomia, quando feita no período neonatal, é capaz de reduzir o risco deste tumor. Outras condições associadas ao CaPe são o fumo, inflamações crônicas do pênis, infecção pelo vírus humano do papiloma (HPV) e a presença de condiloma acuminado(3, 4). Além destes, ter múltiplos parceiros sexuais, idade precoce da primeira relação, pacientes de áreas rurais, baixo nível socioeconômico, solteiros e relações com animais também já foram descritos como fatores de risco para o CaPe(3, 5-7).

1.1.3 Câncer de pênis e HPV

O HPV pode ser encontrado em mais de 60% dos casos de CaPe. O subtipo mais comum é o 16, encontrado em 45% dos pacientes, mas os subtipos 18, 31, 33, 35, 45, 58 e 59 também apresentam uma frequência considerável em população estadunidense, variando entre 1,3 e 5,1%(8). A incidência de neoplasia peniana intraepitelial (PeIN) causada pelo HPV é baixa, entre 0,1 e 0,4%(9), podendo chegar a 1,6% dos pacientes acometidos pelo HPV16. O tempo médio entre o diagnóstico de HPV até o aparecimento da lesão intraepitelial é de 19 meses(10). A infecção por HPV nos pacientes com CaPe parece ser um fator de bom prognóstico, sugerindo uma via de carcinogênese diferente dos casos não associados a esta infecção(11).

Entre os tumores causados pelo HPV, o do pênis se apresenta com estágio mais avançado e tem pior sobrevida em cinco anos, quando comparado com o tumor de colo de útero, vagina, vulva, de cabeça e pescoço e de canal anal(12).

1.1.4 Patologia

A classificação de tumores de pênis de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2016 foi baseada em aspectos clínico-patológicos e sua relação com o HPV. Os tumores de pênis não relacionados ao HPV do subtipo carcinoma espinocelular (CEC) são principalmente do tipo usual. Carcinomas pseudo-hiperplásticos acometem, principalmente, pacientes mais idosos e estão associados ao líquen escleroso. O carcinoma pseudoglandular é um tumor agressivo que simula adenocarcinoma, enquanto o carcinoma verrucoso, ou sua variante carcinoma *cuniculatum*, é uma neoplasia de baixo grau que não dá metástase. Outros carcinomas não relacionados ao HPV são o CEC papilar, adenoescamoso e o sarcomatóide. Este último apresenta o pior prognóstico entre todos os subtipos(13, 14).

Os carcinomas relacionados ao HPV são os CEC basalóides e verrucosos. Os CEC basalóides apresentam alto índice de metástase linfonodal, enquanto os verrucosos raramente geram metástases(15). Outros CEC associados ao HPV são o CEC verrucoso-basalóide, os papilares-basalóides, os carcinomas de células claras e, muito raros, os linfoepitelioma-*like* e o medular(13, 14). As PeIN são precursoras de CEC invasivos. As PeIN não relacionadas ao HPV são chamadas diferenciadas, enquanto as basalóides e as verrucosas são associadas ao HPV(13).

A graduação histológica proposta pela OMS e Sociedade Internacional de Patologia Urológica (ISUP) é a classificação recomendada para os CEC do pênis. Os carcinomas bem diferenciados (grau 1) tem aspectos citológicos similares ao tecido normal escamoso. As células crescem em ninhos irregulares com pouco estroma entre elas. Os tumores pouco diferenciados (grau 3) tem um crescimento irregular de ninhos celulares pequenos, pouca queratinização, células polimorfas com núcleo hiper cromático, mitoses frequentes e intensa reação estromal. Os casos não classificados como grau 1 ou 3 são denominados grau 2(13).

1.1.5 Avaliação diagnóstica

Em 80% dos casos, o CaPe inicia-se na glândula e/ou prepúcio(16) e os sintomas mais comuns são coceira, ardor no prepúcio e a presença de ulceração pouco dolorosa(17, 18). Infelizmente, o diagnóstico é feito tardiamente e mais de 45% dos pacientes demoram três meses ou mais para procurarem atendimento médico(18). Os fatores de risco para o atraso na procura por serviço médico são os pacientes solteiros, que moram em área rural, alcoólatras e com lesões verrucosas iniciais(18). Pela demora, aproximadamente 85% dos pacientes têm lesão envolvendo o corpo esponjoso ou mais profundamente(16). O diagnóstico é feito por biópsia da lesão suspeita e, neste momento, são encontrados linfonodos palpáveis entre 20 e 70% dos indivíduos, variando de acordo com o estadiamento e diferenciação tumoral(16, 19, 20).

1.1.6 Estadiamento do câncer de pênis

O estadiamento do CaPe utiliza o sistema TNM da UICC de 2016 (tabela1)(21).

A avaliação do tumor primário é realizada através do exame físico. Caso haja planejamento de preservação peniana, pode-se utilizar a ultrassonografia (USG) ou a ressonância nuclear magnética (RNM) com o intuito de avaliar a extensão da invasão no pênis(22-24).

O exame físico da região inguinal deve ser realizado, anotando-se o número de linfonodos palpáveis e se estão fixos ou móveis. Aproximadamente 50% dos pacientes com CaPe apresentam linfonodos palpáveis ao diagnóstico(25). Sabe-se que aproximadamente 25% dos pacientes com linfonodos não palpáveis apresentam metástases microscópicas(25). Infelizmente, nem a tomografia computadorizada, nem a RNM são suficientemente capazes de diagnosticar os pacientes com metástases linfonodais, bem como o índice de falso positivo da RNM chega a 50%(26, 27). Entretanto, quando separam-se os pacientes em grupos de risco de acordo, de acordo com o estágio T e o grau, os casos considerados de baixo risco têm em torno de 7% de chance de metástases linfonodais, enquanto os pacientes de médio e alto risco têm 28% e 75% de chance de metástases(28). O estadiamento linfonodal com tomografia por emissão de pósitrons (PET-CT) mostrou-se inicialmente promissor, mas posteriormente observou-se que os resultados ficavam abaixo do desejável nos pacientes estágio cN0(29). Uma

alternativa de estadiamento inguinal é a utilização do linfonodo sentinela que será discutido no item 1.1.10 – Tratamento dos linfonodos regionais. Claramente, os pacientes necessitam de um método de estadiamento linfonodal melhor para evitar o subestadiamento que os métodos de imagem podem fornecer.

O estadiamento de metástases pélvicas ou à distância pode ser feito através de tomografia computadorizada (TC) e radiografia de tórax. O PET-CT é uma alternativa em casos duvidosos(30).

Tabela 1 – Classificação clínica e patológica do CaPe, 2016.

Classificação Clínica	
T – Tumor primário	
Tx	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Sem evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma in situ
Ta	Carcinoma verrucoso não invasivo
T1	Tumor invade o tecido conectivo subepitelial
T1a	Tumor invade tecido conectivo subepitelial sem invasão linfovascular e não é pouco diferenciado (T1G1-2)
T1b	Tumor invade tecido conectivo subepitelial com invasão linfovascular ou é pouco diferenciado (T1G3-4)
T2	Tumor invade corpo esponjoso com ou sem invasão de uretra
T3	Tumor invade corpo cavernoso com ou sem invasão de uretra
T4	Tumor invade outras estruturas adjacentes
N – Linfonodos regionais	
Nx	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Sem linfonodos palpáveis ou visíveis
N1	Linfonodo inguinal unilateral palpável e móvel
N2	Múltiplos linfonodos palpáveis móveis ou bilaterais
N3	Massa inguinal palpável fixa ou pélvica, uni ou bilateral
M – Metástase à distância	
M0	Sem metástase à distância
M1	Metástase à distância
Classificação Patológica	
A categoria pT corresponde as categorias clínicas T. As categorias pN são baseadas em biópsia ou excisão cirúrgica	
pN – Linfonodos regionais	
pNx	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
pN0	Sem metástase linfonodal regional
pN1	Metástase para um ou dois linfonodos inguinais
pN2	Metástase em mais de 2 linfonodos inguinais ou linfonodos inguinais bilaterais
pN3	Metástase para linfonodo pélvico, extensão extranodal uni ou bilateral
pM – Metástase à distância	
pM0	Sem metástase à distância
pM1	Metástase à distância
G – Grau histopatológico	
Gx	Grau ou diferenciação não podem ser avaliados
G1	Bem diferenciado
G2	Moderadamente diferenciado
G3-4	Pouco diferenciado / indiferenciado

1.1.7 Fatores prognósticos

O principal fator prognóstico para mortalidade por CaPe é a presença de metástase inguinal ou à distância(25). A mortalidade por CaPe é maior nos pacientes com mais de dois linfonodos acometidos, naqueles com extensão extranodal do tumor ou com envolvimento linfonodal pélvico(31). A história natural é influenciada pela presença de metástases inguinais que aumenta em duas vezes o risco de morte por CaPe (HR=1,96)(32). O grau de diferenciação celular, o estágio e a invasão linfovascular são fatores de risco para disseminação inguinal(33). Tumores GI, GII e GIII tem mortalidade câncer específica de 5%, 38% e 75%, respectivamente(34). Entretanto, apesar do estágio e do grau serem úteis na prática clínica, estudos com grande número de pacientes têm mostrado que o desempenho de ambos como fatores de prognóstico está aquém do desejável. Ornellas et cols. observaram em coorte de 196 pacientes tratados com cirurgia que apenas invasão linfovascular e coilocitose foram associadas a metástase linfonodal de forma independente, denotando a deficiência dos fatores clássicos de prognóstico(35).

O tipo histológico também está associado a metástase inguinal e sobrevida. Os pacientes com os subtipos basalóide, verrucoso-basalóide, papilar basalóide e sarcomatóide apresentam pior prognóstico(14). Em pacientes com linfonodos clinicamente negativos, o alto grau do tumor aumenta em 14 vezes o risco de morte pela doença(36). Além disso, o tempo para a recidiva menor que um ano foi associado a morte pela doença(32).

Fatores como nível educacional e econômicos baixos estão associados ao risco de desenvolvimento deste tipo de câncer, bem como são fatores prognósticos para tumores com estágio local mais avançado, mas não metástases inguinais ou à distância(37).

Níveis elevados de proteína C reativa (PCR) foram associados a pior prognóstico nos pacientes com CaPe. Os pacientes com PCR > 15 apresentam risco de morrer pela doença três vezes maior que aqueles com níveis mais baixos(38).

Outro fator prognóstico parece ser o fibrinogênio elevado antes da cirurgia, que eleva o risco de morte câncer específica (39). Tal achado é condizente com o encontrado na literatura para outros tipos de câncer, principalmente tumores de rim, cabeça e pescoço e cólon(40).

A anidrase carbônica IX também foi testada como fator prognóstico no CaPe e, embora estivesse presente em 42% dos pacientes, não houve correlação com nenhum desfecho do paciente(41).

Apesar de úteis e amplamente empregados na prática clínica, os fatores clássicos de prognóstico, assim como na biologia molecular, ainda são insuficientes para o manejo clínico dos pacientes com CaPe. Há necessidade urgente de novos biomarcadores confiáveis, especialmente no diagnóstico do acometimento linfonodal em fases iniciais (micrometástases), visto a importância para o tratamento, prognóstico e redução do número de linfadenectomias.

1.1.8 Tratamento do tumor primário

O objetivo do tratamento do tumor primário é a remoção radical do tumor, com preservação máxima da haste, embora procedimentos com preservação completa do órgão possam ser realizados(42). No caso de preservação do pênis, a chance de recorrência local é de até 27% versus 5% nos casos de amputação do membro(43). Felizmente, a sobrevida livre de doença após a recorrência local é de 92%(43). Quando ocorre a recidiva, ela é local em 53% dos pacientes, 38% regionais e 9% à distância, conforme estudo que avaliou 314 pacientes que recorreram após tratamento cirúrgico para CaPe(32).

Embora não haja ensaios clínicos controlados, a preservação peniana parece ser melhor em termos funcionais e estéticos devendo ser a primeira escolha de tratamento. Os pacientes submetidos a preservação peniana apresentam menos queixas relacionados ao orgasmo, aparência, função urinária e à vida cotidiana (44). De forma que, para pacientes com doença *in situ*, Ta, T1aG1-2 pode-se realizar a excisão local com circuncisão, ablação a laser com CO₂, recobrimento glandar, glandectomia ou radioterapia(42). Para doença T1b-3 está indicada a ressecção parcial ou radioterapia. Para doença T2-3 dever ser realizada a penectomia parcial ou total com uretostomia perineal e nos casos T4, a quimioterapia neoadjuvante seguida de cirurgia ou radioterapia paliativa(42).

1.1.9 Tratamento dos linfonodos regionais

A drenagem primária do tumor de pênis é feita para os linfonodos inguinais superficiais, posteriormente para os linfonodos inguinais profundos e finalmente para os ilíacos(45). Apesar de seu papel terapêutico, a linfadenectomia inguinal possui alta morbidade para o paciente, com aproximadamente 55% dos pacientes apresentando algum tipo de complicação pós-operatória(46). Dos 35% de complicações maiores, a infecção de ferida com necessidade de antibióticos endovenosos foi a principal delas. Entretanto, necrose de pele, linfocele, deiscência e hematoma também foram frequentes(46). O principal fator de risco para complicações maiores foi o total de linfonodos removidos. Para infecção de ferida operatória, os preditores foram o estágio, idade, interposição de músculo Sartório e o ano de realização da cirurgia(46).

Pela sua elevada morbidade, a indicação de linfadenectomia deve ser criteriosa, especialmente para pacientes sem linfonodos palpáveis. Os pacientes com linfonodos inguinais aumentados (cN+) têm alta chance de metástase e devem ser submetidos a linfadenectomia inguinal, entretanto, em até 45% dos casos, os linfonodos são negativos para neoplasia e o procedimento realizado é desnecessário(25). Nos casos duvidosos, a aspiração com agulha fina pode ser uma alternativa(47).

Naqueles pacientes com região inguinal negativa ao exame físico (cN0), mas com metástase oculta, a linfadenectomia de resgate tem pior sobrevida câncer específica em 3 anos quando comparada à linfadenectomia imediata, 35% versus 84%, respectivamente. Logo, a estratégia de observação para todos cN0 é inadequada(48). Nos pacientes cN0, pode-se utilizar uma estratégia baseada em risco de acordo com grau e estágio tumoral, devendo-se realizar a linfadenectomia inguinal nos pacientes de risco intermediário ou alto risco (G3 ou pT2-4) (28). Atualmente, a maioria dos estudos considera os pacientes T1G2 como risco intermediário pelo risco elevado de metástase inguinal em relação ao T1G1(49). No geral, entre 34 e 40% dos pacientes sem linfonodos inguinais palpáveis (cN0) apresentam micrometástases(25, 28) e considerando os tumores grau 3 e/ou estágio \geq pT2, este número aumenta para 75%(28). Portanto, mesmo estratificando o risco, um grupo considerável de pacientes será submetido a um procedimento mórbido e desnecessário.

A técnica de linfonodo sentinela para decisão terapêutica em pacientes cN0 vem sendo reproduzida em diferentes serviços com resultados controversos. A primeira

descrição desta técnica por Cabanas em 1977(50) mostrou-se pouco confiável, por se basear em reparos anatômicos(51). Horembas, em 1994, introduziu uma nova técnica baseada na drenagem linfática auxiliada pela linfocintilografia(52). Adicionalmente houve refinamento da técnica, com secção seriada e marcação imuno-histoquímica (IHQ) do linfonodo retirado, aspiração por agulha fina guiada por USG e exploração das regiões inguinais sem linfonodos sentinelas identificáveis que foram introduzidas com o objetivo de reduzir o falso negativo, que inicialmente era de 16%(53). Em revisão de literatura, foi encontrado sensibilidade de 77% e 87% quando a técnica de linfonodo sentinela foi comparada com a linfadenectomia formal e seguimento, respectivamente(54). Recentemente, a sensibilidade da técnica alcança 94% com taxa de falso negativo de 6% por paciente(55). Nesta série, as complicações foram de apenas 7%, mostrando-se uma alternativa à linfadenectomia formal nos pacientes cN0(55). Embora o linfonodo sentinela apresente boa sensibilidade, uma meta-análise com revisão sistemática da literatura encontrou grande variação de resultados, com 25% a 100% de sensibilidade entre os diversos estudos que avaliaram esta técnica, provavelmente sendo resultado da curva de aprendizado e mostrando limitação do método(56).

Atualmente, a linfadenectomia videoendoscópica apresenta resultados oncológicos similares em termos de linfonodos retirados quando comparados à linfadenectomia inguinal aberta(57). Mas traz como vantagem menos complicações de ferida operatória, menor tempo de internação e taxas semelhantes de linfocele(57). A linfadenectomia inguinal assistida por robô também resultou no mesmo número de linfonodos retirados com menor morbidade para o paciente, principalmente aquelas classificadas com maior Clavien(58). Ainda assim, essas técnicas mantêm índice de linfocele, linfedema e necessidade de dreno semelhantes à técnica convencional(58).

Como discutido anteriormente no paciente cN0, se por um lado a linfadenectomia inguinal apresenta alto índice de complicações, por outro o linfonodo sentinela não é um procedimento simples e disponível em todos os serviços médicos. Estas limitações tornam necessária a busca por um biomarcador associado a maior risco de doença metastática inguinal, com redução do número de linfadenectomias desnecessárias propiciando melhor manejo dos pacientes.

A linfadenectomia pélvica ipsilateral deve ser realizada nos casos de pacientes com dois ou mais linfonodos positivos inguinais ou extensão extracapsular(42). Em pacientes com linfonodos inguinais comprometidos (pN+), 31% destes apresentam

metástase para linfonodos pélvicos. Nos pacientes com linfonodos pélvicos positivos, a sobrevida câncer específica em cinco anos cai de 71% para 33% (59). Os pacientes com maiores riscos para metástase pélvica são aqueles com três ou mais metástases inguinais, diâmetro das metástases de 30mm ou maior e extensão extranodal(59).

Naqueles pacientes com linfonodos inguinais acometidos, existe evidência limitada e baseada em estudos pequenos e retrospectivos que a quimioterapia adjuvante beneficia este grupo de pacientes(60, 61). Para os pacientes que tenham massa pélvica grande (cN3), a quimioterapia neoadjuvante seguida de linfadenectomia é uma opção com sobrevida global em cinco anos de até 56% naqueles que respondem ao tratamento sistêmico(62, 63).

1.1.10 Tratamento da doença metastática

Para pacientes com doença metastática a distância, a sobrevida média é de nove meses(64). Os fatores de pior prognóstico neste grupo de pacientes parecem ser metástase visceral e ECOG PS \geq 1. Pacientes que são submetidos a regime baseado em cisplatina têm melhor sobrevida global, embora o tempo médio para progressão seja de quatro meses e apenas 36% dos pacientes atinjam um ano de sobrevida(64). A introdução de taxanos pode aumentar a atividade e a resposta nestes pacientes, mas seu uso ainda não está completamente estabelecido(65, 66). A descoberta de novos biomarcadores pode ser útil na criação de terapia alvo que possa mudar o panorama do tratamento do CaPe metastático; da mesma forma que o observado com a introdução da terapia alvo com a herceptina ou com os inibidores anti-PDL1 que mudaram consideravelmente o cenário do tratamento do câncer avançado de mama e rim, respectivamente(67, 68). Em resumo, torna-se claro a necessidade de identificação de características biológicas que identifiquem o potencial de progressão do CaPe e possibilitem a seleção individualizada do tratamento, a identificação de pacientes com necessidade de terapia adjuvante e a criação de terapia alvo. A pesquisa continua no sentido de estabelecer novos fatores prognósticos e marcadores de terapia com enfoque principal no estudo dos marcadores moleculares.

1.2 Biologia molecular no câncer de pênis

Pouco se sabe sobre a biologia molecular do CaPe, o que explica a ausência de biomarcadores para esta neoplasia até o momento. Com relação as alterações genéticas descritas neste tumor, os seguintes genes mutados são frequentemente encontrados: *TP53*, *CDKN2A*, *PIK3CA* e o *HRAS*(69, 70). A maior expressão da proteína p53 através de imunohistoquímica mostrou-se um fator independente para disseminação linfonodal no CaPe em estudo com 82 pacientes(71).

Alterações (ganho de cópias ou mutações em único nucleotídeo) nos genes *MYC*, *CCND1*, *TP53*, *ATP11B* e *EGFR* também apresentaram pior sobrevida livre de eventos (progressão tumoral ou morte) em estudo com 43 pacientes com CaPe(69). Além desses genes, foram observadas que as perdas alélicas associadas aos genes *DLC1* e *PPARG* estão associadas a pior sobrevida câncer específica e o *DLC1* está associado à maior recorrência tumoral em análise multivariada em estudo com 46 pacientes operados por CaPe(72).

A via PTEN/PI3K/Akt também foi associada à carcinogênese do pênis. Em estudo com 112 amostras de CEC de pênis, encontrou que o PTEN estava ausente em tumores verrucosos ou basalóides em 23% dos casos contra 5% dos outros subtipos(73). Ainda sobre a via do mTOR no CaPe, foi demonstrado em estudo com 67 amostras tumorais que a maior expressão das proteínas desta via, pIF4E e p53 estava associada a metástases inguinais e pior sobrevida câncer específica(74). A maior expressão de pmTOR e p53 foram ainda associados aos tumores HPV negativos(74). Outro gene associado ao CaPe é o *ARID1A* e que está relacionado à via PTEN/PI3K/Akt. A maior expressão da proteína ARID1A por imuno-histoquímica nas células tumorais esteve associada ao maior grau histológico e a maior expressão de PTEN nestas células(75).

Outra via alterada parece ser a via da sinalização do Wnt. Esta é uma via de proliferação celular e para demonstrar sua participação no desenvolvimento do CaPe, foram estudadas 101 amostras e as proteínas alvo (*CCND1*, *MYC*, *MMP7*) desta via. Observou-se que a expressão das proteínas alvo estão aumentadas de 1,6 a 3 vezes no tecido tumoral em relação ao normal em pacientes com CaPe(76).

O receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) é parte de uma grande família de receptores de tirosina quinase expressas em diversos tecidos, e que possui atividade complexa na sinalização de crescimento e ciclo de vida celular(77). Por essa

característica, essa família de receptores tem atraído atenção como alvos para terapia contra o câncer(77). A maior expressão de EGFR é encontrada na maioria dos CaPe (78, 79). Além disso, o aumento da expressão da proteína EGFR e das cópias do gene *EGFR* estão associados a pior sobrevida câncer específica(80). Neste cenário, terapias direcionadas contra esse alvo estão sendo testadas(81, 82).

O oncogene *MET* codifica um receptor de tirosina quinase (c-MET) que está presente em 87% dos pacientes com CaPe e está ligado a polissomia do cromossomo 7, presente em quase 46% dos pacientes. Neste estudo com 92 pacientes tratados cirurgicamente não foram encontradas associações entre a expressão de c-MET e os fatores prognósticos clássicos(83).

Alterações genéticas nas vias das quinases estão associadas a regulação aumentada dos genes *GNRH*, *PTEN*, *STAT3*, *IL-8* e sinalizador de receptor de células B(84). A proteína quinase CK2 é outra proteína envolvida na progressão, proliferação e diferenciação celular(85) e, nos tumores de pênis, sua expressão está elevada e é fator de risco independente para morte pela doença(86).

Outra via explorada na carcinogênese dos tumores penianos é a via do fator de crescimento tipo insulina (IGF). Esta via está envolvida na proliferação celular, crescimento e apoptose (87). Nos tumores penianos, a expressão do receptor do fator 1 de crescimento tipo insulina (IGF1R) foi associado aos tipos de tumores basalóides ou basalóides- verrucosos, ao grau histológico maior e a infecção por HPV(88). Outros marcadores de proliferação celular estão associados a pior progressão e mortalidade por CaPe. Neste sentido, o Ki-67, a proteína de manutenção do minicromossomo 2 (MCM2) e a geminina foram avaliados através de imuno-histoquímica. Em coorte com 158 pacientes, a maior expressão dessas proteínas foi associada a doença mais agressiva (pior grau histológico, associação positiva com invasão microvascular – IMV – e pN), embora não tenham sido identificados como fatores independentes de mortalidade câncer específica(89). Outro estudo buscando identificar fatores de proliferação celular, identificou que o fator de crescimento derivado de hepatoma (HDGF) estava presente em mais de 50% das células tumorais de CaPe e associado ao fator de crescimento de endotélio vascular A (VEGF-A). Além disso, esta proteína estava associada de forma independente a pior sobrevida(90).

Com relação à fisiopatologia da infecção pelo HPV e carcinogênese do pênis, sabe-se que as oncoproteínas virais E6 e E7 ligam-se às proteínas do retinoblastoma e do

p53, alterando o ciclo celular normal e a apoptose. Esta inativação leva a proliferação celular autônoma, com acúmulo de p16^{ink4a}, que só é vista em pacientes com infecção por HPV de alto risco(91). Além disso, os pacientes p16 positivos não apresentam expressão de p53 e vice-versa(91). Os pacientes com p16 positivos, ou seja, com tumores relacionados ao HPV apresentam prognóstico oncológico melhor que aqueles com p16 negativos e p53 positivos(92, 93). Além desta correlação entre p16 e p53, parece existir um padrão similar em alterações de cópias cromossômicas entre pacientes com CaPe relacionados ou não ao HPV(94). Outra proteína relacionada à infecção pelo HPV e carcinogênese no pênis é a TLR4, que aparentemente tem expressão diminuída nos casos de carcinomas associados ao HPV e elevada nos casos não associados(95). Ao contrário, a expressão da proteína anexina 1 (ANXA1) está aumentada nos casos de CaPe relacionados ao HPV de alto risco(96). A perda de alelo próximo ao p16^{ink4a} e a metilação de sua área promotora parecem estar associadas a metástase linfonodal(97).

Atualmente, sabe-se que os tumores criam um microambiente que inibe o sistema imunológico de combater o câncer. Um dos pontos responsáveis por esse mecanismo de inibição é o complexo PD-1/PD-L1, que tem sido amplamente estudado no campo da oncologia. O PD-1 é um receptor celular no linfócito T. Quando o PD-L1 se liga ao PD-1, as células T recebem um sinal inibitório(98). No CaPe, quase 50% das células expressam PD-L1, principalmente em tumores de alto risco HPV negativos. Além disso, a expressão difusa deste ligante está associada a maior mortalidade pela doença(99). Inexiste até o momento estudo que tenha testado tratamento baseado em inibidores de PD1 ou PD-L1 no CaPe, além de relatos de casos(100).

Os eventos epigenéticos também contribuem para a carcinogênese do CaPe. Além do papel dos microRNAs (miRNA), que será comentado em sessão específica, e da metilação em genes descritos anteriormente, foi identificado que os tumores de pênis apresentam metilação diminuída das histonas H3K4me1, H3K9me1, H3K27me2 e H3K27me3 e aumentada da H3K9me3(101). Ainda não foi demonstrada relação deste padrão de metilação de histonas com parâmetros clínico-patológicos nos pacientes estudados(101).

Apesar do conhecimento recentemente adquirido sobre biologia molecular em CaPe, até o presente momento, não existem biomarcadores com resultados confiáveis o suficiente para predizer diagnóstico, prognóstico ou terapia alvo na prática clínica. É reconhecido que a baixa incidência, a natureza retrospectiva dos estudos e ausência de

validação com estudos de alta qualidade expliquem a inexistência de um biomarcador atual e o progresso limitado no conhecimento molecular da carcinogênese desta neoplasia quando comparado a outros tumores, como próstata ou mama. Adicionalmente, a pesquisa de biomarcadores no CaPe foi tradicionalmente focada nas alterações moleculares resultantes da infecção pelo HPV. Uma vez que nem sempre o tumor está associado ao HPV, a pesquisa atual tem dado atenção a outros eventos moleculares genéticos e epigenéticos.

1.3 MicroRNAs

1.3.1 Introdução aos microRNAs

MicroRNAs são um grupo de pequenas sequências de RNA não codificantes que regulam a estabilidade e a eficiência da tradução do RNA mensageiro (mRNA)(102). Em 1993 foi descoberto um pequeno RNA, lin-4, que regulava (reduzia) uma proteína codificada pelo gene *LIN-14* durante o desenvolvimento do primeiro estágio larval da *Caenorhabditis elegans* através de interação com seu mRNA. Este pequeno RNA tinha entre 22 e 61 nucleotídeos (nt) e não codificava proteína(103). Atualmente, condiciona-se o aparecimento e aumento do número de miRNAs à multicelularidade e à complexidade dos organismos(104).

Os genes dos miRNAs podem estar localizados no genoma entre genes codificantes, chamados de intergênicos. Estes miRNAs são transcritos de forma semelhante aos genes codificantes de proteínas. Em humanos, aproximadamente 50% dos miRNAs são intergênicos. A outra metade dos miRNAs em humanos são intragênicos, localizados dentro de um gene. Os miRNAs intrônicos possuem expressão semelhante ao seu gene. Eles podem agir de forma sinérgica ou contrária ao gene hospedeiro e possuem promotores próprios. Em humanos, apenas 5% dos miRNAs são exônicos. Esses miRNAs possuem os mesmos promotores do seu gene hospedeiro. Outra forma comum de aparecimento de miRNAs no genoma é de forma sequencial e contígua, do tipo *cluster* (do inglês, agrupamento). Aparentemente, esses *clusters* participam de processos biológicos semelhantes(105).

Os miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II (RNA Pol II) a partir de seus genes. Nesse primeiro momento, forma-se uma estrutura de miRNA primitivo (pri-

miRNA) em forma de grampo (*hairpin*). O processamento do pri-miRNA é feito dentro do núcleo e a primeira etapa da maturação é chamada de *cropping*. Nesta fase, o pri-miRNA é convertido em miRNA precursor (pre-miRNA) pela enzima DROSHA. A ação desta enzima depende de outras proteínas acessórias e a clivagem pela DROSHA define o terminal do miRNA. Esta enzima deixa o pre-miRNA com aproximadamente 65 nt. O pre-miRNA é, então, transferido para o citoplasma através da proteína exportina 5 (EXP5) ligada a proteína nuclear RAN de ligação a GTP (RAN-GTP). No citoplasma, o pre-miRNA é clivado pela Dicer em duas fitas simples de RNA. Neste momento, aparecem o miRNA e o RNA*. Este último geralmente não apresenta função e é degradado. O miRNA maduro liga-se à proteína argonauta 2 (AGO2) formando o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) (Figura 1)(106).

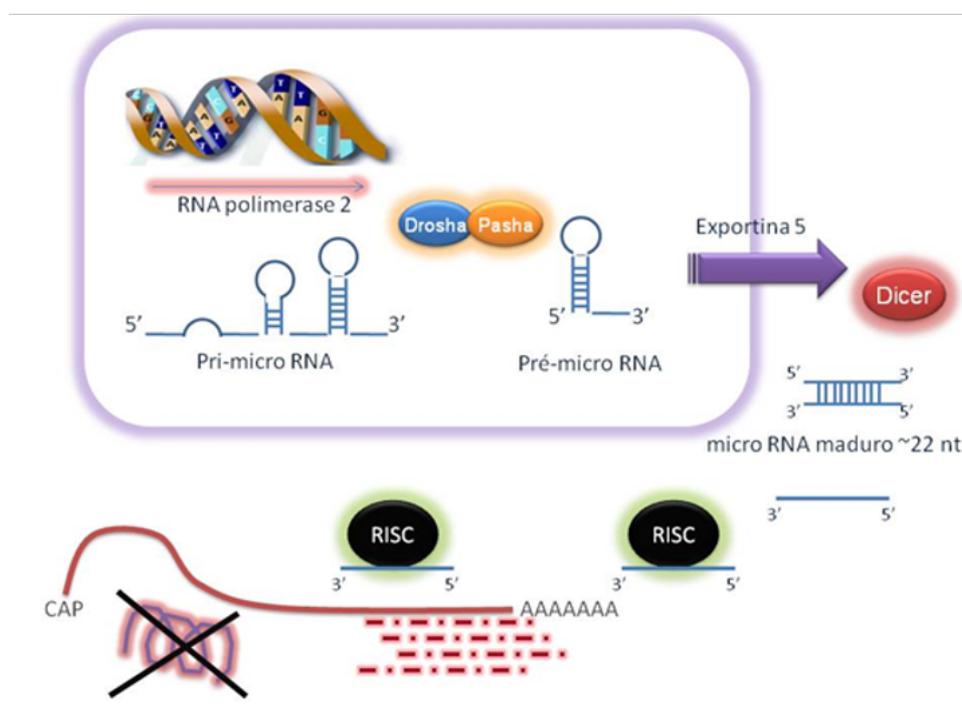


Figura 1 – Biogênese do miRNA (cedida pela Profa. Dra. Kátia R. M. Leite)

Os miRNAs são capazes de induzir o silenciamento gênico através da inibição transcricional, clivagem do RNA mensageiro ou inibição da sua tradução em proteína através da sua ligação à proteína AGO e formação do RISC. O mecanismo é dito epigenético, pois há silenciamento da expressão gênica sem que ocorra mutações ou outras alterações no DNA. Para que esses fenômenos aconteçam, existe uma região *seed* na posição 2 a 8 da extremidade 5' do miRNA que faz a hibridização com o alvo. Entretanto, foram identificadas duas novas formas de ação dos miRNAs, que são

exatamente o contrário daquilo observado até então. Foi visto que os miRNAs poderiam promover a transcrição de genes e aumentar a eficiência de tradução proteica no complexo ribossomal. Zhang e cols. demonstraram em 2014 que o miR-let-7i é capaz de interagir com o TATA-box e promover a transcrição do gene *IL-2*(107). Vasuvedan e cols. demonstraram que a eficiência de tradução proteica pode ser aumentada ou reduzida de acordo com o ciclo de vida celular. Durante a fase de parada do ciclo celular, o mRNA do *TNF α* tinha sua tradução aumentada pelo miR-369-3. Entretanto, durante a fase de proliferação celular, sua tradução era reprimida(108).

1.3.2 MicroRNAs na fisiologia humana

O primeiro miRNA descoberto no ser humano foi o let-7 em 2000(109). Atualmente, mais de 2.600 sequências maduras de miRNAs foram identificadas no genoma humano (miRbase v22.1 – www.mirbase.org/).

Alguns estudos mostram que os miRNAs, no ser humano, apresentam um perfil de expressão como uma “assinatura” em diversos órgãos e tecidos, entre eles o miR-122 que aparece preferencialmente no fígado e o miR-1 no coração e no músculo. Pode-se citar ainda os miRNAs “tecido-específicos”, ou seja, apresentando nível de expressão muito acima dos demais, como por exemplo, o miR-124 no cérebro e o miR-1, miR-133 e o miR-206 no músculo(110).

Através da adição ou superexpressão, ou ainda, da remoção ou subexpressão em tecidos celulares ou modelos animais, a função dos miRNAs na fisiologia humana tem sido demonstrada. No fígado, o miR-122 parece ser capaz de regular o colesterol sérico e triglicérides em animais; e, quando utilizados antagonistas do miR-122, ocorre uma redução do colesterol sérico em ratos(111). No caso da regulação da glicose, o miR-375 é altamente expresso em células de ilhota pancreática e regula negativamente a secreção da insulina pelas células beta, tornando-se um alvo potencial para terapêutica(112).

Embora tenham uma função fisiológica, a alteração de expressão destes pequenos RNAs não codificantes pode estar associada a condições patológicas. Por exemplo, o miR-146a foi associado ao processo inflamatório em pacientes com epilepsia(113). Outro miRNA associado à epilepsia foi o miR-155, que está aumentado em crianças com epilepsia do lobo temporal(114). Além de doenças neurológicas e psiquiátricas, os miRNAs foram implicados também na patogênese das doenças

cardiovasculares. O miR-126 foi implicado na regulação da angiogênese e neoangiogênese após infarto agudo do miocárdio(115). Entre outras doenças cardíacas, a miocardite viral também apresenta alteração da expressão do miR-1, que está bastante aumentada com conseqüente redução da expressão da proteína conexina-43. Nesta doença ainda, quando o miR-155, que usualmente está aumentado nos tecidos infiltrados por macrófagos e linfócitos T, é suprimido, ocorre uma redução do dano no miocárdio durante a miocardite(116). Aparentemente, os miRNAs estão implicados na fisiologia e na fisiopatologia de quase todos os processos humanos.

1.3.3 MicroRNAs em oncologia

Como visto anteriormente, os miRNAs têm potencial para classificação, diagnóstico e prognóstico nas doenças oncológicas, podendo ser utilizados amostras de tecidos tumorais ou fluidos biológicos em investigações minimamente invasivas para análise de sua expressão(117). Em 2002, foi publicado o primeiro estudo que demonstrou a desregulação de miRNAs em doenças humanas. A doença era a leucemia linfocítica crônica e a deleção ou regulação negativa dos miRNAs miR-15a e do miR-16-1 estavam implicadas(118). Começava aí uma corrida para identificar alterações de expressão em miRNAs em oncologia.

Além das neoplasias hematológicas, foram investigados miRNAs em neoplasias colorretais. Os níveis de miR-21 e miR-135b estão correlacionados positivamente com o estágio do câncer colorretal enquanto as expressões aumentadas de miR-96 e miR-135b estavam associadas com a presença de metástase hepática(119). Além da expressão dos miRNAs em tecidos, a concentração plasmática aumentada do miR-141 também mostrou-se associada com metástase, níveis de antígeno carcinoembrionário e pior prognóstico(120).

Nosso grupo estudou o perfil de expressão de painel de 14 miRNAs em 18 espécimes cirúrgicos de câncer de próstata (CaP) localizado, quatro amostras de tumor metastático e duas linhagens celulares de CaP. Demonstramos perda de expressão dos miR-218, miR-Let-7c e miR-100 com a progressão do tumor primário para a metástase(121). Em outro estudo, avaliamos a expressão de painel de miRNAs em 49 pacientes com CaP localizado tratados com prostatectomia radical e observamos que a maior expressão do miRNA-100 estava independentemente associada com maior chance

de recorrência tumoral(122). Buscando biomarcadores no CaP, foi desenvolvido um painel com cinco miRNAs capazes de diferenciar o CaP da hiperplasia prostática benigna. Neste painel, três miRNAs estão reduzidos (let-7e, let-7c e miR-30c) e dois estão elevados (miR-622 e miR-1285)(123). Já o miR-221 está mais elevado em pacientes com câncer de próstata dependente de andrógenos(124).

Em câncer de testículo, o miRNA-371a-3p foi avaliado em 82 pacientes com tumores não seminomatosos submetidos a linfadenectomia de retroperitônio. Ele encontrava-se elevado pré-orquiectomia e pré-quimioterapia com queda após o tratamento. Mais importante, nos pacientes com tumores viáveis no retroperitônio, ele encontrava-se mais elevado que nos casos de necrose/fibrose ou teratoma, sem diferença entre estes dois últimos grupos, tornando este miRNA um potencial biomarcador de resposta terapêutica e indicação de tratamento subsequente(125).

O câncer de colo uterino é um câncer também associado ao HPV e assim como outros tumores, incluindo o de pênis, busca-se compreender sua patogênese e encontrar biomarcadores de agressividade. Os miRNAs miR-143 e miR-145 estão reduzidos em relação aos controles teciduais normais, incluindo em doenças HPV negativas(126). O miR-127 parece ser um marcador de metástase linfonodal precoce neste tipo de doença(127). O mesmo papel também parece ter o miR-200a, que é capaz de predizer a sobrevida e a capacidade de metástase tumoral(128). Entretanto, até o momento não há biomarcadores utilizados no manejo clínico destes doentes.

1.3.4 MicroRNAs no tumor de pênis

A literatura sobre expressão de miRNAs em CaPe é limitada. Em 2011 foi descrito pela primeira vez a associação entre a infecção por HPV de alto risco com a alteração de expressão de miRNAs oncogênicos e supressores de tumor(129). A maioria destes miRNAs está desregulada pelas vias E6-p53 e E7-pRb, incluindo os miR-34a/b/c, miR-23b, miR-145 e o miR-218 que estão reduzidos através do *HR-E6* e o miR-146a e a família do let-7 que estão reduzidos pelo *C-MYC*, ativado pelos *HR-E6* e *HR-E7*(129).

Baseado nestes achados, em 2014 Barzon et cols. publicaram o primeiro estudo com avaliação daqueles miRNAs através de transcrição reversa de reação em cadeia de polimerase quantitativa (qRT-PCR) em 59 amostras de CaPe e oito controles com condiloma. As expressões dos miR-218, miR-23b, miR-145 e miR-146a foram menores

em pacientes com infecção por HPV de alto risco do que naqueles pacientes HPV negativos, apesar de não ter alcançado diferença estatística. Somente a expressão elevada do miR-196a esteve associada a pior grau histológico. Neste estudo foi demonstrado também que a metilação do gene *SLIT2* estava presente em casos de CaPe HPV positivos e que dentro deste gene encontra-se a região promotora do miR-218(130). Este mesmo grupo demonstrou em 2016 que a redução de expressão do miR-146a estava associada a aumento da expressão do EGFR, representando outro mecanismo de regulação da expressão desta proteína nos pacientes com CaPe(131).

Outro estudo demonstrou que o gene *SLC8A1*, que codifica um canal trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, está diminuído no CaPe. Foi observado em 37 amostras de CaPe que seu inibidor, o miR-223, estava elevado neste tipo de tumor, ocasionando a diminuição do cálcio no tecido tumoral, com conseqüente redução da apoptose e aumento da proliferação celular(132).

Diferente do primeiro estudo, Zhang e col., em 2015, avaliaram a diferença de expressão de miRNAs entre o tecido normal e o tumoral em 13 pacientes através da técnica de sequenciamento de nova geração (NGS). Eles encontraram 1500 miRNAs expressos nos tecidos normais e tumorais com diferença significativa em 56 deles entre os pares. Através de ontologia genética e realizando a análise de vias da enciclopédia de genes e genoma de Kyoto (KEGG) puderam encontrar os supostos genes alvos dos 56 miRNAs identificados no NGS e as vias envolvidas na biologia do CaPe. As principais vias envolvidas encontradas foram Wnt, MAPK, p53, PI3K-Akt, Notch e TGF- β (133). Neste estudo não foi realizada correlação da expressão dos miRNAs com o prognóstico.

Com o objetivo de encontrar miRNAs diferentemente expressos em tecidos de pacientes metastáticos e não metastáticos, Hartz et cols. em 2016 publicaram estudo com 26 pacientes com CaPe tratados com cirurgia e observaram menor expressão dos miR-1, miR-101 e miR-204 no tumor primário e nas metástases linfonodais; demonstraram também que a menor expressão dos três miRNAs estava associada a menor sobrevida câncer específica (134).

Em 2017, foi publicado o primeiro artigo que realizou estudo de varredura para identificar os miRNAs e mRNAs diferencialmente expressos entre tecidos tumoral e normal em 23 pacientes com CaPe. Foram encontrados 81 miRNAs e 2697 mRNAs diferencialmente expressos na comparação entre os tecidos normal e tumoral. Através da análise integrativa entre os miRNAs e os mRNAs, foram encontrados 68 miRNAs que

potencialmente regulavam 255 mRNAs. Destes, oito miRNAs e nove mRNAs foram validados através de qRT-PCR. Os *MMP1*, *MMP12* e *PPARG* e os miR-31-5p, miR-224-5p e o miR-223-3p foram capazes de distinguir tumores de tecido normal. Além disso, a expressão elevada de *MMP1* foi associada a tumores com metástase linfonodal e pior sobrevida global(135).

Recentemente, buscando biomarcadores em CaPe, Pinho e cols. estudaram os miR-21-5p, miR-107 e miR-223-3p, que já haviam sido descritos em CaPe, em 50 amostras por qRT-PCR. Eles demonstraram que estes miRNAs estavam elevados no tecido tumoral peniano e ainda que o miR-107 estava associado a pior grau e estágio T, bem como o miR-223-3p estava associado a presença de metástase e pior sobrevida câncer específica (136). O mesmo grupo publicou em 2021, com os mesmos casos e por qRT-PCR, que o miR-145 estava diminuído no tumor de pênis e sua menor expressão associada a pacientes com invasão linfática e tumores associados ao HPV(137).

Em 2021 foi publicado estudo por Ayoubian e cols.(138) no qual utilizaram técnica de varredura por *microarray* em 22 amostras de pacientes com CaPe e 8 de pacientes sem câncer. Na comparação entres os tecidos com e sem neoplasia não encontraram miRNAs diferencialmente expressos (DEmiRs), entretanto quando compararam pacientes com tumores HPV positivos em relação àqueles sem HPV, encontraram 876 DEmiRs. Na avaliação de pacientes metastáticos versus não metastáticos do tipo CEC usual, encontraram 118 DEmiRs e conseguiram validar o miR-137 e o miR-328-3p por qRT-PCR em amostra expandida com 45 tecidos de pacientes (27 tumores e 18 tecidos sem neoplasia).

Embora estudos em biologia molecular e miRNAs em CaPe tenham surgido recentemente na literatura e tenham nos ajudado a compreender melhor a carcinogênese neste tumor, poucos conseguiram identificar marcadores confiáveis de prognóstico sendo os dados existentes na literatura sobre miRNAs e CEC de pênis ainda considerados escassos. Com a ampliação do entendimento da biologia molecular em oncologia, está claro que não são apenas os genes, ou suas alterações, que causam as doenças; e que mecanismos epigenéticos também têm participação na carcinogênese. Este cenário de ausência de biomarcadores e o entendimento que outros eventos epigenéticos são responsáveis pela fisiopatologia das doenças justifica a realização de nosso estudo.

Acreditamos que o desenho de nosso estudo, que comparou os miRNAs diferencialmente expressos entre tecido tumoral *versus* “normal” e entre tumores de pior

versus melhor prognóstico, pode validar resultados prévios e identificar novos “marcadores de prognóstico” que representam a principal necessidade para esta neoplasia, conforme destacado no consenso da Associação Europeia de Urologia (EAU)(42). Buscamos ir além, procurando através de um painel de genes cuidadosamente selecionados, e entre eles alvos dos miRNAs previamente identificados, encontrar alterações nestes que possam ajudar a entender a carcinogênese e encontrar biomarcadores e futuros candidatos a terapias alvo.

2 Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo primário

Identificar o padrão de expressão de miRNAs através da técnica de varredura por *microarray* em espécimes cirúrgicos de tumor primário de CEC de pênis e verificar os miRNAs diferencialmente expressos entre o tecido tumoral e o tecido não neoplásico adjacente e validá-los por qRT-PCR. Descrever os miRNAs diferencialmente expressos pela mesma técnica de varredura por *microarray* entre casos com doença metastática versus não metastática e validá-los por qRT-PCR. Realizar análise integrativa dos miRNAs e os genes alvos identificados na etapa anterior. Confirmar *in silico* os miRNAs e genes identificados nas comparações anteriores com as bases de dados públicas disponíveis.

2.2 Objetivos secundários

Correlacionar o perfil de expressão dos miRNAs diferencialmente expressos na etapa anterior com os fatores clássicos de prognóstico em CaPe: estágio patológico, grau tumoral, invasão microvascular, invasão perineural, infecção pelo HPV e sobrevida livre de recorrência, câncer específica e global.

Identificar e correlacionar a expressão de um painel de genes alvo e genes relacionados a carcinogênese de pênis e de suas proteínas com os fatores de prognóstico do CEC de pênis: estágio patológico, grau tumoral, invasão microvascular, invasão perineural, infecção pelo HPV e sobrevida livre de recorrência, câncer específica e global.

3 MÉTODOS

3.1 Pacientes

Entre julho de 2015 e janeiro de 2018, avaliamos prospectivamente todos os pacientes com CEC de pênis, localizado ou localmente avançado, candidatos a tratamento cirúrgico e que foram encaminhados ao Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP). Foram selecionados os casos consecutivamente que satisfizeram todos os critérios de inclusão: assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), concordar com o protocolo de seguimento do estudo, disponibilidade de material biológico, CEC de pênis confirmado por exame anatomopatológico, prontuário com dados clínicos disponíveis, pacientes submetidos à penectomia parcial ou total com ou sem linfadenectomia inguinal. Os critérios de exclusão foram tratamento cirúrgico prévio de CEC de pênis, radioterapia pélvica prévia, material biológico insuficiente, cirurgia paliativa sem intenção curativa, pacientes submetidos a tratamento do tumor primário em outra instituição e infecção pelo vírus HIV, Hepatite B (HBV) ou C (HCV). Os pacientes incluídos responderam a um questionário com os seguintes dados clínicos: idade, raça, naturalidade, escolaridade, profissão, patologias crônicas, hábitos, postectomia prévia, uso de preservativos, doenças sexualmente transmissíveis (DST), antecedente de zoofilia, HPV e balanopostite.

A cirurgia realizada para tratamento local foi a penectomia parcial naqueles pacientes com haste residual peniana suficiente para micção adequada, de acordo com o julgamento do cirurgião responsável, ou total com o objetivo de margem negativa para neoplasia na peça retirada. Aqueles com linfonodos inguinais palpáveis (cN+) ou sem doença palpável (cN0) mas com doença local T1 e tumor pouco diferenciado (G3) ou \geq pT2 foram encaminhados para linfadenectomia radical inguinal bilateral(42). Os pacientes com dois ou mais linfonodos acometidos no mesmo lado ou extensão extracapsular do linfonodo foram encaminhados para linfadenectomia pélvica ipsilateral ao lado acometido(42). A neoadjuvância com quimioterapia foi indicada para pacientes com metástase inguinal cN3, adjuvância com quimioterapia para pacientes com doença pN2-3 e quimioterapia/radioterapia paliativa para recidivas irrissecáveis ou à distância(42).

No pós-operatório os pacientes foram seguidos de acordo com o consenso da EAU(42). O exame físico em busca de sinais de recidiva local ou na região inguinal e a avaliação de complicações foram realizados a cada três meses nos primeiros dois anos e a cada seis meses no 3º ano de acompanhamento. Tomografia ou ressonância de pelve foram realizadas a cada seis meses nos primeiros dois anos e uma vez no 3º ano. Os fatores clássicos de prognóstico avaliados foram estágio patológico, grau tumoral, IMV, invasão perineural, infecção pelo HPV, tamanho do tumor e grupo de risco para metástase de acordo com a EAU(42).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do ICESP, nº 1.016.980, e desenvolvido sob os termos da Declaração de Helsinki. O projeto foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, sob número 2015/17097-2.

3.2 Processamento de espécimes cirúrgicos

As amostras teciduais representativas do tumor primário foram coletadas imediatamente após a remoção do espécime cirúrgico, por patologista de nossa instituição que, avisado previamente, aguardava o produto da penectomia no bloco cirúrgico. O patologista removia área representativa do tumor ($\geq 80\%$ de área tumoral na amostra) e avaliava também tecido não neoplásico adjacente para serem armazenados. Um fragmento foi congelado a -80°C no Biobanco Acadêmico para Pesquisa em Câncer do ICESP/USP para posterior extração de RNA total (para análise de expressão dos miRNAs e dos mRNAs alvos) e de DNA (para tipagem do HPV) e o restante da peça cirúrgica foi processada de forma habitual. Inicialmente, foi realizada a fixação em formalina tamponada a 10% por um período de 4 a 6 h e, posteriormente, inclusão em parafina. Cortes de 4 a 6 μm foram corados por Hematoxilina e Eosina (HE) e analisados em microscópio óptico por um único uropatologista (Dra. Sheila F. Faraj) para definição do tipo histológico, grau tumoral, presença de IMV, invasão perineural, condições das margens cirúrgicas e envolvimento linfonodal. O Biobanco do ICESP/USP foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do ICESP e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), CEP nº 031/12 e CONEP nº 023/2014. Os pacientes também assinaram TCLE para guarda de material biológico no Biobanco.

3.3 Extração e isolamento do RNA total

A obtenção das amostras para extração de ácidos nucleicos (tumor e tecido não neoplásico) foi feita por meio de cortes de 6 μm dos tecidos em criostato eletrônico multiuso, marca Carl Zeiss, modelo Hyrax C25. Para realizar os criocortes, inicialmente, os tecidos foram incluídos em Tissue-Tek® O.C.T. Compound, Sakura® Finetek. O excesso de O.C.T. foi retirado utilizando-se água Milli-Q ultrapura, livre de DNase/RNase. As superfícies internas e externas do criostato foram higienizadas com etanol a 70% e em seguida com RNase *away*, além dos 15 minutos de luz ultravioleta. Os criocortes de tecidos foram feitos com o criostato a -34°C e, em seguida, foram colocados em tubos de 1,5mL previamente pesados e numerados, para obtenção de aproximadamente 5mg e 30mg de tecido para extração de DNA e RNA, respectivamente, sendo armazenados a -80°C até o momento do uso.

Para extração de RNA total foi utilizado o kit de isolamento miRVana® (Thermo Fisher Scientific, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Este kit permite o isolamento de todos os tipos de RNA (incluindo mRNA e miRNA), dos espécimes cirúrgicos. Os tubos contendo amostras de tecidos foram retirados do freezer a -80°C e colocados em isopor com gelo seco para evitar qualquer descongelamento. Ainda com o tubo dentro do gelo seco, foi adicionado 300 μL de Lysis/Binding Buffer e, em seguida, os tubos foram retirados do gelo e a solução homogeneizada para que toda a solução de lise penetrasse no tecido. Após, os tubos foram colocados em suporte à temperatura ambiente e a homogeneização realizada utilizando seringa hipodérmica de insulina com agulha, por pelo menos 20 vezes para ruptura do tecido e completa homogeneização das amostras.

Ao tecido macerado, foram adicionados 30 μL de aditivo para homogeneização. Logo após, os tubos foram colocados em gelo por 10 minutos e adicionados 300 μL de fenol-clorofórmio. As amostras foram homogeneizadas em vortex por 60s e centrifugadas em velocidade máxima (10.000g) por 5 minutos a temperatura ambiente para separar as fases aquosa e orgânica. A fase aquosa foi removida e transferida para um novo tubo, onde foram adicionados 1,25 volumes de etanol a 100% a temperatura ambiente. A solução foi aplicada em uma coluna e submetida a centrifugação a 10.000g por 15s.

O filtrado foi descartado e o procedimento foi repetido até que toda solução fosse passada pela coluna (utilizando o mesmo tubo coletor para as etapas de lavagem). A

coluna foi lavada uma vez com a solução de lavagem 1 e duas vezes com a solução de lavagem 2/3, seguidas de centrifugação a 5-10s a 10.000g.

Após o descarte do filtrado, centrifugamos por mais 1min a 10.000g para remoção de qualquer fluido residual na coluna. As colunas foram então transferidas para um novo tubo e adicionados 60µL de água livre de RNase pré-aquecida a 95°C no centro da coluna para eluir o RNA total. Os tubos foram centrifugados por 20-30s a 10.000g para recuperar o RNA e foram armazenados a -80°C até o momento da utilização.

A concentração e pureza do RNA total foram analisadas utilizando-se o NanoDrop ND1000 (Thermo Fisher Scientific, USA) e a qualidade do RNA foi determinada por eletroforese capilar utilizando-se o 2200 TapeStation Instrument (Agilent Technologies, EUA). Amostras com razão de absorbância A260/A280 entre 1,8-2,1 e RIN (RNA Integrity Number) > 7 foram usados para os experimentos de *microarray*.

3.4 Perfil de Expressão de miRNA por *Microarray*

O perfil de expressão dos miRNAs foi avaliado utilizando-se o Genechip® miRNA 4.0 e a plataforma de *microarray* da Affymetrix (Affymetrix, EUA), seguindo orientações do fabricante. Este Genechip® inclui 2578 sondas de miRNAs maduros para seres humanos, além de outros pequenos RNAs não codificantes, cobrindo 100% do banco de dados miRBase v20. Foram utilizadas 200ng de RNA total inicial para marcação utilizando o kit FlashTag Biotin HSR (Affymetrix). Resumidamente, o processo incluiu uma reação para adição de uma cauda poli-A ao RNA total, seguido de marcação com biotina. Um ensaio de *Enzyme Linked Oligosorbent Assay* (ELOSA) foi realizado como controle de qualidade para confirmar a marcação.

Amostras de tecido tumoral (TT) e não neoplásico adjacente (TNN) dos 11 primeiros pacientes incluídos no estudo serviram para a realização das comparações e análise por *microarray*. Destes, seis pacientes apresentavam doença metastática e cinco localizada. As amostras foram hibridizadas no Genechip® por 16h utilizando o *Hybridization Oven* 645 e posteriormente lavadas e marcadas na Fluidics Station 450 e escaneados com Scanner 3000 7G (Affymetrix, EUA). O pré-processamento (normalização, correção de *background* e sumarização) e as análises estatísticas para detecção dos miRNAs diferencialmente expressos (DEmiRs) no grupo de TT versus TNN

adjacente e no grupo metastático versus localizado foram realizados no programa Transcriptome Analysis Console (TAC) da Affymetrix. Foi utilizado o algoritmo *Robust Multichip Average + Detection Above Background* (RMA + DABG), considerando somente os conjuntos de sondas (*probesets*) específicos para miRNAs maduros em espécie *Homo sapiens*. Os DEmiRs foram identificados usando o teste *Linear Models for Microarrays* (LIMMA), *fold change* (FC) >2,0 ou <-2,0, $p < 0,01$ e *false discovery rate* (FDR) <0,05 no TT versus TNN. Foi comparado também o padrão de expressão de miRNAs entre o grupo de seis tumores metastáticos (metástase linfonodal) em relação ao grupo de cinco pacientes com tumor localizado usando o teste LIMMA, FC >1,5 ou <-1,5 e $p < 0,05$. Os dados do *microarray* estão disponíveis na base de dados *Gene Expression Omnibus* (GEO) sob número de acesso (GSE172095).

3.5 Validação dos DEmiRs por qRT-PCR

Para a etapa de validação dos DEmiRs detectados pela técnica de *microarray* foi utilizada a técnica de transcrição reversa, seguida de qRT-PCR. Foram selecionados DEmiRs para validação da comparação do TT versus TNN e no grupo metastático versus localizado. Foram realizadas validações em amostra independente (13 pacientes) e na amostra completa (24 pacientes), incluindo as amostras de TNN adjacente. Na coorte total dos 24 pacientes, 12 são do grupo metastático e 12 são do localizado. Na coorte independente, seis tem doença metastática e sete localizada.

Os critérios utilizados para a seleção desses DEmiRs foram baseados em: nível de significância estatística (valor de p); valores de FC (magnitude da diferença); e relevância biológica, após ampla revisão da literatura de miRNAs previamente descritos como desregulados em CaPe e/ou outros tipos de CEC.

Para validação destes DEmiRs, inicialmente foi sintetizado o DNA complementar (cDNA), a partir de 10ng de RNA total previamente extraído, por transcrição reversa utilizando o TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, EUA) que consistiu na etapa das seguintes reações: *Poly (A) tailing*, *Adaptor ligation*, transcrição reversa e miR-Amp de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. O produto amplificado foi armazenado a -20°C até o uso.

O cDNA foi diluído somente no dia da reação de qPCR de 10 vezes com água livre de RNase.

Posteriormente, a expressão desses DEmiRs foi quantificada por meio de PCR em tempo real (qRT-PCR), utilizando-se a metodologia TaqMan®. As reações de amplificação foram realizadas utilizando-se 10µL de 2X TaqMan Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific, EUA), 1µL DE 20X TaqMan® Advanced miRNA específicos e 4µL de água ultrapura, em volume final de 15µL, no equipamento ABI StepOne Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, EUA), de acordo com recomendações do fabricante. Para ambos os casos, a quantificação relativa dos níveis de expressão foi realizada utilizando-se o método $-\Delta\Delta CT(139)$.

Para a escolha dos controles endógenos, foram avaliados todos os miRNAs que possuíam ensaios comercialmente disponíveis e foram selecionados dois miRNAs com menores variações de expressão e maiores valores de significância estatística nas análises de *microarray*: miR-103a-3p e miR-423-5p. Na tabela 2 é apresentado os ensaios TaqMan® Advanced miRNA (Thermo Fisher Scientific, EUA) utilizados para os controles endógenos e para os DEmiRs previamente selecionados.

Tabela 2 – Ensaios Taqman® Advanced miRNA Assays dos DEmiRs selecionados para validação por qRT-PCR.

Tipo	miRNA	TaqMan® Advanced miRNA Assays
DEmiRs selecionados para validação	miR-432-5p	478101_mir
	miR-487b-3p	477835_mir
	miR-30a-5p	479448_mir
	miR-149-5p	477917_mir
	miR-145-5p	477916_mir
	miR-200a-5p	478752_mir
	miR-224-5p	477986_mir
	miR-31-3p	478012_mir
	miR-31-5p	478015_mir
	miR-181c-5p	477934_mir
	miR-744-5p	478200_mir
	miR-196b-5p	478585_mir
	miR-152-3p	477921_mir
Controles Endógenos	miR-421	478088_mir
	miR-103a-3p	478253_mir
	miR-423-5p	478090_mir

DEmiR: miRNA diferencialmente expresso; qRT-PCR: *quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*.

Para a comparação dos valores de expressão dos DEmiRs selecionados entre TT versus TNN nas amostras independente (N=13) e total (N=24) foi utilizado teste t-Student, $p < 0,05$, FDR < 0,05, com 2000 permutações. Para a comparação da expressão dos DEmiRs entre tumores metastáticos versus tumores localizados nas amostras independentes (N=7 e N=6, respectivamente) e total (N=12 e N=12) foi utilizado o teste t-Student e $p < 0,05$. Ambos foram realizados considerando a variável -dCT, utilizando o programa TM4 MultiExperiment Viewer (MeV) 4.9 (<http://mev.tm4.org>)(140).

A quantificação relativa dos níveis de expressão foi realizada por meio do método de $-\Delta\Delta CT$ (139), utilizando a média dos valores de CT de dois genes normalizadores (miR-103a-3p e miR-423-5p) e os grupos “tecido não-neoplásico adjacente” ou “tumores localizados” como grupos referências, respectivamente, para o cálculo do FC dos grupos “TT” e “tumores metastáticos”. Os gráficos tipo *box-plots* foram construídos no programa SPSS 25.0.

O programa TM4 MultiExperiment Viewer (MeV) 4.9 (<http://mev.tm4.org>)(140) também foi utilizado para construir os agrupamentos

hierárquicos (*hierarchical clusters*) dos DEmiRs identificados em ambas as comparações: TT (N=24) versus TNN (N=24); e tumores metastáticos (N=12) versus localizados (N=12) na amostra total. Para a construção desses gráficos foram considerados somente os miRNAs com diferença estatística significativa nas comparações acima mencionadas.

3.6 Confirmação *in silico* da expressão de miRNA através do banco de dados *ArrayExpress*

O banco de dados ArrayExpress, um banco de dados repositório do Instituto de Bioinformática Europeu (EMBL-EBI), foi utilizado para obter os resultados do banco de dados E-MTAB-3087 (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-MTAB-3087/>). Este banco de dados inclui os níveis de expressão de miRNA do grupo de TT de pacientes com CaPe e seu respectivo grupo de TNN(133). Cada grupo está representado por um arquivo (formato fastq) com dados de 10 amostras. Ambos os arquivos da expressão gênica, TT e TNN, foram baixados e pré-processados como sugerido pelos autores. Os programas Cutadapt v.3.4 e miRge3.0 foram utilizados para processamento das amostras. Todos os valores são expressos em razão de \log_2 (contagem normalizada +1) entre o tumor e a contagem normal. Foram considerados valores de razão acima de 1,0 como superexpressos e valores abaixo de -1,0 como subexpressos. Não foi associado a expressão dos DEmiRs com nenhuma outra característica clínico-patológica por falta destes dados no estudo que forneceu as amostras.

3.7 Análise de enriquecimento de vias dos alvos preditos dos DEmiRs e identificação das redes de interações miRNA-mRNA

A ferramenta de internet Mienturnet(141) foi utilizada para acessar os dados da base miRTarBase 8.0 (liberada em 15/09/2019) e pesquisar por genes-alvo de oito DEmiRs detectados e validados em nosso estudo na comparação de amostras de TT em relação a TNN. O programa Gephi v.0.9.2 foi utilizado para construir gráficos de interação miRNA-mRNA. As redes foram construídas considerando as 100 maiores associações miRNA-mRNA com evidência de associação funcional fraca e forte e

FDR<0,05 para os DEmiRs subexpressos e FDR<0,1 para os superexpressos. A ferramenta Mienturnet permite construção de gráficos enriquecidos em que cada ponto representa um miRNA cujo alvo está incluído em uma via. Cada ponto foi colorido por valor ajustado de p e dimensionado pela razão de gene por via.

3.8 Perfil de expressão de mRNA pela plataforma de alto rendimento de qRT-PCR nanofluídica

Construímos um painel com 89 genes para serem estudados nas amostras totais de TT (N=24) e TNN (N=24). Além destes 89 genes, foram utilizados também sete genes para controles endógenos, cuja lista total encontra-se na tabela 3. Os genes deste painel foram escolhidos através de análise de bioinformática dos DEmiRs descritos na seção anterior, bem como foram incluídos genes previamente descritos como desregulados em CaPe e outros CECs, genes relacionados a carcinogênese, resposta ao dano de DNA, ciclo celular e processo de transição epitélio-mesênquima (EMT). Foram realizadas duas análises, do TT (N=24) versus TNN (N=24) e do grupo metastático (N=12) versus localizado (N=12). Os mRNAs dos genes escolhidos tiveram suas expressões gênicas quantificadas por meio de qRT-PCR utilizando a tecnologia de nanofluídica na plataforma Biomark HD®. Esta plataforma permite investigar a expressão de 96 genes em até 96 amostras simultaneamente.

Tabela 3 – Lista completa dos genes incluídos em nosso painel (89 genes de interesse e sete controles endógenos) para investigação dos níveis de expressão dos transcritos na amostra total de TT (N=24) e TNN (N=24), e tumores localizados (N=12) e tumores metastáticos (N=12) dos pacientes com CaPe. Em negrito, os genes que não apresentaram amplificação e foram excluídos da análise final.

Gene	Nome	Classificação
<i>ABCB1</i>	<i>ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1</i>	Gene de interesse
<i>ACTB</i>	<i>Actin Beta</i>	Controle endógeno
<i>AKT1</i>	<i>AKT Serine/Threonine Kinase 1</i>	Gene de interesse
<i>ALDH1A1</i>	<i>Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member A1</i>	Gene de interesse
<i>ATM</i>	<i>ATM Serine/Threonine Kinase</i>	Gene de interesse
<i>B2M</i>	<i>Beta-2-Microglobulin</i>	Controle endógeno
<i>BAX</i>	<i>BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator</i>	Gene de interesse
<i>BBC3</i>	<i>BCL2 Binding Component 3</i>	Gene de interesse
<i>BCL2</i>	<i>BCL2, Apoptosis Regulator</i>	Gene de interesse
<i>CCND1</i>	<i>Cyclin D1</i>	Gene de interesse
<i>CD274</i>	<i>CD274 Molecule</i>	Gene de interesse
<i>CD44</i>	<i>CD44 Molecule (Indian Blood Group)</i>	Gene de interesse
<i>CDH1</i>	<i>Cadherin 1</i>	Gene de interesse
<i>CDH2</i>	<i>Cadherin 2</i>	Gene de interesse
<i>CDKN1A</i>	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A</i>	Gene de interesse
<i>CDKN2A</i>	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A</i>	Gene de interesse

Tabela 3 – Lista completa dos genes incluídos em nosso painel (89 genes de interesse e sete controles endógenos) para investigação dos níveis de expressão dos transcritos na amostra total de TT (N=24) e TNN (N=24), e tumores localizados (N=12) e tumores metastáticos (N=12) dos pacientes com CaPe. Em negrito, os genes que não apresentaram amplificação e foram excluídos da análise final. (continuação)

Gene	Nome	Classificação
<i>CEBPB</i>	<i>CCAAT/Enhancer Binding Protein Beta</i>	Gene de interesse
<i>CXCR4</i>	<i>C-X-C Motif Chemokine Receptor 4</i>	Gene de interesse
<i>DKK1</i>	<i>Dickkopf WNT Signaling Pathway Inhibitor 1</i>	Gene de interesse
<i>DNMT1</i>	<i>DNA Methyltransferase 1</i>	Gene de interesse
<i>EGFR</i>	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>	Gene de interesse
<i>EGR1</i>	<i>Early Growth Response 1</i>	Gene de interesse
<i>ENTPD5</i>	<i>Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 5</i>	Gene de interesse
<i>ESRP1</i>	<i>Epithelial Splicing Regulatory Protein 1</i>	Gene de interesse
<i>FGF2</i>	<i>Fibroblast Growth Factor 2</i>	Gene de interesse
<i>FOS</i>	<i>FOS Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit</i>	Gene de interesse
<i>GADD45A</i>	<i>Growth Arrest and DNA Damage Inducible Alpha</i>	Gene de interesse
<i>GAPDH</i>	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>	Controle endógeno
<i>GUSB</i>	<i>Glucuronidase Beta</i>	Controle endógeno
<i>HIF1A</i>	<i>Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha Subunit</i>	Gene de interesse
<i>HOXA10</i>	<i>Homeobox A10</i>	Gene de interesse
<i>HOXA9</i>	<i>Homeobox A9</i>	Gene de interesse
<i>HPRT1</i>	<i>Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1</i>	Controle endógeno
<i>IGF1R</i>	<i>Insulin Like Growth Factor 1 Receptor</i>	Gene de interesse
<i>IL1A</i>	<i>Interleukin 1 Alpha</i>	Gene de interesse
<i>IL1B</i>	<i>Interleukin 1 Beta</i>	Gene de interesse
<i>IL6</i>	<i>Interleukin 6</i>	Gene de interesse
<i>JUN</i>	<i>JUN Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit</i>	Gene de interesse
<i>KAT6A</i>	<i>Lysine Acetyltransferase 6A</i>	Gene de interesse
<i>KLF4</i>	<i>Kruppel Like Factor 4</i>	Gene de interesse
<i>KMT2A</i>	<i>Lysine Methyltransferase 2A</i>	Gene de interesse
<i>KMT2D</i>	<i>Lysine Methyltransferase 2D</i>	Gene de interesse
<i>KRAS</i>	<i>KRAS Proto-Oncogene, GTPase</i>	Gene de interesse
<i>LATS2</i>	<i>Large Tumor Suppressor Kinase 2</i>	Gene de interesse
<i>LIN28A</i>	<i>LIN-28 Homolog A</i>	Gene de interesse
<i>MCM2</i>	<i>Minichromosome Maintenance Complex Component 2</i>	Gene de interesse
<i>MDM2</i>	<i>MDM2 Proto-Oncogene</i>	Gene de interesse
<i>MLH1</i>	<i>Mutl Homolog 1</i>	Gene de interesse
<i>MMP1</i>	<i>Matrix Metalloproteinase 1</i>	Gene de interesse
<i>MMP12</i>	<i>Matrix Metalloproteinase 12</i>	Gene de interesse
<i>MMP9</i>	<i>Matrix Metalloproteinase 9</i>	Gene de interesse
<i>MYC</i>	<i>MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor</i>	Gene de interesse
<i>MYD88</i>	<i>Myeloid Differentiation Primary Response 88</i>	Gene de interesse
<i>NANOG</i>	<i>Nanog Homeobox</i>	Gene de interesse
<i>NES</i>	<i>Nestin</i>	Gene de interesse
<i>NOTCH1</i>	<i>Notch 1</i>	Gene de interesse
<i>NOTCH4</i>	<i>Notch 4</i>	Gene de interesse
<i>NOX1</i>	<i>NADPH Oxidase 1</i>	Gene de interesse
<i>NRP1</i>	<i>Neuropilin 1</i>	Gene de interesse
<i>PDCD1</i>	<i>Programmed Cell Death 1</i>	Gene de interesse
<i>PEBP1</i>	<i>Phosphatidylethanolamine Binding Protein 1</i>	Gene de interesse
<i>PITX2</i>	<i>Paired Like Homeodomain 2</i>	Gene de interesse
<i>PMAIP1</i>	<i>Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1</i>	Gene de interesse
<i>PPARGC1A</i>	<i>PPARG Coactivator 1 Alpha</i>	Gene de interesse
<i>PTEN</i>	<i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>	Gene de interesse
<i>Rb1</i>	<i>RB Transcriptional Corepressor 1</i>	Gene de interesse

Tabela 3 – Lista completa dos genes incluídos em nosso painel (89 genes de interesse e sete controles endógenos) para investigação dos níveis de expressão dos transcritos na amostra total de TT (N=24) e TNN (N=24), e tumores localizados (N=12) e tumores metastáticos (N=12) dos pacientes com CaPe. Em negrito, os genes que não apresentaram amplificação e foram excluídos da análise final. (continuação)

Gene	Nome	Classificação
<i>RECK</i>	<i>Reversion Inducing Cysteine Rich Protein with Kazal Motifs</i>	Gene de interesse
<i>RHOA</i>	<i>RAS Homolog Family Member A</i>	Gene de interesse
<i>RIPK3</i>	<i>Receptor Interacting Serine/Threonine Kinase 3</i>	Gene de interesse
<i>RPLP0</i>	<i>Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0</i>	Controle endógeno
<i>SAV1</i>	<i>Salvador Family WW Domain Containing Protein 1</i>	Gene de interesse
<i>SESN2</i>	<i>Sestrin 2</i>	Gene de interesse
<i>SFN</i>	<i>Stratifin</i>	Gene de interesse
<i>SLC2A1</i>	<i>Solute Carrier Family 2 Member 1</i>	Gene de interesse
<i>SNAI1</i>	<i>Snail Family Transcriptional Repressor 1</i>	Gene de interesse
<i>SNAI2</i>	<i>Snail Family Transcriptional Repressor 2</i>	Gene de interesse
<i>SOX2</i>	<i>SRY-Box 2</i>	Gene de interesse
<i>SRC</i>	<i>SRC Proto-Oncogene, Non-Receptor Tyrosine Kinase</i>	Gene de interesse
<i>STAT3</i>	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>	Gene de interesse
<i>STK4</i>	<i>Serine/Threonine Kinase 4</i>	Gene de interesse
<i>TCF7L2</i>	<i>Transcription Factor 7 Like 2</i>	Gene de interesse
<i>TFRC</i>	<i>Transferrin Receptor</i>	Controle endógeno
<i>TGFB1</i>	<i>Transforming Growth Factor Beta 1</i>	Gene de interesse
<i>TIGAR</i>	<i>TP53 Induced Glycolysis Regulatory Phosphatase</i>	Gene de interesse
<i>TLR4</i>	<i>Toll Like Receptor 4</i>	Gene de interesse
<i>TNFRSF1A</i>	<i>TNF Receptor Superfamily Member 1A</i>	Gene de interesse
<i>TP53</i>	<i>Tumor Protein P53</i>	Gene de interesse
<i>TP53I3</i>	<i>Tumor Protein P53 Inducible Protein 3</i>	Gene de interesse
<i>TP63</i>	<i>Tumor Protein P63</i>	Gene de interesse
<i>TP73(var1)</i>	<i>Tumor Protein P73 Variant 1</i>	Gene de interesse
<i>TP73(var2)</i>	<i>Tumor Protein P73 Variant 2</i>	Gene de interesse
<i>TWIST1</i>	<i>Twist Family BHLH Transcription Factor 1</i>	Gene de interesse
<i>VEGFA</i>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i>	Gene de interesse
<i>WNT3a</i>	<i>Wnt Family Member 3A</i>	Gene de interesse
<i>WNT5a</i>	<i>Wnt Family Member 5A</i>	Gene de interesse
<i>ZEB1</i>	<i>Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1</i>	Gene de interesse

Um total de 45 ng de massa de RNA foi utilizado para a síntese de cDNA (Reverse Transcription Master Mix, Fluidigm®) seguido de 10 ciclos de reação de pré-amplificação (Preamp Master Mix, Fluidigm®), seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante. A reação de pré-amplificação foi realizada utilizando-se um *pool de Delta Gene™ assays* contendo 96 ensaios (concentração final de 500nM/cada). As reações foram realizadas nos seguintes parâmetros: 95°C, por 2 minutos, 10 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento e extensão de 60°C de 4 minutos e no final 4°C.

Foram analisados 96 Delta Gene™ assays compostos por 89 genes de interesse e 7 genes endógenos. Os Delta Gene™ assays foram desenhados utilizando o programa D3 Assay Design (Fluidigm®) e que continham *primers* (*Forward* e *Reverse*). O cDNA

pré-amplificado foi tratado com 8U de *Exonuclease I* (New England, BioLabs) para eliminar os *primers* não incorporados e o produto final foi diluído 10 vezes em tampão TE *Buffer* (10mM Tris, pH 8.0, 1mM EDTA – Thermo Fisher). Uma alíquota desta amostra diluída foi utilizada para a análise de expressão gênica por *Real Time* utilizando o corante EvaGreen®.

Foi preparado a solução contendo o cDNA pré-amplificado tratado com Exonuclease I, SsoFast™ EvaGreen® Supermix with Low ROX (Bio-Rad Laboratories) e 20x DNA Binding Dye Sample Loading Reagent (Fluidigm®), seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante. Cada um dos 96 Delta Gene™ *Assays* (concentração final de 5µM) e cada solução foram pipetados dentro do 96.96 Dynamic Array Integrated Fluidic Circuit (IFC) de acordo com o mapa de pipetagem recomendado pelo fabricante e em seguida foi colocado no equipamento Juno IFC controller (Fluidigm®) para a corrida do *Script load mix* (136x) para carregar as amostras e os ensaios no 96.96 Dynamic Array IFC. Após esta corrida, o qPCR foi realizado consistindo em múltiplas reações na câmara em alíquotas de pequenos volumes (nanolitros) utilizando o equipamento Fluidigm BioMark™ HD System Real-Time PCR (Fluidigm®) de acordo com protocolo estabelecido GE Fast 96x96 PCR+Melt v2.pcl *protocol* que consistiu em 70°C por 40min, 60°C por 30s, 95°C por 60s, 30 ciclos de 96°C por 5s, 60°C por 20s e curva de *melting* 95°C por 3s e 60-95°C (1°C/3s) (Fluidigm®). Os resultados da reação de qPCR foram extraídos do programa Biomark Data Collection versão 4.5.1 e foram analisados utilizando o programa Fluidigm Real-Time PCR Analysis versão 4.3.1 (Fluidigm®). Os valores limites foram traçados individualmente para cada gene e foi considerado o valor limite de detecção Ct acima de 24.

Para a comparação de valores de expressão dos transcritos (mRNA) dos genes diferencialmente expressos (DEGs) selecionados entre TT (N=24) versus TNN adjacente (N=24) na amostra expandida foi utilizado teste t-Student, $p < 0,05$, FDR < 0,05, com 2000 permutações. Para a comparação dos valores de expressão dos DEGs entre tumores metastáticos (N=12) versus tumores localizados (N=12) na amostra expandida, foi utilizado o teste t-Student e $p < 0,05$. Ambos foram realizados considerando a variável -dCT, utilizando o programa TM4 MultiExperiment Viewer (MeV) 4.9 (<http://mev.tm4.org>)(140).

Para a escolha do melhor gene endógeno, utilizamos o programa NormFinder, um *add-in* do Microsoft® Excel(142). Escolhemos o *ACTB* e o *RPLP0* como genes

endógenos, dentre os sete genes incluídos, para o cálculo de valores $-\Delta CT$ por apresentarem maior estabilidade de expressão entre os grupos (TT versus TNN e tumor metastático versus localizado). A quantificação relativa dos níveis de expressão foi realizada por meio do método de $-\Delta CT(139)$, utilizando a média dos valores de CT de dois genes normalizadores (*ACTB* e *RPLP0*) e os grupos TNN adjacente ou tumores localizados como grupos referências para o cálculo do FC dos grupos TT e tumores metastáticos, respectivamente.

3.9 Validação *in silico* da expressão gênica alterada em CaPe através do banco de dados GEO

O *Gene Expression Omnibus* (GEO) é uma base de dados pública do NCBI e foi utilizada para obter os dados pré-processados do banco de dados GSE57955 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE57955>). Estes dados são provenientes do estudo de análise de expressão gênica utilizando a plataforma de Whole Human Genome 4x44k microarray (Agilent Technologies, EUA) e incluiu amostras de 39 CaPe e cinco amostras de glândula extraídas de autópsia de pacientes brasileiros(143). Para obter os dados foram utilizados os pacotes *GEOquery*, *ggplot2* e *dplyr* do programa R Statistical v.4.0.2. Todos os dados foram expressos em razão de \log_2 (tumor/glândula normal). Valores com razão acima de 1,0 foram considerados como superexpressos e valores abaixo -1,0 como subexpressos. Essa avaliação *in silico* tem como objetivo validar os DEGs identificados por qRT-PCR na comparação TT e TNN da nossa casuística, confirmando-os com resultados externos.

3.10 Análise de enriquecimento de vias de genes alterados em CaPe

Os valores de FC foram utilizados para classificar os DEGs detectados na comparação de TT e TNN através da análise enriquecimento de vias de genes alterados (*Gene Set Enrichment Analysis* – GSEA) em CaPe(144). Foi utilizado o pacote *msigdb* do programa R Statistical v.4.0.2 para obter as informações da base de dados para vias e genes da base *Gene Ontology* (GO). O pacote *clusterProfiler* foi utilizado para realizar o enriquecimento de vias comparando a lista de genes com todas as vias com mais de 10

genes e menos de 500. Vias enriquecidas com $p < 0,05$ foram selecionadas para representar o mapa metabólico e os pontos de vias enriquecidas utilizando o pacote *enrichplot*. Não foram realizados enriquecimento de vias para resultados de comparações com menos de 10 genes conforme sugerido no guia do GSEA (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/doc/GSEAUserGuideFrame.html>), pelo risco valorização excessiva de poucas vias. Portanto, não realizamos esta comparação para os resultados de associação de expressão dos genes entre pacientes com doença metastática versus localizada.

3.11 Análise da expressão proteica

A escolha das proteínas para esta etapa foi feita por relevância biológica, suas relações com as variáveis clínicas em CaPe e relações com miRNA em CaPe encontrados previamente em nosso estudo, conforme descrito na tabela 4.

A análise da expressão das proteínas codificadas pelos DEGs foi realizada por IHQ no espécime cirúrgico contido nos blocos de parafina armazenadas no Laboratório de Patologia do ICESP. Os anticorpos utilizados estão apresentados na tabela 4. O processo incluiu a desparafinização dos cortes de 3μ de espessura por incubação com xilol a 60°C por 20 minutos seguido de outra incubação com xilol à temperatura ambiente por 20 minutos. A seguir, realizou-se a hidratação dos cortes em concentrações decrescentes de Etanol (95%, 80% e 70%) com 3 banhos de 30 segundos cada, seguido por lavagem em água corrente e destilada. A recuperação antigênica foi realizada mediante incubação das lâminas em solução de tampão citrato com pH 6,0 (PMB1-125, Spring Bioscience, EUA) ou solução tampão Tris-EDTA com pH 9,0 (PMB4-125, Spring Bioscience, EUA) em panela a vapor (após a fervura da água da panela com a cuba de solução de recuperação) por 35 minutos. Após 20 minutos à temperatura ambiente, realizou-se lavagens em água corrente e destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizada com água oxigenada (H_2O_2) a 6% diluída em metanol, em três banhos de 10 minutos cada e lavagens em água corrente e destilada. A seguir, lavamos com solução salina tamponada (PBS) 10 mM pH 7,4 por 5 minutos. O bloqueio de proteínas foi realizado com Cas BlockTM (Invitrogen by Life Technologies, EUA) por 10 minutos a 37°C . Finalmente, realizou-se incubação das lâminas com o anticorpo primário específico diluídos em solução de albumina bovina a 1,0% (BSA)(SIGMA, EUA) e azida

sódica (NaN₃) a 0,1% (Inlab, Brasilem) em câmara úmida por 30 minutos a 37o C e 18 horas (overnight) a 4oC. Na sequência, realizou-se incubação com o bloqueador pós-primário (Post Primary Block, NovoLink Max Polymer Detection System, Leica Biosystems, EUA), por 30 minutos a 37o C. ou no caso do anticorpo primário produzido em cabra, utilizou-se o reagente ImmPRESSTM HRP reagente kit (peroxidase – Vector, Burlingame, EUA). A revelação foi feita com solução de substrato cromogênico contendo diaminobenzidina a 0,1% (Sigma, EUA) peróxido de hidrogênio a 0,06%, dimetil sulfóxido (Labsynth, EUA) a 1% em PBS, em banho de 5 minutos, a 37oC. A contra-coloração foi feita com Hematoxilina de Harris por 1 minuto, seguida por lavagens em água corrente e água destilada. Para montagem em lamínula, foi feita imersão rápida em água amoniacal (sol. de hidróxido de amônia 0,5%) seguido de lavagens em água corrente e destilada, desidratação em banhos de concentrações crescentes de etanol (50%, 80%, 95%) e etanol absoluto (3 trocas de 1 minuto cada), diafanização em banhos de xilol (3 trocas de 1 minuto cada) e montagem em meio permanente (Entellan, Merck, Ale).

Os controles utilizados na reação imuno-histoquímica compreendem, um controle positivo sabidamente positivo para o anticorpo em estudo e um controle negativo com incubação em PBS e eliminação do anticorpo primário, sendo efetuados todos os demais procedimentos imuno-histoquímicos. Todas as lâminas foram revisadas por uropatologista com experiência (Profa. Dra. Kátia Ramos Leite) e os resultados de expressão proteica foram qualitativos e definidos como presença ou ausência de expressão, por não haver diferença quantitativa mensurável nos espécimes.

Tabela 4 – Anticorpos utilizados para marcação imuno-histoquímica das proteínas escolhidas na amostra total de tumores dos 24 pacientes e motivos de sua seleção.

Anticorpo	Clone	Fabricante	Teste	Crítérios para seleção
HOXA10	goat pAb	Abcam	ab191470	Associação com metástase linfonodal
SNAIL+SLUG	rabbit pAb	Abcam	ab85936	Associação com metástase linfonodal
RhoA	rabbit mAb	Abcam	ab187027	Subexpresso em TT x TNN e alvo dos miR-31-3p e 31-5p superexpressos validados
MMP1	rabbit mAb	Abcam	ab52631	Associação com variáveis prognósticas, maior FC na comparação entre TT x TNN e alvo do miR-145-5p subexpresso e validado
c-Myc	rabbit mAb	Abcam	ab32072	Associação com metástase linfonodal
IL-1a	rabbit pAb	Abcam	ab9614	Associação com invasão linfovascular, alto FC na comparação TT x TNN e alvo do miR-30a-5p subexpresso e validado
IGF1R	rabbit pAb	Abcam	ab39675	Associação com metástase linfonodal
PTEN	rabbit mAb	Cell Signaling	12 2017	Subexpresso em TT x TNN e alvo do miR-200a-5p superexpresso validado

3.12 Extração de DNA e detecção de DNA de HPV

A metodologia escolhida para a detecção do HPV, bem como para a genotipagem viral, foi a de hibridização reversa, utilizando-se o *kit* INNO-LiPA HPV Genotyping Extra (INNOGENETICS, Gent, Bélgica). Este método possibilita a identificação de 28 genótipos distintos de HPV. Brevemente, fragmentos de 65pb da região *L1* do HPV foram amplificados utilizando os iniciadores SPF10 biotinizados em uma reação de PCR(145, 146). Em seguida, 10µL do produto de PCR foi desnaturado pela adição de 10µL de solução de NaOH. Após 10 minutos, uma tira de Inno-LiPA foi recoberta com 2 mm de tampão de hibridização [3x SSC (1x SSC é composto de citrato de sódio, C₆H₅Na₃O₇, 15mM e de cloreto de sódio, NaCl, 150mM) e 0,1% de dodecil sulfato de sódio, NaC₁₂H₂₅SO₄, (pré-aquecido a 37°C)] e incubados a 50±0,5°C por 1 hora. Todas as incubações e etapas de lavagem foram realizadas de maneira automatizada em AutoBlot3000 (MedTec, Inc. Chapel Hill, EUA). As tiras foram lavadas duas vezes por 30 segundos e uma vez por 30 minutos a 50°C com 2 mL de solução de hibridização. Após esta lavagem estridente, as tiras foram incubadas com 2 mL de fosfatase alcalina conjugada à estreptavidina por 30 minutos em temperatura ambiente. As tiras foram lavadas duas vezes com 2 mL de solução de enxágue e uma vez com 2mL de tampão de substrato. Dois mililitros de substrato (5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato e nitroazul de

tetrazólio) foram adicionados e incubados por 30 minutos em temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela aspiração da solução de substrato e adição de 2mL de água destilada. Após a secagem, os resultados da tira foram interpretados pela comparação do padrão de hibridização com o diagrama modelo de padrões tipo específicos de HPV(146).

3.13 Análise Estatística

Com o intuito de avaliar a diferença entre os grupos de pacientes das amostras utilizadas para o microarray, validação independente e validação em amostra total, foram utilizados os testes de Chi-quadrado ou Exato de Fisher e o Mann-Whitney com valor para significância estatística de $p < 0,05$ no SPSS versão 25.0.

As correlações entre expressão de miRNAs e genes foram realizadas por correlação de teste de Pearson utilizando o SPSS 25.0 separadamente para TT e TNN e para amostras de tumores metastáticos e localizados. AS correlações entre TT e TNN foram traçadas com o programa R Statistical v.4.0.2 utilizando-se os pacotes *corrplot*, *ggplot2*, *ggrepel* e *ggpubr*. Todas as combinações de expressões miRNA-mRNA foram traçadas em gráfico de dispersão para selecionar os pares com correlação inversa entre os dois grupos avaliados, a qual foi determinada pelos pontos fora da curva da distribuição linear dos valores de R mais negativamente correlacionados (-1,-1) para os mais positivamente valores de R correlacionados (1,1) com intervalo de confiança igual a 99%. Para as correlações entre tumores metastáticos e localizados foi utilizado o pacote *Hmisc* e o *tidyr* para selecionar os pares mRNA-miRNA com valores de $p \leq 0,01$ em pelo menos um tipo de amostra (metastático ou localizado). A razão entre mRNA/miRNA dos pares selecionados utilizando-se o pacote *prroc* e calculando-se a AUC. Subsequentemente, os pacotes *corrplot* e *ggplot2* foram utilizados para construir o gráfico com os valores de correlação. Finalmente, o pacote *ggrepel* foi utilizado para identificar os pares mRNA-miRNA com AUC maiores que 0,8.

Os valores de expressão (-dCT) dos miRNAs e dos genes (mRNA) investigados no estudo foram comparados entre as seguintes variáveis clínicas, na amostra expandida (N=24):

- Grau de diferenciação agrupado (I+II versus III)
- pT (T1 versus T2 + T3)

- Invasão microvascular (Sim versus Não)
- Invasão perineural (Sim versus Não)
- Grupo de risco para metástase da EAU (baixo + médio versus alto)
- HPV (positivo versus negativo)
- Tamanho do tumor (≤ 5 versus > 5 cm)

Essas comparações foram realizadas por meio do teste t-Student, com nível de significância de 5%, no programa TM4 MultiExperiment Viewer (MeV) 4.9 (<http://mev.tm4.org>)(140). A quantificação relativa dos níveis de expressão foi realizada por meio do método de $\Delta\Delta Ct$ (139).

As curvas de *Receiver Operating Characteristic* (ROC) foram construídas para os miRNAs e mRNAs com objetivo de encontrar aqueles com melhor resultado para distinção entre TT e TNN, bem como para identificar pacientes com tumores metastático e todas as outras variáveis clínico patológicas avaliadas em nosso estudo. As curvas ROC foram construídas com o SPSS 25.0 e a área sob a curva (AUC) foi calculada para analisar a especificidade e sensibilidade de cada variável com relação ao desfecho.

Os pacientes foram acompanhados durante todo o período posterior ao diagnóstico, realizando consultas periódicas e exames complementares. Os dados de seguimento dos pacientes foram coletados até abril de 2021 e os tempos de sobrevida câncer-específica (SCE) e global (SG) foram calculados em meses, considerando-se a data de cirurgia até data de óbito (desfecho). Para o cálculo de sobrevida livre de recorrência (SLR), foi utilizado a data da recorrência clínica ou por imagem (desfecho). Pacientes com perda de seguimento ou que estavam vivos no último seguimento foram considerados como eventos censurados nas análises. Nestes casos, foi considerada a última data de retorno para o cálculo do tempo de sobrevida.

Curvas de Kaplan-Meier foram construídas para sobrevida livre de recorrência, câncer-específica e sobrevida global correlacionando os parâmetros clínico-patológicos, DEmiRs e DEGs. No caso destes dois últimos, categorizamos essas duas variáveis contínuas utilizando como corte o valor mediano dos valores numéricos de expressão (-dCT) de cada um dos DEmiRs e DEGs selecionados. Os grupos foram categorizados como “baixa expressão” quando apresentavam valores menores ou iguais ao valor mediano e como “alta expressão” quando apresentavam valores maiores ao valor mediano de expressão. As curvas de sobrevida foram comparadas por meio do teste log rank.

Em seguida, foram construídos modelos de regressão de Cox, calculando-se os valores de *Hazard Ratio* (HR) com intervalo de confiança (IC) de 95% para os níveis de expressão de cada um dos DEmiRs e DEGs estudados, estimando seus efeitos na sobrevida, com ajuste para as variáveis anatomopatológicas significativamente associadas à curva de sobrevida nas análises univariadas. As análises foram realizadas no programa SPSS 25.0 e o nível de significância estatística considerado foi de 5%.

Para verificar a associação entre expressão proteica (presença ou ausência) e as variáveis clinicopatológicas (estádio patológico, grau tumoral, invasão perineural, IMV, presença de HPV e tamanho do tumor), foi realizado teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher. Foram construídas curvas de sobrevida livre de recorrência, câncer-específica e global de acordo com o método de Kaplan-Meier e as diferenças estatísticas foram avaliadas por meio do teste de log-rank. Essas análises estatísticas foram realizadas no pacote estatístico SPSS 25.0 e o nível de significância estabelecido foi de 5%.

4 Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Resultados clínico-patológicos cirúrgicos

Entre julho de 2015 e janeiro de 2018 foram atendidos 41 casos novos de CaPe em nossa instituição e todos foram convidados a participar do projeto de pesquisa voluntariamente. Neste momento, dois recusaram-se a participar do projeto e um não aceitou realizar penectomia. Três pacientes evoluíram a óbito antes do procedimento cirúrgico e dois tinham doença avançada sem prognóstico de cura e foram excluídos. Um paciente foi excluído por já ter realizado penectomia parcial anteriormente, outro por apresentar infecção pelo vírus HIV e mais um pelo vírus HCV. Restaram 30 pacientes que tinham indicação de penectomia total ou parcial para tratamento de CEC peniano, todos assinaram o TCLE e foram incluídos em nosso estudo. Após a inclusão, dois pacientes foram submetidos a tratamento local em outra instituição por desejo próprio, dois pacientes não tinham material suficiente para coleta de amostra pelo biobanco e um teve a coleta perdida por falha de procedimento do protocolo. Finalmente, um paciente foi excluído por não ter retornado em acompanhamento. Portanto, até janeiro de 2018, incluímos efetivamente 24 pacientes e todos foram submetidos à penectomia. A tabela 5, a seguir, lista os motivos de não inclusão dos pacientes.

Tabela 5 – Motivos de não inclusão dos pacientes no protocolo de estudo.

Pacientes do Estudo	N
Total pacientes com CaPe no ICESP	41
Razões para exclusão dos pacientes	17
Não assinaram o TCLE	2
Não aceitou penectomia	1
Óbito antes da cirurgia	3
Doença incurável	2
Tratamento por CaPe prévio	1
Infecção por HIV, HCV	2
Penectomia em outro serviço	2
Material coletado insuficiente	3
Perda de seguimento	1
Total de Pacientes Incluídos	24

CaPe: câncer de pênis; ICESP: Instituto do Câncer do Estado de São Paulo; TCLE: termo de consentimento livre e esclarecido; HIV: *human of immunodeficiency virus*; HCV: *hepatitis C virus*

Os dados demográficos dos 24 pacientes incluídos no estudo estão representados na Tabela 6. A idade média dos pacientes ao diagnóstico foi de 61,8 anos (desvio padrão

$\pm 16,1$ anos - DP). Em relação aos fatores de risco para CEC de pênis, nove pacientes tinham antecedentes de DSTs e apenas três deles relatavam infecção por HPV. Tabagismo foi relatado por 13 pacientes (54,2%). Sete (29,2%) pacientes apresentavam história prévia de zoofilia e sete relatavam episódios prévios de balanopostite. Onze pacientes realizaram postectomia, sendo todas realizadas na fase adulta.

O nível de escolaridade dos pacientes encontrado foi baixo, com cinco (20,8%) pacientes analfabetos e 16 (66,7%) tendo estudado até o 1º grau. Apenas 3 (12,5%) dos 24 casos possuíam 2º grau completo. Com relação à naturalidade, um (4,2%) paciente vinha da região norte, 13 (54,1%) pacientes vinham da região nordeste, sete (29,1%) da região sudeste, dois (8,4%) da região sul e um (4,2%) era de nacionalidade portuguesa.

Tabela 6 – Dados clínico-demográficos dos pacientes participantes do estudo.

Idade média (DP)	61,8 anos ($\pm 16,1$)
Raça	
Negro	5 (20,8%)
Pardo	11 (45,8%)
Branco	8 (33,4%)
Escolaridade	
Analfabeto	5 (20,8%)
1º Grau	16 (66,7%)
2º Grau	3 (12,5%)
Tabagismo	13 (54,2%)
Idade média 1ª relação sexual	15,1 anos ($\pm 4,1$)
Nº médio de parceiras prévias (DP)	24,7 ($\pm 30,2$)
DSTs	9 (37,5%)
Balanopostites	7 (29,2%)
Postectomia	11 (45,8%)
Zoofilia	7 (29,2%)

DP: desvio padrão; DST: doença sexualmente transmissível

As cirurgias realizadas, estágio clínico e os dados do anatomopatológico dos 24 casos operados e seguidos até abril de 2021 estão descritos na Tabela 7. O seguimento mediano foi de 39,8 meses. A penectomia total foi realizada em sete (29,2%) casos e o restante submetido à penectomia parcial. Todos os pacientes tinham como subtipo histológico o carcinoma epidermóide usual. O estadiamento do tumor primário foi pT2 em 13 pacientes (54,2%) e sete pT3 (29,2%), demonstrando doença em estágio avançado

na maioria dos casos. A linfadenectomia inguinal foi indicada para 20 pacientes com linfonodo inguinal palpável (n=3), estágio patológico \geq pT2 (n=17) ou tumores de grau 3 (pouco ou indiferenciado; n=8). Um paciente evoluiu com doença inoperável entre a penectomia e a linfadenectomia inguinal e três recusaram-se a realizar o procedimento. Os três pacientes que recusaram a linfadenectomia inguinal tinham mais de 80 anos e doença T2G1 (n=1) e T2G2 (n=2); um faleceu de causa não relacionada à doença peniana, os outros dois permanecem vivos e sem evidência de recorrência com seguimento de 24 e 51 meses. A linfadenectomia inguinal foi realizada em 16 (66,7%) casos, dos quais 11 (68,7%) tinham metástase linfonodal. Dos pacientes pN+, dois (12,5%) eram pN1, dois (12,5%) pN2 e sete (43,7%) pN3. Um paciente apresentava estadiamento clínico cN3 e iniciou quimioterapia neoadjuvante. Entretanto, este paciente evoluiu rapidamente com doença à distância não recebendo tratamento local inguinal e veio a falecer de sua doença 12 meses após a penectomia.

O seguimento máximo dos pacientes foi de 62 meses e, durante este período, sete pacientes tiveram recorrência da doença tendo falecido por CaPe (29,2%) e três faleceram por outras causas, totalizando 10 óbitos no seguimento final (41,7%). As curvas de Kaplan-Meier de SLR, SCE e SG estão apresentadas na figura 2.

Tabela 7 – Dados cirúrgicos-patológicos dos pacientes participantes do estudo separados por amostras.

PACIENTES	AMOSTRA TOTAL N (%)	AMOSTRA MICROARRAY N (%)	AMOSTRA DE VALIDAÇÃO N (%)	p*
Número de Pacientes	24	11	13	
Idade na cirurgia - Média (DP) anos	61,8 (16,1)	61,6 (14,2)	61,9 (18,2)	0,931
Seguimento - Mediana (range) meses	39,8 (2 – 68)	47,5 (8 – 62)	34,9 (2 – 61)	
História de Tabagismo	14 (58,3)	8 (72,7)	6 (46,1)	0,123
cT				0,378
cT1	3 (12,5)	2 (18,2)	1 (7,7)	
cT2	13 (5,2)	4 (36,4)	9 (69,2)	
cT3	8 (33,3)	5 (45,4)	3 (23,1)	
cN				0,327
cN0	9 (37,5)	5 (45,4)	4 (30,8)	
cN1	8 (33,3)	3 (27,3)	5 (38,4)	
cN2	4 (16,7)	3 (27,3)	1 (7,7)	
cN3	3 (12,5)	0 (0)	3 (23,1)	
Penectomia				0,476
Parcial	17 (70,8)	7 (63,6)	10 (76,9)	
Total	7 (29,2)	4 (36,4)	3 (23,1)	
Grau				0,854
I	3 (12,5)	2 (18,2)	1 (7,7)	
II	13 (54,2)	6 (54,5)	7 (53,9)	
III	8 (33,3)	3 (27,3)	5 (38,4)	
Estádio T				0,246
pT1	4 (16,6)	3 (27,2)	1 (7,7)	
pT2	13 (54,2)	4 (36,4)	9 (69,2)	
pT3	7 (29,2)	4 (36,4)	3 (23,1)	
Linfadenectomia inguinal	16 (66,7)	7 (63,6)	9 (69,2)	0,476
Linfadenectomia Pélvica	4 (16,7)	2 (18,1)	2 (15,4)	1,0
Metástases linfonodais	12/16 (75,0)	5/7 (71,4)	6/9 (66,7)	0,682
Infecção por HPV	8 (33,3)	3 (27,3)	5 (38,4)	0,562
Tamanho tumor - Média (DP) cm	4,75 (2,27)	4,93 (2,50)	4,59 (2,15)	0,247
Invasão linfovascular	6 (25,0)	3 (27,3)	3 (23,1)	0,813
Invasão Perineural	10 (41,7)	4 (36,4)	6 (46,2)	0,628
Grupo de Risco (EAU)				0,381
Baixo	1 (4,2)	1 (9,1)	0 (0)	
Intermediário	3 (12,5)	2 (18,2)	1 (7,7)	
Alto	20 (83,3)	8 (72,7)	12 (92,3)	

CaPe: câncer de pênis; N: número de indivíduos; DP: desvio padrão; HPV: *human papillomavirus*; EAU: *European Association of Urology*; * Teste de Mann-Whitney.

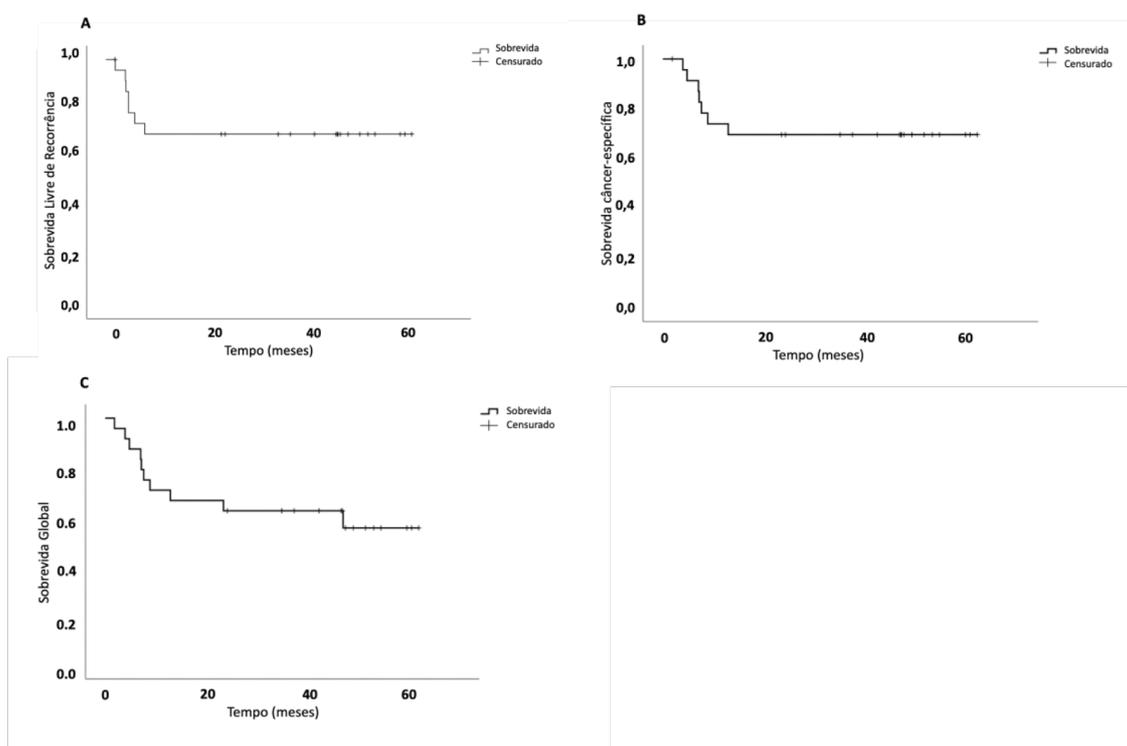


Figura 2 – Curvas de Kaplan-Meier de sobrevida livre de recorrência (A); sobrevida câncer-específica (B) e global (C).

As associações entre as características clínico-patológicas e as SLR, SCE e SG estão apresentadas na tabela 8. A presença de metástase linfonodal esteve associada a maior recidiva pela doença (p log-rank $<0,05$; figura 3), enquanto a invasão perineural e metástase linfonodal foram associadas a pior SCE (p log-rank $<0,05$; figuras 4A e B) e foram utilizadas para ajuste nos modelos multivariados que investigaram associações entre miRNA e genes com SLR e SCE. Por outro lado, nenhuma variável clínico-patológica foi associada com pior SG.

Tabela 8 – Associação entre sobrevida livre de recorrência, câncer específica e global através do teste de log-rank e o cálculo do HR com IC de 95% por regressão de Cox para as características clínicas e patológicas, considerando a amostra total de casos com CaPe (n=24).

Sobrevida	Variáveis Clínico-patológicas	p log-rank	HR (95% IC)	p**
Livre de Recorrência	Metx Linfonodos (sim vs não)	0,003*	84,79 (0,18-40021,9)	0,158
	Invasão Perineural (sim vs não)	0,052	4,41 (0,85-22,88)	0,077
	Invasão Microvascular (sim vs não)	0,362	1,97 (0,44-8,82)	0,375
	Estádio pT (T2+T3 vs T1)	0,181	28,55 (0,01-81914,7)	0,409
	Grau Histológico (III vs I+II)	0,205	2,53 (0,56-11,35)	0,225
	Infecção HPV (presença vs ausência)	0,310	0,35 (0,04-2,94)	0,336
	Tamanho do Tumor (> 5cm vs ≤ 5cm)	0,495	1,67 (0,37-7,48)	0,502
Câncer Específica	Metx Linfonodos (sim vs não)	0,003*	86,59 (0,18-41340,9)	0,156
	Invasão Perineural (sim vs não)	0,043*	4,71 (0,90-24,49)	0,066
	Invasão Microvascular (sim vs não)	0,240	2,40 (0,53-10,78)	0,255
	Estádio pT (T2+T3 vs T1)	0,183	28,64 (0,01-80176,9)	0,407
	Grau Histológico (III vs I+II)	0,161	2,81 (0,62-12,68)	0,179
	Infecção HPV (presença vs ausência)	0,276	0,33 (0,04-2,72)	0,301
	Tamanho do Tumor (> 5cm vs ≤ 5cm)	0,635	1,43 (0,32-6,41)	0,637
Global	Metx Linfonodos (sim vs não)	0,062	3,45 (0,87-13,69)	0,078
	Invasão Perineural (sim vs não)	0,326	1,85 (0,53-6,45)	0,333
	Invasão Microvascular (sim vs não)	0,554	1,51 (0,38-5,90)	0,557
	Estádio pT (T2+T3 vs T1)	0,409	2,33 (0,30-18,45)	0,422
	Grau Histológico (III vs I+II)	0,468	1,61 (0,44-5,83)	0,471
	Infecção HPV (presença vs ausência)	0,349	0,48 (0,10-2,28)	0,359
	Tamanho do Tumor (> 5cm vs ≤ 5cm)	0,737	1,24 (0,35-4,42)	0,737

HR: Hazard ratio; IC: intervalo de confiança; Metx: metástases; HPV: human papilomavirus; * $p < 0,05$ **

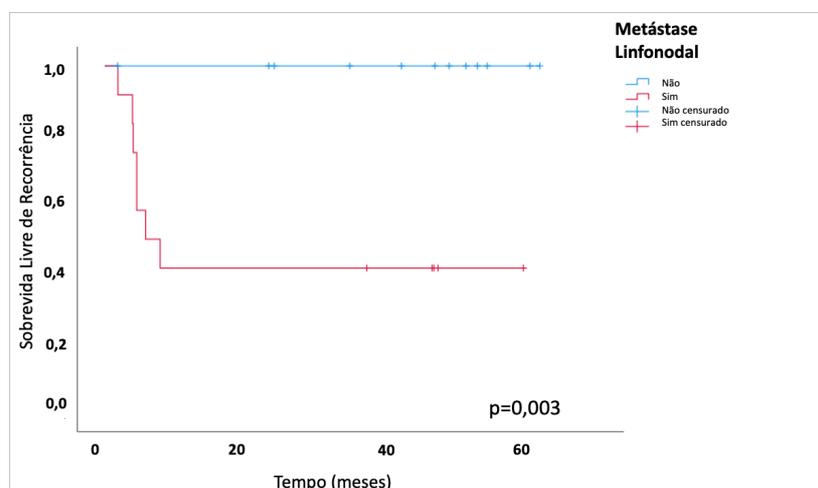


Figura 3 – Sobrevida livre de recorrência associada à metástase linfonodal. Curva de Kaplan-Meier mostra que a presença de metástase linfonodal tem pior sobrevida livre de recorrência.

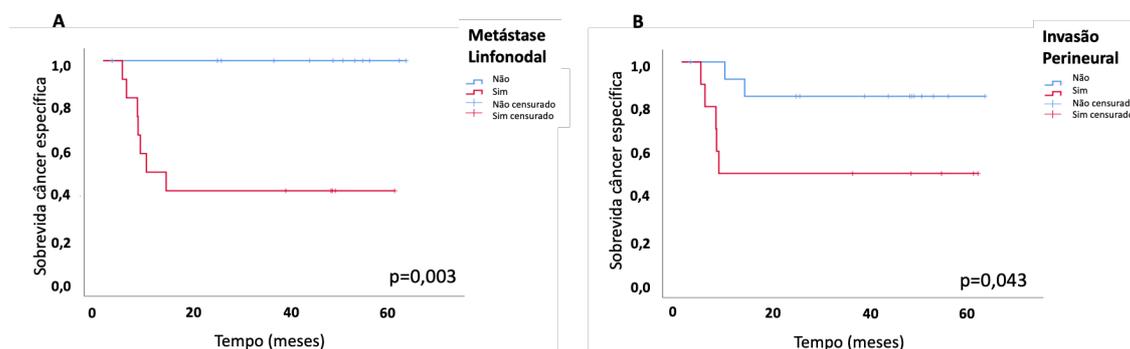


Figura 4 – Sobrevida câncer específica (SCE) associadas às variáveis clínicas. Curvas de Kaplan-Meier mostram que a presença de metástase linfonodal (A) e invasão perineural (B) tem pior SCE.

Houve quatro complicações relacionadas à penectomia, três pacientes apresentaram estenose de meato e deiscência de cicatriz em um. Desses pacientes, dois tiveram necessidade de meatoplastia para melhorar o padrão miccional, os outros dois foram tratados conservadoramente. Após a correção, estes pacientes voltaram a apresentar boa micção. Um paciente submetido à penectomia total, permanece com cistostomia definitiva por preferência pessoal e os demais com uretrostomia perineal.

Dos 16 pacientes submetidos à linfadenectomia, 15 (93,8%) apresentaram complicações (tabela 9). As mais frequentes foram linfocele, linfedema e necrose de pele. Três pacientes necessitaram de drenagem da linfocele e um de desbridamento de ferida operatória. Houve um óbito no 4º dia de pós-operatório por sepse de foco pulmonar num paciente de 82 anos. A linfadenectomia pélvica foi realizada por via laparoscópica em três pacientes e não houve complicações. Na tabela 9 encontram-se listadas as complicações da linfadenectomia inguinal e sua classificação dentro do sistema Clavien-Dindo(147). Três pacientes apresentaram sequelas com linfedema de membros inferiores, dois de forma leve sem limitação de suas atividades e um com limitação para o trabalho. Este paciente está fazendo fisioterapia e utilizando métodos conservadores para melhora clínica sem resultado clínico evidente, apesar do acompanhamento conjunto com a equipe de cirurgia vascular.

Tabela 9 – Complicações da linfadenectomia inguinal (N=16).

Complicação	N
Linfocele	8
Linfedema membros inferiores	5
Necrose de ferida operatória	4
Infecção de ferida operatória	2
Parestesia de membros inferiores	1
Tromboembolismo pulmonar	1
Sepse com óbito	1
Classificação de Clavien-Dindo	N
Grau I	8
Grau II	2
Grau IIIa	3
Grau IIIb	1
Grau V	1

N: número de indivíduos

Recuperamos as amostras dos 24 pacientes operados, as quais estavam armazenadas no Biobanco do ICESP, e realizamos análise histológica com HE do tecido para atestar que a amostra era representativa do tumor. Todas as amostras do tumor primário continham CEC em mais de 80% da amostra.

4.2 Análise de expressão de miRNAs por *microarray*

4.2.1 Tecido tumoral versus tecido não neoplásico adjacente

Realizamos a análise de varredura descrita anteriormente comparando a expressão diferencial dos miRNAs em 11 tumores versus 11 amostras de tecido não-neoplásico adjacente utilizando *microarray*. As características anatomopatológicas dos 11 pacientes seccionados estão descritas na tabela 7. Estes pacientes foram selecionados baseados na presença ou não de metástase linfonodal e/ou à distância, podendo ser clínica ou patológica.

Quando comparamos a expressão dos miRNAs no grupo de TT em relação ao TNN, foram identificados 69 DEmiRs, sendo 41 subexpressos e 28 superexpressos (tabela 10), com $FC > 2,0$ ou $FC < -2,0$, $p < 0,01$ e $FDR < 0,05$.

Tabela 10 – Lista dos 69 diferentemente expressos miRNAs (DEmiRs) identificados pelo microarray na comparação entre tecido tumoral (N=11) e tecido não tumoral adjacente (N=11).

Reg	DEmiR	FC	p	FDR	Reg	DEmiR	FC	p	FDR
	miR-432-5p	0,074	<0,0001	0,0048		miR-936	2,01	<0,0001	0,0048
	miR-487b-3p	0,117	0,0001	0,0079		miR-1184	2,15	<0,0001	0,0056
	miR-139-5p*	0,136	<0,0001	0,0048		miR-4721	2,16	0,0010	0,0458
	miR-497-5p	0,137	<0,0001	0,0067		miR-8073	2,18	0,0010	0,0451
	miR-509-3p*	0,144	0,0003	0,0214		miR-4322	2,23	0,0005	0,0298
	miR-30a-3p	0,147	0,0005	0,0289		miR-6813-5p	2,26	0,0003	0,0207
	miR-127-3p	0,155	<0,0001	0,0048		miR-4443	2,48	0,0010	0,0451
	miR-139-3p*	0,157	<0,0001	0,0048		miR-18a-5p*	2,61	0,0006	0,0322
	miR-382-5p	0,179	0,0006	0,0327		miR-6768-5p	2,67	0,0012	0,0492
	miR-145-5p*	0,184	0,0001	0,0088		miR-4640-5p	2,82	0,0012	0,0490
	miR-379-5p	0,186	<0,0001	0,0067		miR-4539	2,90	0,0001	0,0107
	miR-125b-2-3p	0,187	0,0001	0,0096		miR-200a-5p	2,93	<0,0001	0,0048
	miR-196a-5p	0,196	0,0005	0,0308	Superepresso	miR-21-3p	2,97	0,0001	0,0075
	miR-195-5p	0,203	<0,0001	0,0064		miR-3687	2,98	<0,0001	0,0058
	miR-433-3p	0,203	0,0001	0,0079		miR-7162-3p	3,22	0,0001	0,0118
	miR-134-5p*	0,204	0,0001	0,0095		miR-25-5p	3,30	<0,0001	0,0075
	miR-143-3p	0,204	0,0001	0,0107		miR-1910-5p	3,36	0,0001	0,0088
	miR-125b-5p	0,206	<0,0001	0,0067		miR-8064	3,68	0,0007	0,0368
Subexpresso	miR-30a-5p*	0,213	<0,0001	0,0067		miR-4793-3p	4,01	0,0011	0,0490
	miR-409-3p	0,215	0,0002	0,0141		miR-183-5p*	4,04	0,0012	0,0492
	miR-99a-5p	0,224	0,0002	0,0141		miR-5195-3p	4,73	0,0001	0,0124
	miR-100-5p	0,224	0,0002	0,0162		miR-365b-5p	4,77	0,0011	0,0467
	miR-485-5p	0,232	<0,0001	0,0067		miR-4485	5,75	<0,0001	0,0033
	miR-214-3p	0,259	<0,0001	0,0057		miR-224-5p*	6,56	0,0001	0,0083
	miR-149-5p	0,289	0,0006	0,0308		miR-187-3p*	8,19	<0,0001	0,0048
	miR-10b-5p	0,304	0,0007	0,0368		miR-4417	10,66	0,0001	0,0083
	miR-140-3p	0,314	<0,0001	0,0048		miR-31-3p	12,37	<0,0001	0,0002
	miR-494-3p	0,339	0,0004	0,0247		miR-31-5p*	38,24	<0,0001	0,0048
	miR-199a-5p*	0,339	0,0002	0,0162					
	miR-199a-3p*	0,342	0,0003	0,0221					
	miR-199b-3p	0,342	0,0003	0,0221					
	miR-574-3p*	0,363	<0,0001	0,0048					
	miR-126-3p	0,418	0,0002	0,0125					
	let-7e-5p	0,420	0,0001	0,0111					
	miR-378a-3p	0,429	0,0001	0,0090					
	miR-26a-5p	0,432	0,0001	0,0111					
	miR-378c	0,438	0,0013	0,0492					
	let-7c-5p*	0,451	0,0008	0,0405					
	miR-500a-3p	0,457	<0,0001	0,0056					
	miR-361-5p	0,483	0,0010	0,0451					
	miR-34a-5p*	0,493	0,0004	0,0238					

*: miRNAs previamente descritos em CaPe; Reg: regulação; DEmiR: miRNA diferencialmente expresso; FC: *fold change*; FDR: *false discovery rate*.

Desses 69 DEmiRs identificados, 47 têm interações validadas com mRNA alvos e 17 apresentavam FC>5. Dezesesseis DEmiRs já haviam sido previamente descritos em outros trabalhos que avaliaram expressão de miRNAs associados à tumorigênese em

CaPe (indicados com * na Tabela 10). Também é interessante observar que foram identificados mais miRNAs subexpressos do que superexpressos.

Selecionamos os DEmiRs da comparação TT versus TNN para validação em amostra independente e expandida por qRT-PCR, baseando-se na relevância biológica, valor de FC e significância estatística. Investigamos cada um desses 69 miRNAs, procurando por descrição sobre seu papel funcional previamente descrito em CaPe e/ou outros tipos de CEC. Obtivemos uma lista final de nove DEmiRs que possuem a capacidade de separar os grupos de acordo com a presença ou não de tumor na análise de agrupamento hierárquico (Figura 5).

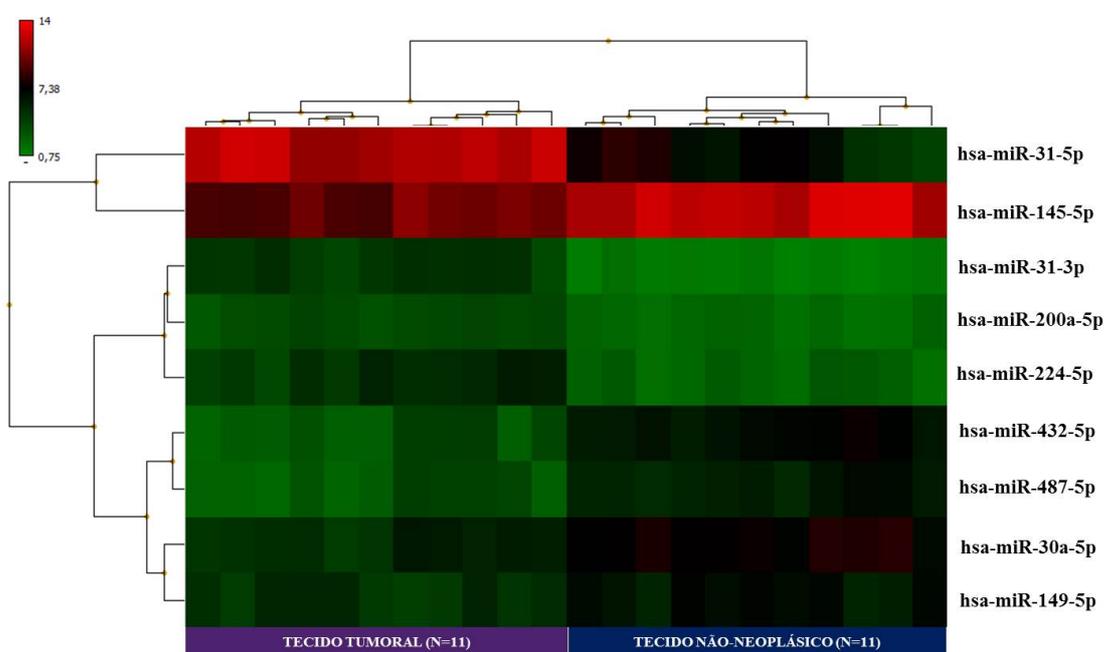


Figura 5 – Agrupamento hierárquico mostrando que os nove DEmiRs são capazes de separar os grupos de acordo com a presença ou não de tumor. N: número de pacientes; programa *Transcriptome Analysis Console*, Affymetrix.

Os DEmiRs mais superexpressos foram miR-31-5p e miR-31-3p (FC= 38,24 e 12,37, respectivamente). Eles são originados de um mesmo precursor (miR-31). Os DEmiRs mais subexpressos foram miR-432-5p e miR-487b-3p (FC= 0,074 e 0,117, respectivamente) e todos foram selecionados para etapas de validação em amostra independente e expandida.

4.2.2 Pacientes com doença metastática versus localizada

Realizamos a análise de varredura comparando a expressão diferencial dos miRNAs em 6 tumores metastáticos versus 5 de não metastáticos em *microarray* contendo 4603 sondas para miRNAs maduros e pre-miRNAs. As características anatomopatológicas dos 11 pacientes seccionados estão descritas na tabela 7.

Inicialmente, utilizamos três diferentes cortes para diferença de expressão com $FC > 1,2$, $FC > 1,5$ e $FC > 2,0$ e nível de significância de 5% para detectar os DEmiRs. Foram encontrados, respectivamente, 78, 21 e 6 DEmiRs quando comparamos tumores localizados versus metastáticos. Para a análise subsequente, selecionamos a lista de DEmiRs com $FC > 1,5$ ou $< -1,5$, que resultou em 21 DEmiRs, sendo 16 superexpressos e 5 subexpressos (Tabela 11). Podemos observar que o miR-149-5p foi o mais superexpresso ($FC=6,3$), enquanto o miR-7641 foi o mais subexpresso ($FC=0,38$) quando comparados os grupos metastático versus localizado, com $p < 0,05$ (Tabela 11).

Tabela 11 – Lista dos 21 DEmiRs da comparação entre os grupos metastático versus localizado.

DEmiR	Regulação	FC	p
miR-7641		0,38	0,027
miR-4443		0,50	0,046
miR-1293	Subexpressão	0,50	0,048
miR-181c-5p		0,63	0,031
miR-5100		0,63	0,001
miR-1296-5p		1,59	0,007
miR-877-5p		1,60	0,036
miR-4446-3p		1,62	0,011
miR-1307-3p		1,63	0,001
miR-744-5p		1,65	0,001
miR-196b-5p		1,66	0,025
miR-4428		1,70	0,026
miR-1910-5p	Superexpressão	1,70	0,034
miR-2110		1,72	0,041
miR-6769a-5p		1,73	0,002
miR-7152-3p		1,77	0,031
miR-6750-5p		1,91	0,004
miR-200a-5p		2,10	0,047
miR-152-3p		2,60	0,033
miR-421		2,89	0,001
miR-149-5p		6,30	0,002

DEmiR: miRNA diferentemente expresso; FC: *Fold change* da expressão dos miRNAs no grupo de tumores metastáticos em relação aos tumores não-metastáticos; teste LIMMA; FC>1,5 e FC<-1,5; p<0,05; programa *Transcriptome Analysis Console*, Affymetrix.

A partir desta lista inicial de 21 DEmiRs foram selecionados sete DEmiRs (miR-421, miR-149-5p, miR-744-5p, miR-200a-5p, miR-152-3p, miR-196b-5p e miR-181c-5p) para etapa posterior de validação em amostra expandida por qRT-PCR. A seleção destes DEmiRs foi baseada em relevância biológica, valor de FC e papel funcional previamente descrito em CaPe. A análise de agrupamento hierárquico (*Hierarchical clustering*) mostrou que esse conjunto de sete DEmiRs selecionados para validação foi capaz de agrupar os pacientes de acordo com o prognóstico (figura 6).

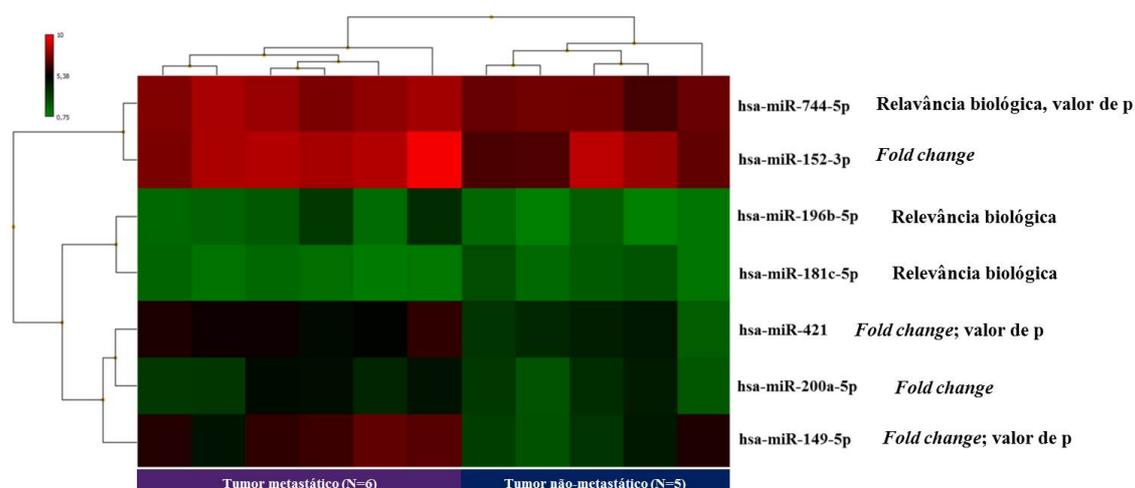


Figura 6 – Agrupamento hierárquico demonstrando que os sete DEmiRs escolhidos para validação foram capazes de separar os pacientes de acordo com os grupos de prognóstico. N: número de pacientes. Ao lado dos nomes dos miRNAs está descrito o critério de escolha utilizado para a seleção de cada um deles; programa *Transcriptome Analysis Console, Affymetrix*.

4.3 Resultados da validação em amostra independente e expandida da expressão de miRNAs

4.3.1 Validação dos miRNAs do tecido tumoral versus tecido não neoplásico

Para a validação na amostra independente (N=13) e expandida (N=24) dos DEmiRs entre os TT versus TNN foram selecionados nove (tabela 12). Os critérios foram quatro DEmiRs selecionados pelos maiores FC, dois mais sub e dois mais superexpressos (miR-432-5p, miR-487b-3p, miR31-3p e miR-31-5p); dois descritos previamente em CaPe (miR-145-5p e miR-224-5p); um descrito em outros CEC (miR-30a-5p); e dois que estavam na lista dos DEmiRs entre os grupos não metastáticos versus metastáticos (miR-149-5p e miR-200a-5p).

Tabela 12 – Dados do *microarray* dos nove DEmiRs escolhidos para validação em amostras independente e expandida entre os grupos de tecido tumoral e não neoplásico.

miRNA	Fold Change	p	FDR	Observação
miR-432-5p	0,07	<0,0001	0,0048	Mais subexpresso
miR-487b-3p	0,12	<0,0001	0,0079	Mais subexpresso
miR-30a-5p	0,21	<0,0001	0,0067	Descrito em CEC
miR-149-5p	0,29	0,0006	0,0308	Descrito no não metastático x meta
miR-145-5p	0,18	<0,0001	0,0088	Descrito em CaPe
miR-200a-5p	2,93	<0,0001	0,0048	Descrito no não metastático x meta
miR-224-5p	6,56	<0,0001	0,0083	Descrito em CaPe
miR-31-3p	12,37	<0,0001	0,0002	Mais superexpresso
miR-31-5p	38,24	<0,0001	0,0048	Mais superexpresso, descrito em CaPe

DEmiR: miRNA diferencialmente expresso; FDR: *false discovery rate*; CEC: carcinoma espinocelular; CaPe: câncer de pênis

Na validação em amostra independente (N=13), apenas o miR-149-5p não foi confirmado por qRT-PCR (Tabela 13 e Figura 7). Já na validação em amostra expandida, todos os DEmiRs apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos de TT versus TNN (Tabela 13).

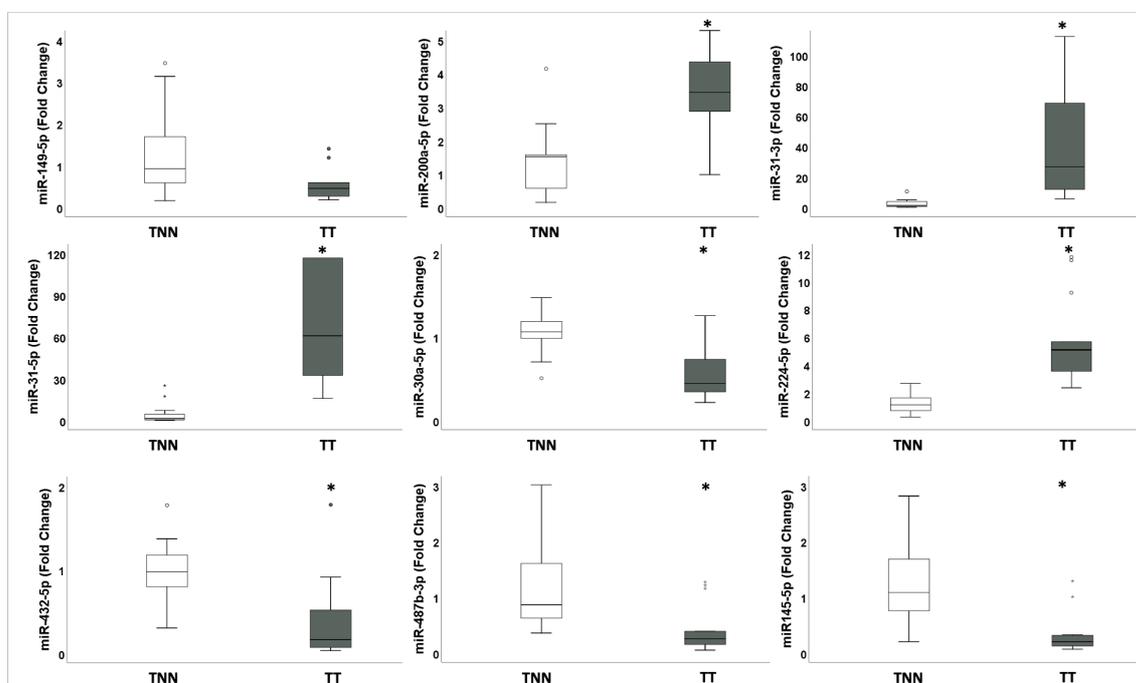


Figura 7 – Gráficos *box-plot* da expressão dos nove miRNAs diferencialmente expressos (DEmiRs) identificados na comparação entre os TT e TNN por *microarray* (N=11) e escolhidos para validação na amostra independente (N=13); somente o miR-149-5p não foi validado. *p<0,05.

Quando comparado os resultados encontrados entre o *microarray* e o qRT-PCR nas amostras independente e expandida verifica-se que os DEmiRs apresentam características de expressão e FC semelhantes entre as duas técnicas (tabela 13).

Tabela 13 – Comparação da expressão dos 9 DEmiRs identificados pela técnica de *microarray* na comparação entre TT e TNN adjacentes na análise por *microarray* (N=11), validação com amostra independente (N=13) e na amostra total (N=24) por técnica de qRT-PCR.

Regulação	DEmiR	Microarray		qRT-PCR Amostra Independente			qRT-PCR Amostra Total		
		FC	FDR	FC	DP	FDR	FC	DP	FDR
Subexpresso	miR-432-5p	0,07	0,005*	0,41	0,51	0,004*	0,33	0,44	<0,001*
	miR-487b-3p	0,12	0,008*	0,44	0,45	0,004*	0,34	0,35	<0,001*
	miR-145-5p	0,18	0,009*	0,33	0,37	0,005*	0,29	0,29	<0,001*
	miR-30a-5p	0,21	0,007*	0,57	0,32	0,002*	0,49	0,24	<0,001*
	miR-149-5p	0,29	0,031*	0,79	1,04	0,097	0,67	0,71	0,002*
Superexpresso	miR-200a-5p	2,93	0,005*	3,48	1,28	0,004*	3,38	1,29	<0,001*
	miR-224-5p	6,59	0,008*	5,70	3,19	0,001*	5,83	3,15	<0,001*
	miR-31-3p	12,38	<0,001*	41,62	41,43	0,004*	59,70	41,4	<0,001*
	miR-31-5p	38,32	0,005*	122,28	127,75	0,001*	116,88	90,5	<0,001*

DEmiR: miRNA diferencialmente expresso; N: número de indivíduos; FC: *fold change*; DP: desvio padrão; FDR: *false discovery rate*; qRT-PCR: *quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*; * p<0.05.

Realizamos ainda a validação externa dos oito DEmiRs validados em amostra independente utilizando o banco de dados E-MTAB-3087(133). Um DEmiR (miR-31-5p) superexpresso e todos os quatro superexpressos detectados em nosso estudo (miR-30a-5p, miR-432-5p, miR-487b-3p e miR-145-5p) foram validados *in silico* utilizando este banco de dados (Tabela 14).

Tabela 14 – Análise da expressão de miRNA representada pela razão \log_2 (contagem normalizada +1) entre amostras de CaPe e seus tecidos não neoplásicos da base de dados E-MTAB-3087.

Regulação em nosso estudo	miRNA	Banco de Dados E-MTAB-3087 $\log_2(\text{normalized counts}+1)$
Subexpresso	miR-30a-5p*	-8,165
	miR-432-5p*	-7,947
	miR-487b-3p*	-6,236
	miR-145-5p*	-3,425
Superexpresso	miR-200a-5p	-0,551
	miR-224-5p	-5,815
	miR-31-3p	-3,342
	miR-31-5p*	2,914

CaPe: câncer de pênis; * miRNAs diferencialmente expressos validados por qRT-PCR em nosso estudo e validados no banco de dados E-MTAB-3087.

Para avaliar a acurácia na distinção entre TT e TNN, foram calculadas as curvas ROC dos oito DEmiRs validados em nosso estudo. Encontramos que todos os quatro subexpressos apresentavam $AUC > 0,89$ (Figura 8), embora nenhum dos superexpressos tenha atingido resultados similares.

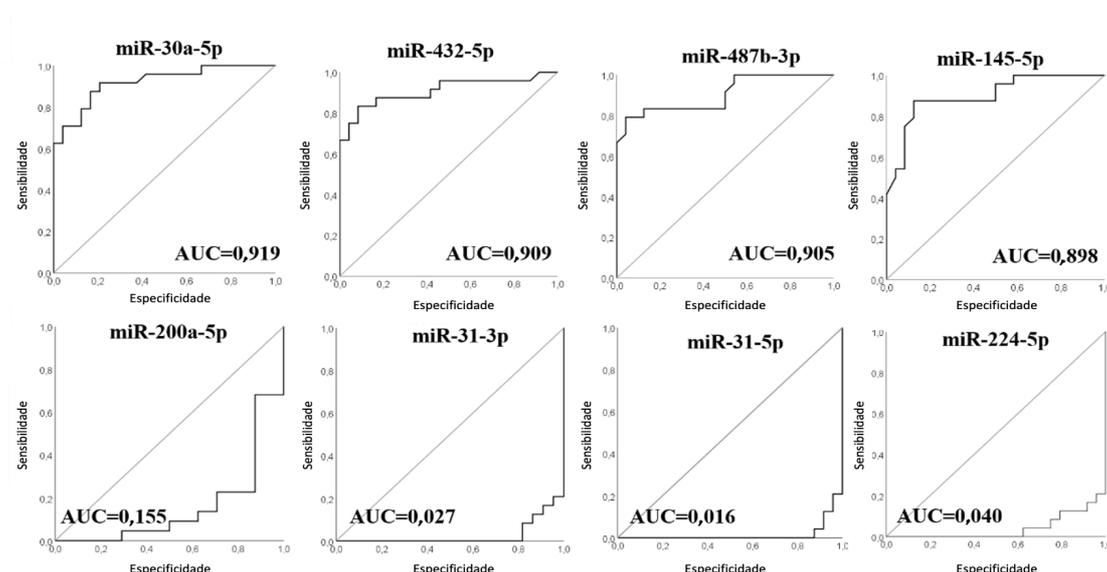


Figura 8 – Curvas ROC dos 8 miRNAs diferencialmente expressos (DEmiRs) validados por qRT-PCR. Todos DEmiRs subexpressos (miR-30a-5p, miR-432-5p, miR-487b-3p e miR-145-5p) demonstraram boa acurácia para diferenciar TT de TNN em pacientes com CaPe. ROC: *receiver operating characteristic*; AUC: *area under the curve*.

De acordo com o programa miRTarBase 8.0, identificamos 38 e 39 genes validados experimentalmente com alto nível de evidência para os DEmiRs sub e superexpressos, respectivamente. A interação destes oito DEmiRs e seus alvos estão representados pelos pontos em rede nas figuras 9A e B. A base de dados Reactome revelou que os genes alvo dos DEmiRs subexpressos estão agrupados e vias relacionados a senescência e resposta celular ao stress (Figura 9C). Com relação aos superexpressos, seus alvos mostram participação na família de sinalização MAPK e vias de resposta a doenças infecciosas (Figura 9D). Os resultados são mostrados como pontos representando as principais vias enriquecidas pelos alvos de cada miRNA. Os pontos são coloridos pelo valor de p ajustado e dimensionado pela razão de genes por via. A tabela 15 descreve a lista das 10 principais vias enriquecidas com o número de genes alvo validados dos DEmiRs com $FDR < 0,01$.

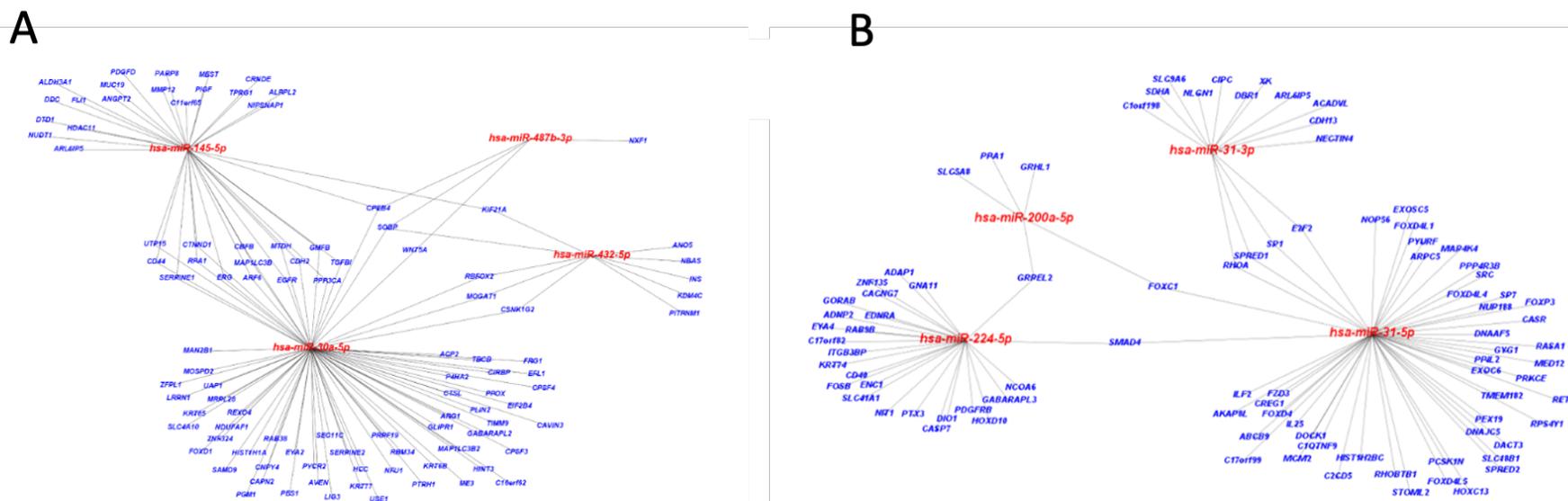


Figura 9 – Alvos validados experimentalmente dos miRNAs diferencialmente expressos (DEmiRs) da comparação entre TT versus TNN. (A e B) Dados do miRTarBase 8.0 das redes de miRNA e seus genes alvos validados experimentalmente com níveis de evidência fraca e forte para os DEmiRs subexpressos (A) e superexpressos (B); (C e D) Gráfico de enriquecimento de vias para os alvos validados experimentalmente dos miRNAs com níveis de evidência fraca e forte para os DEmiRs subexpressos (C) e superexpressos (D) pela ferramenta Mienturnet. Os pontos são coloridos pelo valor de p ajustado e dimensionados pela razão de gene por via.

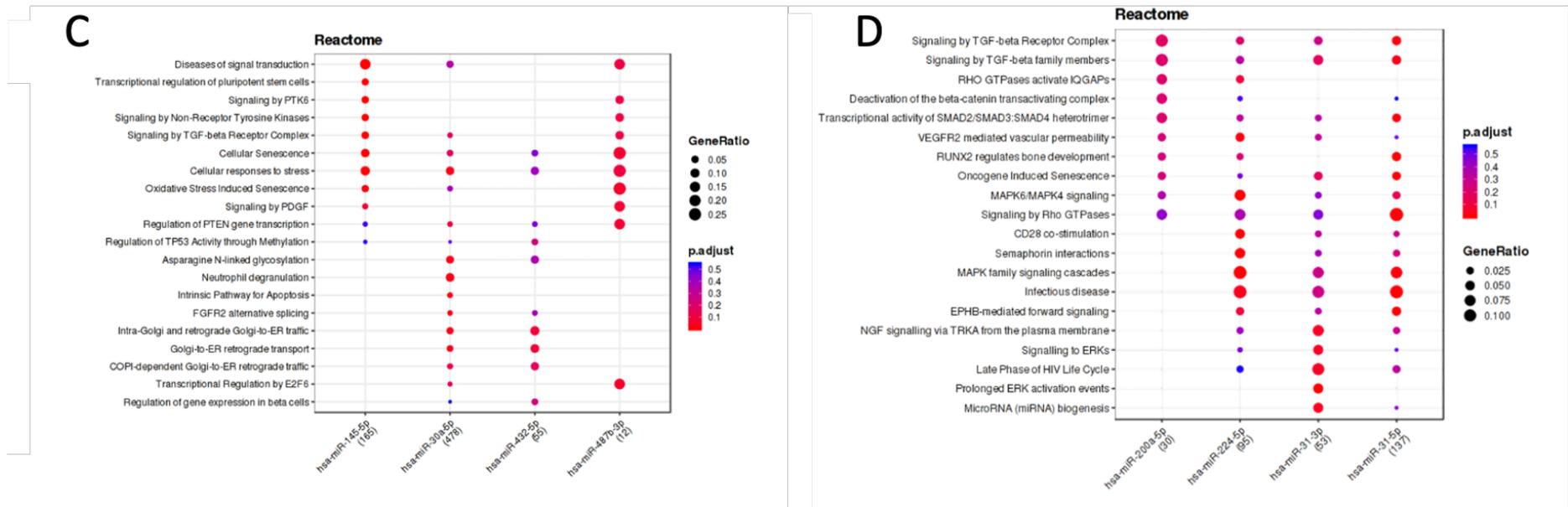


Figura 9 – Alvos validados experimentalmente dos miRNAs diferencialmente expressos (DEmiRs) da comparação entre TT versus TNN. (A e B) Dados do miRTarBase 8.0 das redes de miRNA e seus genes alvos validados experimentalmente com níveis de evidência fraca e forte para os DEmiRs subexpressos (A) e superexpressos (B); (C e D) Gráfico de enriquecimento de vias para os alvos validados experimentalmente dos miRNAs com níveis de evidência fraca e forte para os DEmiRs subexpressos (C) e superexpressos (D) pela ferramenta Mienturnet. Os pontos são coloridos pelo valor de p ajustado e dimensionados pela razão de gene por via. (continuação)

Tabela 15 – Dez principais vias enriquecidas com os genes alvos validados (validação funcional fraca e forte) dos DEmiRs detectados na comparação de tecido tumoral (N=24) e não neoplástico (N=24) de acordo com o miRTarBase 8.0.

Regulação	miRNA	REACTOME ID	Descrição	p	FDR	Genes	Contagem
miRNAs Subexpressos	miR-145-5p	R-HSA-5663202	Doenças do Sinal de Tradução	2,58E-11	1,45E-08	<i>CDKN1A, STAT1, IRS1, EGFR, MYC, IRS2, JAG1, NRAS, MDM2, ADAM17, HDAC2, KREMEN1, APH1A, BRAF, ACTB, SMAD3, TGFB2, SMAD4, MAP3K11, ERBB4, ZFYVE9, CD28, HDAC11, FZD6, AGTRAP, HBEGF, SMAD2</i>	27
	miR-145-5p	R-HSA-2262752	Reposta Celular ao Stress	1,34E-04	3,95E-03	<i>CDKN1A, IFNB1, CDK4, VEGFA, MDM2, MAP2K6, EPAS1, ETS1, MAP2K4, SP1, CDK6, HMGA2, E2F3, RPS6KA3, NUP43, RPA1, HIF1A, HIST1H2BF</i>	18
	miR-145-5p	R-HSA-2559583	Senescência Celular	1,16E-05	5,93E-04	<i>CDKN1A, IFNB1, CDK4, MDM2, MAP2K6, ETS1, MAP2K4, SPI, CDK6, HMGA2, E2F3, RPS6KA3, HIST1H2BF</i>	13
	miR-145-5p	R-HSA-9006936	Família de Sinalização por TGF- β	4,25E-06	3,89E-04	<i>MYC, SERPINE1, F11R, SMAD3, SMAD5, TGFB2, SMAD4, SPI, ZFYVE9, SMAD2</i>	10
	miR-145-5p	R-HSA-6785807	Sinalização de IL-4 e 13	7,12E-06	5,00E-04	<i>SOX2, MUC1, CDKN1A, STAT1, FSCN1, MYC, VEGFA, MMP1, NANOG, HIF1A</i>	10
	miR-145-5p	R-HSA-8878166	Regulação transcricional por RUNX2	1,95E-05	9,14E-04	<i>CDKN1A, STAT1, YES1, CFBF, PPM1D, CDK4, ESRI, SOX9, SMAD4, SP7</i>	10
	miR-145-5p	R-HSA-170834	Complexo sinalizador do Receptor de TGF- β	1,91E-06	2,14E-04	<i>MYC, SERPINE1, F11R, SMAD3, TGFB2, SMAD4, SPI, ZFYVE9, SMAD2</i>	9
	miR-145-5p	R-HSA-8848021	Sinalização por PTK6	1,75E-06	2,14E-04	<i>EGFR, CDK4, NRAS, EPAS1, ERBB4, HBEGF, HIF1A, PXN</i>	8
	miR-145-5p	R-HSA-9006927	Sinalização por não-receptores de Tirosino Kinases	1,75E-06	2,14E-04	<i>EGFR, CDK4, NRAS, EPAS1, ERBB4, HBEGF, HIF1A, PXN</i>	8
	miR-145-5p	R-HSA-2219528	Sinalização PI3K/AKT em Câncer	8,74E-05	3,03E-03	<i>CDKN1A, IRS1, EGFR, IRS2, MDM2, ERBB4, CD28, HBEGF</i>	8

Continuação da Tabela 15.

Regulação	miRNA	REACTOME ID	Descrição	p	FDR	Genes	Contagem
miRNAs superexpressos	miR-31-5p	R-HSA-194315	Sinalização por Rho GTPases	6,61E-05	6,85E-03	<i>RHOA, ARPC5, TIAMI, WASF3, HIST1H2BC, HIST1H2BK, FLNA, RANGAP1, HIST1H2BJ, SRC, YWHAE, RHOBTB1, NF2, AR, SYDE2, GNA13, SFN</i>	17
	miR-31-5p	R-HSA-5663205	Doenças Infecciosas	3,82E-05	6,60E-03	<i>MET, RPS7, NUP188, RPS4Y1, RPL37A, RANGAP1, SRC, ARF1, RPL35A, GTF2E1, CCNT1, RPL27A, RPL12, XRCC5, AP2B1, NPM1</i>	16
	miR-31-5p	R-HSA-195258	Efetores RHO GTPase	2,55E-04	9,44E-03	<i>RHOA, ARPC5, WASF3, HIST1H2BC, HIST1H2BK, FLNA, RANGAP1, HIST1H2BJ, SRC, YWHAE, NF2, AR, SFN</i>	13
	miR-224-5p	R-HSA-5683057	Cascata de sinalização da família MAPK	5,45E-05	7,66E-03	<i>CDC42, PDGFRB, PEBP1, KRAS, TNRC6A, PAK2, PSMD3, NCOA3, XPO1, MAP2K2, RAC1</i>	11
	miR-31-5p	R-HSA-927802	<i>Nonsense-Mediated Decay (NMD)</i>	1,32E-04	9,44E-03	<i>PPP2R2A, RPS7, RPS4Y1, RPL37A, SMG1, RPL35A, RPL27A, RPL12</i>	8
	miR-31-5p	R-HSA-975957	<i>Nonsense Mediated Decay (NMD) ampliado pelo Complexo Exon Junction(EJC)</i>	1,32E-04	9,44E-03	<i>PPP2R2A, RPS7, RPS4Y1, RPL37A, SMG1, RPL35A, RPL27A, RPL12</i>	8
	miR-31-5p	R-HSA-8878166	Regulação Transcricional por RUNX2	1,77E-04	9,44E-03	<i>ITGA5, SATB2, CDK1, GLI2, SRC, SP7, AR, SMAD4</i>	8
	miR-224-5p	R-HSA-5687128	Sinalização MAPK6/MAPK4	1,48E-05	4,17E-03	<i>CDC42, TNRC6A, PAK2, PSMD3, NCOA3, XPO1, RAC1</i>	7
	miR-31-5p	R-HSA-2682334	Sinalização EPH-Ephrin	1,91E-04	9,44E-03	<i>RHOA, ARPC5, TIAMI, RASA1, SRC, AP2B1, EFNBI</i>	7
	miR-31-5p	R-HSA-69473	G2/M DNA <i>damage checkpoint</i>	2,33E-04	9,44E-03	<i>CDK1, HIST1H2BC, HIST1H2BK, RPA1, HIST1H2BJ, YWHAE, SFN</i>	7

FDR: *false discovery rate*; Vias são fornecidas pela base de dados Reactome para humanos e são descritas separadamente pela regulação (miRNAs sub ou superexpressos).

4.3.2 Validação dos miRNAs dos grupos metastático versus localizado

Entre os sete DEmiRs selecionados nos grupos não metastático versus metastático, quatro apresentavam $FC > 2,0$ (miR-200a-5p, miR-152-3p, miR-421 e miR-149-5p) e três foram escolhidos por relevância biológica (miR-181c-5p, miR-744-5p e miR-196b-5p), definidos subjetivamente por interações dos alvos através de bioestatística e publicações prévias em literatura médica (tabela 16). Estes miRNAs foram então submetidos a validação em amostra independente e expandida divididos em grupos de pacientes com doença metastática versus localizada através de qRT-PCR.

Tabela 16 – Dados obtidos no *microarray* dos sete DEmiRs escolhidos para validação em amostras independente e expandida entre os grupos de pacientes com tumor metastático versus localizado.

miRNA	Fold Change	p	Observação
miR-421	2,89	<0,001*	Valor de FC e p
miR-149-5p	6,30	0,002*	Valor de FC e p e descrito no TT x TNN
miR-744-5p	1,65	0,001*	Valor de p e relevância biológica
miR-200a-5p	2,10	0,047*	Valor do FC e descrito no TT x TNN
miR-152-3p	2,60	0,033*	Valor do FC
miR-196b-5p	1,66	0,025*	Relevância biológica
miR-181c-5p	0,63	0,031*	Descrito em CaPe

DEmiR: miRNA diferencialmente expresso; FC: *fold change*; TT: tecido tumoral; TNN: tecido não neoplásico; CaPe: câncer de pênis

Em amostra independente, nenhum dos sete DEmiRs foi validado conforme tabela 17 e figura 10. Entretanto, quando avaliados na amostra expandida com todos os 24 pacientes do estudo, os miR-421 e miR-744-5p apresentaram diferença significativa de expressão entre os grupos metastático versus localizado (tabela 17). Na tabela 17, pode-se comparar os resultados obtidos por *microarray* e qRT-PCR dos DEmiRs entre os grupos nas três coortes, com relação ao FC e valor de p. Os miR-421 e miR-744-5p, que alcançaram significância estatística na validação por qRT-PCR na amostra expandida, também se apresentaram superexpressos no grupo metastático com valores de FC semelhantes aos obtidos nos *microarray*.

Tabela 17 – Comparação da expressão dos 7 DEmiRs identificados pela técnica de *microarray* na comparação entre tumores metastáticos e tumores localizados na análise por *microarray* (n=11), validação com amostra independente (n=13) e na amostra total (n=24) por técnica de qRT-PCR.

Regulação	DEmiR	<i>Microarray</i>		qRT-PCR Amostra Independente		qRT-PCR Amostra Total	
		FC	p	FC	p	FC	p
Superexpresso	miR-421	2,89	<0,001*	2,12	0,051	2,21	0,005*
	miR-149-5p	6,30	0,002*	0,77	0,367	1,92	0,375
	miR-744-5p	1,65	0,001*	1,36	0,190	1,61	0,003*
	miR-200a-5p	2,10	0,047*	0,90	0,600	1,00	0,686
	miR-152-3p	2,60	0,033*	1,15	0,928	1,48	0,243
	miR-196b-5p	1,66	0,025*	1,00	0,504	1,33	0,550
Subexpresso	miR-181c-5p	0,63	0,031*	1,68	0,126	1,17	0,851

DEmiR: miRNA diferencialmente expresso; n: número de indivíduos; qRT-PCR: *quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*; FC: *fold change*; DP: desvio padrão. * p<0,05.

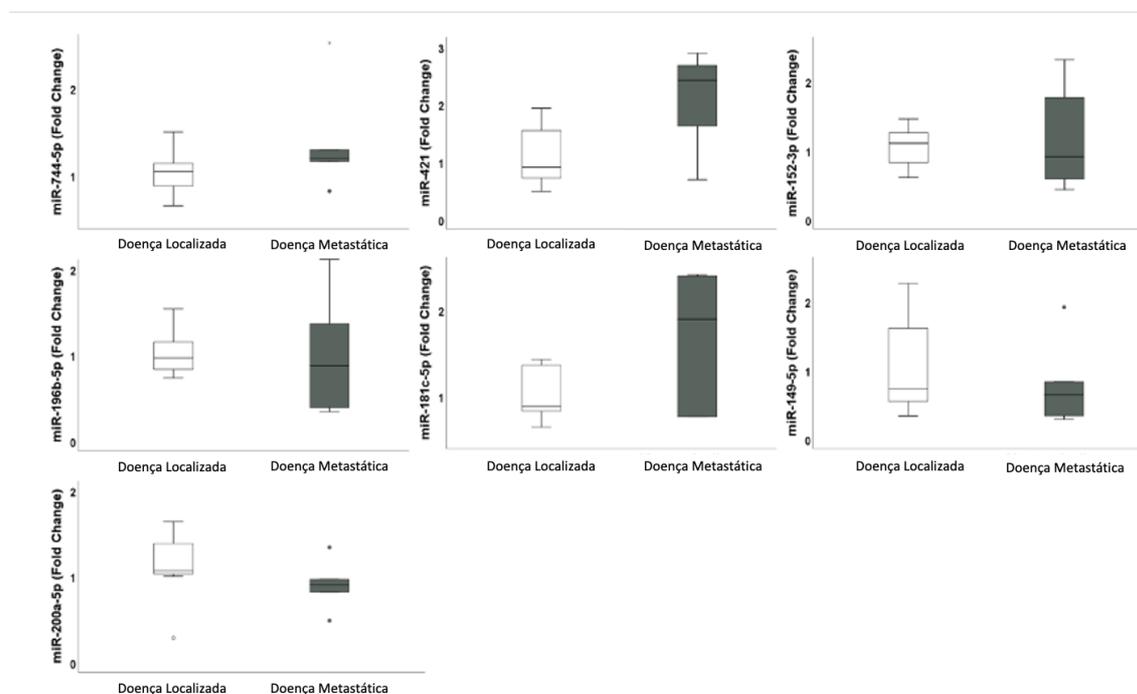


Figura 10 – Gráficos *box-plot* da expressão dos sete DEmiRs por qRT-PCR identificados no *microarray* e selecionados para validação na amostra independente entre os grupos de pacientes com doença metastática (n=6) versus localizada (n=7). Todas as comparações com p>0,05.

Avaliamos a capacidade dos dois DEmiRs validados na amostra expandida (miR-421 e miR-744-5p) em distinguir pacientes metastáticos dos não metastáticos através da construção de curvas ROC e ambos apresentaram AUC>0,8 (figura 11).

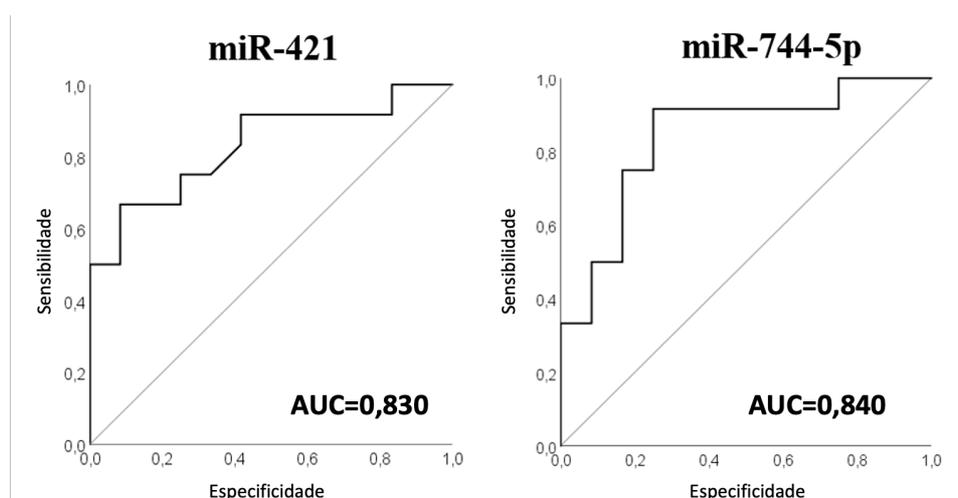


Figura 11 – Curvas ROC dos DEmiRs validados por qRT-PCR na amostra expandida com 24 pacientes. Os dois demonstraram boa acurácia para diferenciar os pacientes com doença metastática da localizada. ROC: *receiver operating characteristics*; AUC: *area under de curve*.

4.4 Análise de expressão dos mRNAs por qRT-PCR

Após avaliação dos potenciais genes alvos dos DEmiRs validados e preditos, além de outros genes desregulados em CaPe descritos em literatura pertinente, selecionamos 96 genes para análise de expressão através da plataforma Fluidigm®. Dentre os 96 genes investigados, 89 representam genes selecionados e sete representam genes endógenos (*ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *GUSB*, *HPRT1*, *RPLP0*, *TFRC*). Os ensaios correspondentes aos genes *NOX1*, *PDCDI*, *SLC2A1*, *TP73(var1)*, *TP73(var2)* e *WNT3a* foram excluídos da análise, pois apresentaram inespecificidade ou ausência de amplificação na amostra analisada. Portanto, 83 genes foram incluídos para as análises posteriores de comparação de expressão gênica entre os grupos.

4.4.1 Diferença de expressão de mRNA entre tecido tumoral versus tecido não neoplásico adjacente

Na comparação da expressão dos transcritos (mRNA) entre o TT (N=24) versus TNN (N=24) em amostra expandida foram detectados 37 genes diferencialmente expressos (DEGs) (tabela 18). Somente seis DEGs apresentaram superexpressão (*IL1A*, *MCM2*, *MMP1*, *MMP12*, *SFN* e *VEGFA*), sendo que o *MMP1* foi o gene com maior valor de FC, apresentando expressão 28 vezes maior no grupo de TT em relação ao TNN

adjacente, seguido pelo gene *IL1A* 13 vezes aumentado no TT em relação ao TNN. Os demais DEGs apresentaram subexpressão, sendo o gene *ALDH1* com menor valor de FC (0,09) (Tabela 18).

Tabela 18 – DEGs detectados na comparação entre TT (N=24) e TNN (N=24) de CaPe por qRT-PCR.

Reg	DEG	FC	FDR	DEG	FC	FDR	DEG	FC	FDR
Subexpressos	<i>ABCBI</i>	0,24	<0,001*	<i>LATS2</i>	0,58	0,004*	<i>RIPK3</i>	0,53	<0,001*
	<i>ALDH1A1</i>	0,09	<0,001*	<i>MDM2</i>	0,71	0,003*	<i>SAV1</i>	0,45	<0,001*
	<i>BCL2</i>	0,31	<0,001*	<i>MLH1</i>	0,77	0,007*	<i>STAT3</i>	0,66	<0,001*
	<i>CCND1</i>	0,61	0,007*	<i>NANOG</i>	0,33	0,005*	<i>STK4</i>	0,65	0,002*
	<i>EGR1</i>	0,19	<0,001*	<i>NRP1</i>	0,48	<0,001*	<i>TCF7L2</i>	0,36	<0,001*
	<i>FGF2</i>	0,18	<0,001*	<i>PEBP1</i>	0,53	<0,001*	<i>TLR4</i>	0,28	<0,001*
	<i>FOS</i>	0,18	<0,001*	<i>PITX2</i>	0,30	<0,001*	<i>TP53</i>	0,57	0,003*
	<i>HOXA9</i>	0,51	0,003*	<i>PPARGC1A</i>	0,11	<0,001*	<i>TWIST1</i>	0,18	<0,001*
	<i>KAT6A</i>	0,47	<0,001*	<i>PTEN</i>	0,55	<0,001*	<i>ZEB1</i>	0,23	<0,001*
	<i>KLF4</i>	0,22	<0,001*	<i>RECK</i>	0,24	<0,001*			
	<i>KMT2A</i>	0,40	<0,001*	<i>RHOA</i>	0,66	<0,001*			
Super	<i>IL1A</i>	13,39	<0,001*	<i>MMP1</i>	28,00	<0,001*	<i>SFN</i>	4,26	0,004*
	<i>MCM2</i>	2,14	<0,001*	<i>MMP12</i>	9,97	<0,001*	<i>VEGFA</i>	2,06	<0,001*

DEG: genes diferencialmente expressos; CaPe: câncer de pênis; N: número de indivíduos; Reg: regulação; FC: *fold change*; FDR: *false discovery rate*; qRT-PCR: *quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*; * p<0.05.

O banco de dados GSE57955 foi utilizado para confirmação *in silico* externa dos DEGs identificados em nosso estudo. No estudo original deste banco de dados, foram comparados 39 CaPe com cinco glândulas de autópsia(143). Conseguimos validar *in silico* cinco genes superexpressos (*MCM2*, *SFN*, *IL1A*, *MMP1* e *MMP12*) e 10 genes subexpressos (*FGF2*, *ABCBI*, *RECK*, *PPARGC1A*, *TLR4*, *EGR1*, *ZEB1*, *BCL2*, *PEBP1* e *FOS*) utilizando este banco de dados (Figura 12).

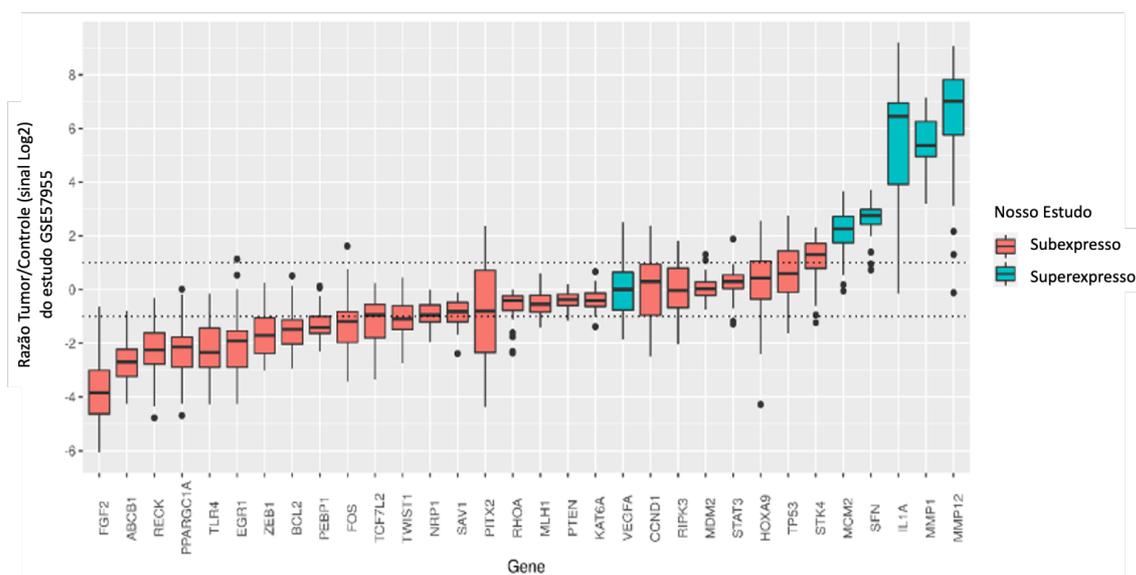


Figura 12 – Expressão gênica por razão de sinal de log₂ entre amostras de CaPe (N=39) e uma amostra de 5 glandes de autópsia (grupo controle) da base de dados GSE7955. Todos os valores medianos acima de 1,0 ou abaixo de -1,0 foram considerados como diferencialmente expressos. As barras de cada gene foram coloridas de acordo com sua regulação em nosso estudo (vermelho como subexpressos e azuis com superexpressos).

Investigamos se algum desses 37 DEGs poderia ser potencialmente regulado pelos 69 DEmiRs identificados pela técnica de *microarray* (tabela 19). A lista de 69 DEmiRs incluía todos os miRNAs detectados com significância estatística na comparação entre os grupos de TT versus TNN, incluindo os DEmiRs escolhidos para validação pela técnica de qRT-PCR (com base nos critérios previamente estabelecidos). Para essa análise, utilizamos o programa miRTarBase 8.0 e somente relações opostas foram incluídas na tabela 19.

Tabela 19 – Lista dos 69 DEmiRs detectados na comparação de TT com TNN na análise de *microarray* com expressão oposta em relação aos 37 DEGs descritos como alvos experimentalmente validados de acordo com o miRTarBase 8.0.

DEGs	DEmiRs
<i>ABCB1</i>	-
<i>ALDH1A1</i>	-
<i>BCL2</i>	miR-18a-5p, miR-224-5p*
<i>CCND1</i>	miR-18a-5p, miR-21-3p, miR-183-5p, miR-224-5p*, miR-6768-5p
<i>EGR1</i>	miR-183-5p
<i>FGF2</i>	miR-936
<i>FOS</i>	miR-4640-5p
<i>HOXA9</i>	miR-18a-5p
<i>IL1A</i>	miR-30a-5p*
<i>KAT6A</i>	-
<i>KLF4</i>	-
<i>KMT2A</i>	miR-6813-5p
<i>LATS2</i>	miR-31-5p*, miR-183-5p
<i>MCM2</i>	miR-145-5p*
<i>MDM2</i>	miR-4793-3p
<i>MLH1</i>	miR-31-5p*, miR-4793-3p
<i>MMP1</i>	miR-145-5p*
<i>MMP12</i>	miR-145-5p*
<i>NANOG</i>	miR-8073
<i>NRP1</i>	-
<i>PEBP1</i>	miR-224-5p*
<i>PITX2</i>	-
<i>PPARGC1A</i>	miR-8064
<i>PTEN</i>	miR-18a-5p, miR-21-3p, miR-200a-5p*
<i>RECK</i>	miR-183-5p
<i>RHOA</i>	miR-31-3p*, miR-31-5p*, miR-4640-5p, miR-4721
<i>RIPK3</i>	-
<i>SAV1</i>	-
<i>SFN</i>	-
<i>STAT3</i>	miR-21-3p, miR-365b-5p
<i>STK4</i>	miR-18a-5p, miR-4793-3p
<i>TCF7L2</i>	-
<i>TLR4</i>	-
<i>TP53</i>	miR-18a-5p
<i>TWIST1</i>	-
<i>VEGFA</i>	miR-126-3p, miR-134-5p, miR-145-5p*, miR-195-5p, miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-361-5p, miR-378a-3p, miR-497-5p
<i>ZEB1</i>	miR-183-5p

DEmiR: miRNA diferencialmente expresso; DEG: gene diferencialmente expresso; * DEmiRs detectados na análise por *microarray* e validados por qRT-PCR

Dentre os oito DEmiRs identificados como potenciais reguladores pós-transcricionais e que foram validados na amostra independente por qRT-PCR, identificamos que o miR-145-5p (subexpresso) possui como genes alvos os *MMP1*, *MMP12* e *VEGFA* superexpressos; o miR-30a-5p (subexpresso) possui um gene alvo que apresentou superexpressão (*IL1A*) na comparação entre os grupos de TT versus TNN adjacente; o miR-224-5p (superexpresso) apresenta três alvos (*BCL2*, *CCND1* e *PEBP1*) com subexpressão; o miR-31-5p (superexpresso) apresenta três genes com subexpressão (*LATS2*, *MLH1*, *RHOA*); o miR-31-3p (superexpresso) apresenta um gene com subexpressão (*RHOA*); o miR-200a-5p (superexpresso) regula o *PTEN* (subexpresso). Já os miR-487b-3p e miR-432-5p (subexpressos) não apresentaram nenhum alvo com alteração de expressão.

A análise do GSEA demonstrou que os DEGs identificados participam na regulação aumentada de vias de proteólise e regulação reduzida de vias relacionadas a resposta celular ao estímulo endógeno, resposta a fatores de crescimento e atividade regulatória de transcrição ($p < 0,05$) de acordo com o banco de dados Gene Ontology (figura 13 e tabela 20).

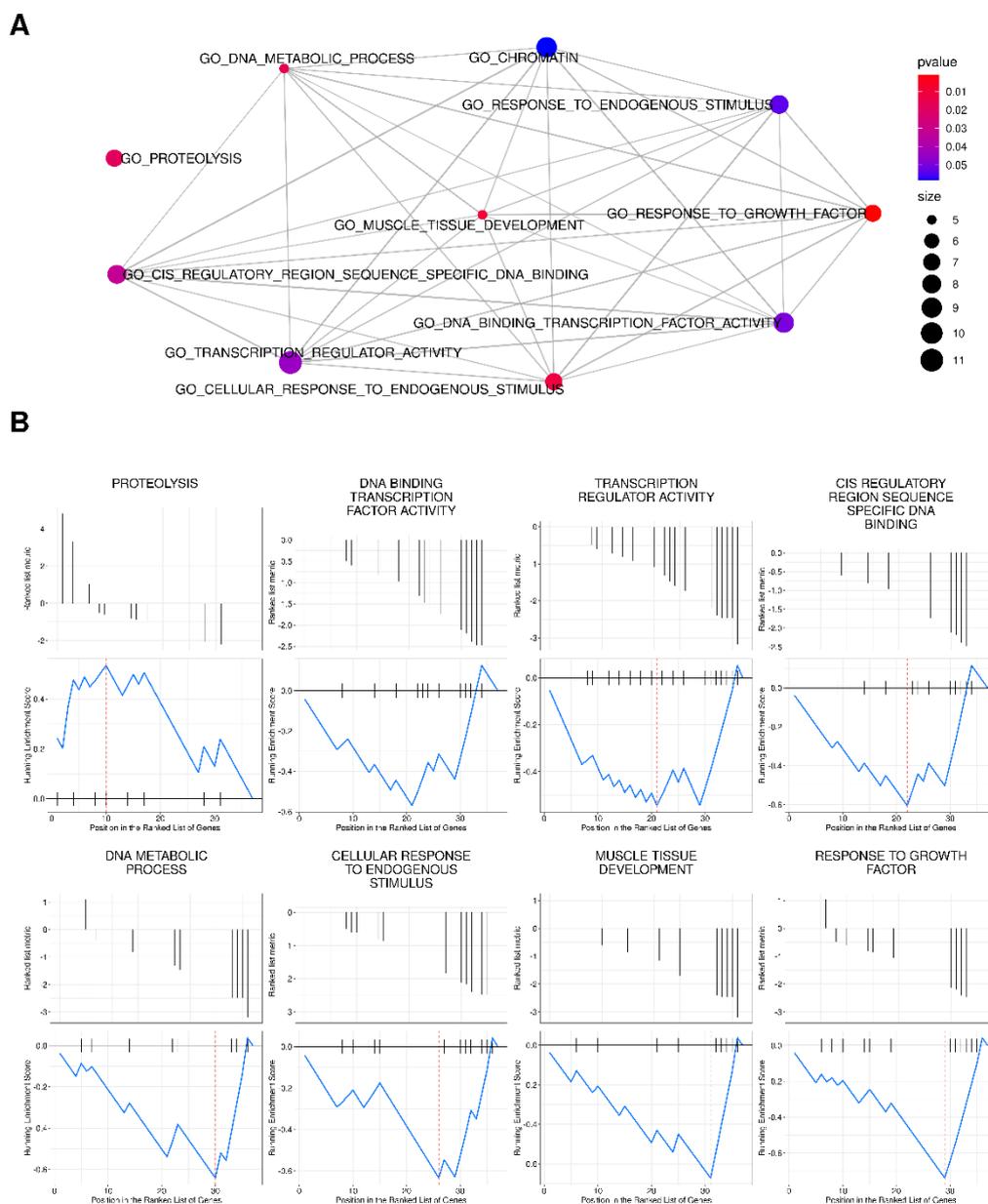


Figura 13 – Análise de enriquecimento de vias (*Gene Set Enrichment Analysis* – GSEA) para os DEGs no banco de dados *Gene Ontology* (GO). (A) Rede biológica dos termos do GO mais representativos dos 37 DEGs detectados em nosso estudo. Pontos são coloridos pelo valor de p e dimensionados pelo número de genes envolvidos; (B) Gráfico do GSEA indicando a distribuição dos DEGs incluídos em cada via. As linhas azuis representam a flutuação da pontuação de enriquecimento para cada via seleccionada indicando qual está superexpresso (acima da barra horizontal) ou subexpresso (abaixo da barra horizontal).

Tabela 20 – Lista das vias enriquecidas do Gene Ontology (GO) com os DEGs detectados por qRT-PCR na comparação entre TT (N=24) e TNN adjacente (N=24).

Descrição (GO)	setSize	enrichment Score	NES	valor p	p ajustado	valor de Q	rank	Leading edge	Core enrichment
RESPOSTA A FATORES DE CRESCIMENTO	13	-0,74	-2,02	0,00	0,14	0,14	9	tags=54%, list=24%, signal=63%	<i>ZEB1, KLF4, EGRI, TWIST1, FOS, FGF2, PPARGCIA</i>
DESENVOLVIMENTO TEC. MUSCULAR	10	-0,67	-1,76	0,01	0,53	0,52	7	tags=50%, list=19%, signal=56%	<i>EGRI, TWIST1, FOS, FGF2, PPARGCIA</i>
RESPOSTA CELULAR AO ESTÍMULO ENDÓGENO	13	-0,63	-1,74	0,01	0,53	0,52	12	tags=54%, list=32%, signal=56%	<i>TLR4, ZEB1, KLF4, EGRI, FOS, FGF2, PPARGCIA</i>
PROCESSO METABÓLICO DO DNA	10	-0,64	-1,68	0,02	0,53	0,52	8	tags=50%, list=22%, signal=54%	<i>KLF4, TWIST1, FOS, FGF2, PPARGCIA</i>
PROTEÓLISE	12	0,53	1,61	0,02	0,53	0,52	10	tags=58%, list=27%, signal=63%	<i>MMP1, MMP12, SFN, VEGFA, MDM2, STAT3, RHOA</i>
GO CIS REGULATORY REGION SEQUENCE SPECIFIC DNA BINDING	11	-0,60	-1,62	0,03	0,76	0,76	16	tags=73%, list=43%, signal=59%	<i>TCF7L2, NANOG, PITX2, ZEB1, KLF4, EGRI, TWIST1, FOS</i>
ATIVIDADE REGULATÓRIA DE TRANSCRIÇÃO	18	-0,54	-1,57	0,04	0,78	0,77	17	tags=61%, list=46%, signal=64%	<i>KMT2A, TCF7L2, NANOG, PITX2, ZEB1, KLF4, EGRI, TWIST1, FOS, FGF2, PPARGCIA</i>
GO DNA BINDING TRANSCRIPTION FACTOR ACTIVITY	13	-0,57	-1,56	0,05	0,78	0,77	17	tags=69%, list=46%, signal=58%	<i>KMT2A, TCF7L2, NANOG, PITX2, ZEB1, KLF4, EGRI, TWIST1, FOS</i>
RESPOSTA AO ESTÍMULO ENDÓGENO	15	-0,56	-1,59	0,05	0,78	0,77	14	tags=53%, list=38%, signal=56%	<i>BCL2, TLR4, ZEB1, KLF4, EGRI, FOS, FGF2, PPARGCIA</i>
CROMATINA	14	-0,55	-1,53	0,06	0,78	0,77	16	tags=64%, list=43%, signal=59%	<i>TCF7L2, NANOG, PITX2, ZEB1, KLF4, EGRI, TWIST1, FOS, PPARGCIA</i>
GO TRANSITION METAL ION BINDING	10	0,53	1,56	0,06	0,78	0,77	3	tags=30%, list=8%, signal=38%	<i>MMP1, IL1A, MMP12</i>
RESPOSTA AO COMPOSTO CÍCLICO ORGÂNICO	10	-0,56	-1,47	0,07	0,82	0,82	8	tags=40%, list=22%, signal=43%	<i>KLF4, EGRI, FOS, PPARGCIA</i>
SEQUÊNCIA ESPECÍFICA DE LIGAÇÃO AO DNA	16	-0,53	-1,51	0,08	0,82	0,82	17	tags=69%, list=46%, signal=65%	<i>KMT2A, TCF7L2, NANOG, BCL2, PITX2, ZEB1, KLF4, EGRI, TWIST1, FOS, PPARGCIA</i>
CROMOSSOMO NUCLEAR	15	-0,53	-1,49	0,08	0,85	0,84	16	tags=60%, list=43%, signal=57%	<i>TCF7L2, NANOG, PITX2, ZEB1, KLF4, EGRI, TWIST1, FOS, PPARGCIA</i>
GO POSITIVE REGULATION OF MULTICELLULAR ORGANISMAL PROCESS	18	-0,50	-1,45	0,09	0,85	0,84	9	tags=39%, list=24%, signal=57%	<i>ZEB1, KLF4, EGRI, TWIST1, FOS, FGF2, PPARGCIA</i>

Vias fornecidas pela base de dados Gene Ontology (GO) ($p < 0.1$)

Quando realizamos as curvas ROC para os 37 DEGs detectados em nosso estudo, encontramos que todos os seis DEGs superexpressos mostram $AUC > 0,78$ (*IL1A*, *MCM2*, *MMP1*, *MMP12*, *SFN* e *VEGFA*), apresentando boa acurácia para discriminação entre os grupos, TT versus TNN (Figura 14).

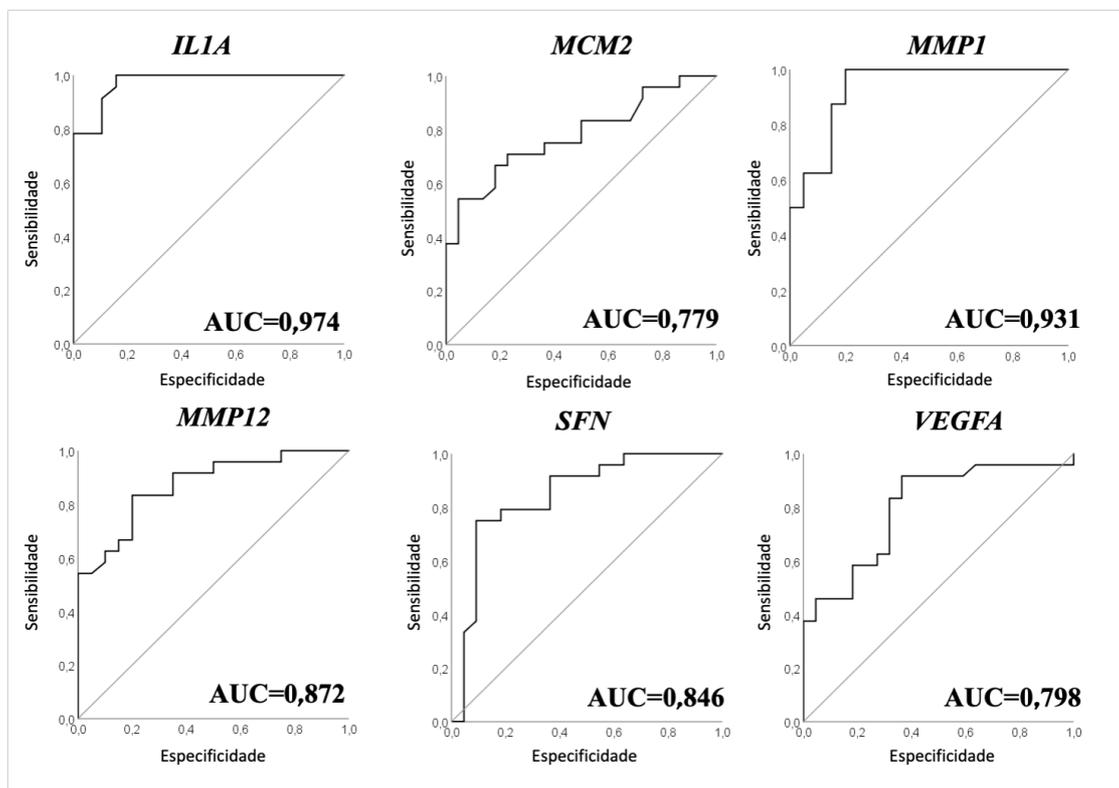


Figura 14 – Curvas ROC dos DEGs que demonstraram ter boa acurácia para diferenciação do TT do TNN em pacientes com CaPe; ROC: *receiver operating characteristic*; AUC: *area under the curve*.

Construímos ainda um gráfico com os valores de correlação de Pearson entre as expressões dos miRNAs e genes para TT e TNN separadamente (Figura 15A), mostrando que essas expressões têm diferente perfis nos grupos. Com uma distribuição linear conseguimos determinar oito pares miRNA-mRNA que mudaram sua correlação na comparação dos grupos (Figura 15B e C). A mudança mais importante foi observada no par miR-432-5p-*TP53*, que mostrava uma correlação negativa no TNN e uma positiva no TT (Figura 15C).

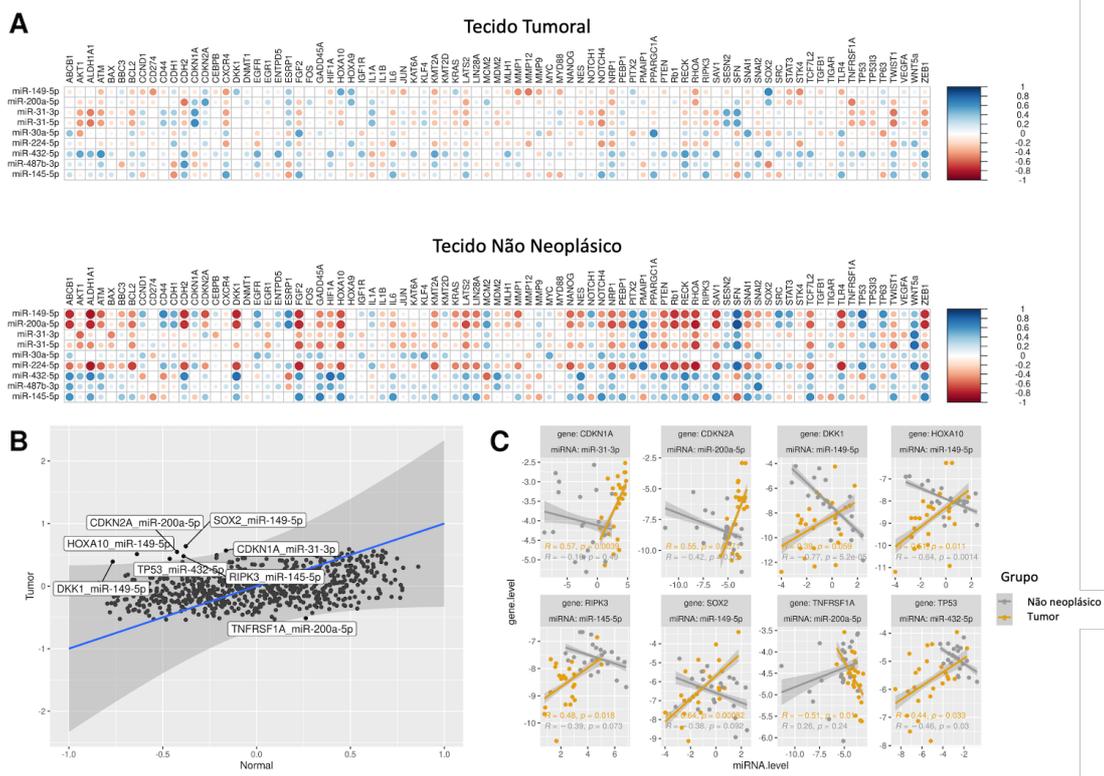


Figura 15 – Correlações entre as expressões dos nove miRNAs e 83 genes nos TT e TNN considerando a amostra de 24 pacientes com CaPe. (A) Coeficientes de correlação de Pearson entre os níveis de expressão entre miRNAs e genes mostrando diferentes perfis entre amostras de TT e TNN. (B) Os valores de R foram colocados no gráfico de equação linear e oito pares miRNA-gene fora do intervalo de confiança foram selecionados para nova análise; (C) Valores da expressão dos miRNA e gene (-delta CT) dos TT e TNN foram colocados em gráfico. Foram escolhidos os oito pares selecionados em (B).

Realizamos ainda análises de curva ROC para investigar se estes pares miRNA-mRNA poderiam discriminar os grupos de TT e TNN. Observamos que dois pares apresentaram $AUC > 0,85$ (miR-432-5p-*TP53* e miR-145-5p-*RIPK3*) e três $AUC > 0,65$ (miR-149-5p-*DKK1*, miR-149-5p-*SOX2*, e 118 miR-149-5p-*HOXA10*; Figura 16).

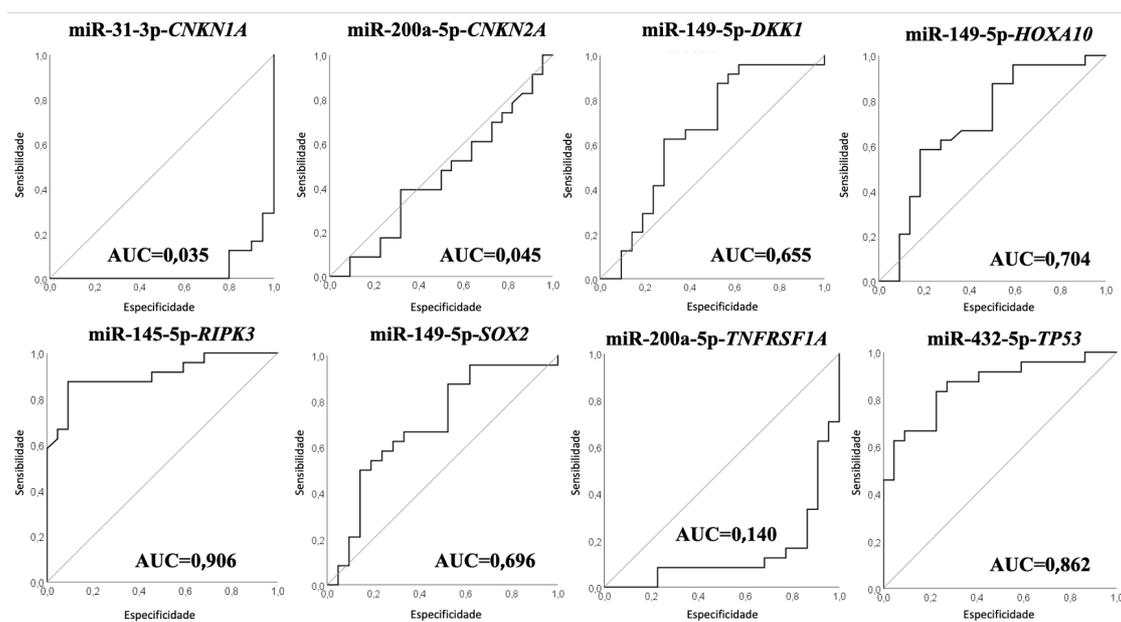


Figura 16 – Oito pares miRNA-mRNA alterados na carcinogênese peniana e suas curvas ROC para discriminação de TT e TNN. ROC: *receiver operating characteristic*; AUC: *area under the curve*.

4.4.2 Diferença de expressão de mRNA nos pacientes com doença metastática versus localizada

Do nosso painel de 83 genes, sete DEGs (*CCND1*, *EGFR*, *ENTPD5*, *HOXA10*, *IGF1R*, *MYC* e *SNAI2*) foram detectados entre os grupos de tumores metastático em relação aos localizados na amostra total de CaPe, sendo todos superexpressos (tabela 21).

Tabela 21 – Lista dos sete DEGs identificados na comparação dos grupos de tumores metastáticos (N=12) em relação aos tumores localizados (N=12).

DEG	FC	p
<i>CCND1</i>	1,63	0,034
<i>EGFR</i>	3,69	0,006
<i>ENTPD5</i>	2,04	0,011
<i>HOXA10</i>	2,24	0,014
<i>IGF1R</i>	1,44	0,020
<i>MYC</i>	1,55	0,028
<i>SNAI2</i>	1,82	0,010

DEG: Genes diferencialmente expressos; N: número de indivíduos.

Conforme descrito na metodologia, não fizemos enriquecimento de vias para estes sete genes pelo GSEA devido ao número de DEGs identificados.

As curvas ROC destes sete DEGs mostraram valores de AUC elevados distinguindo pacientes com metástases linfonodais com acurácia superior a 74% (Figura 17).

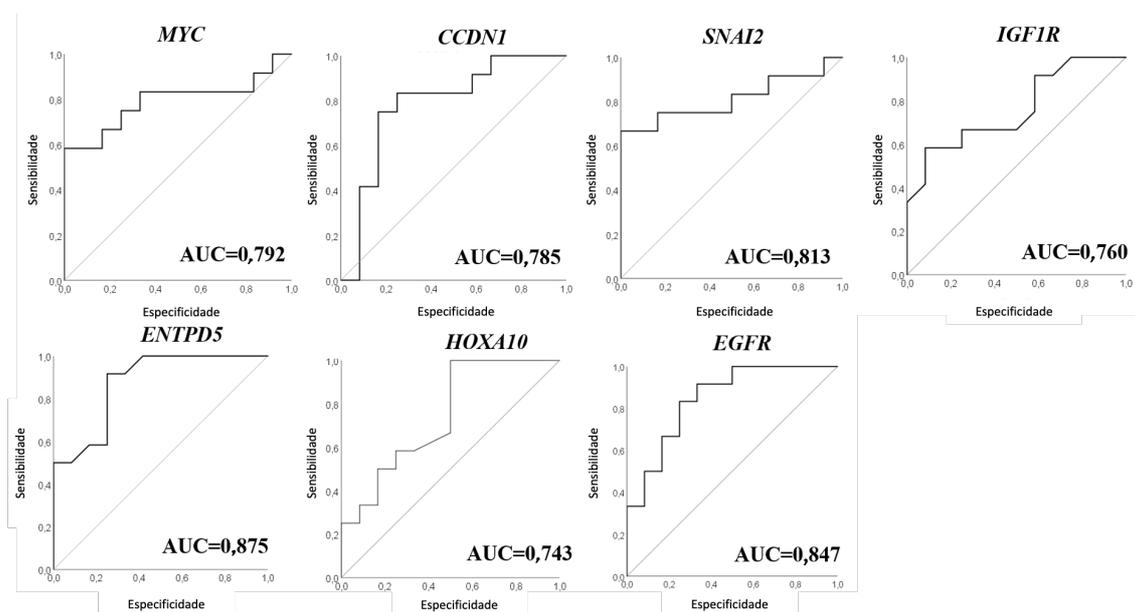


Figura 17 – Curvas ROC dos sete DEGs detectados na comparação entre tumores de pacientes com doença metastática e localizada. ROC: receiver operating characteristic; AUC: area under the curve.

Investigamos se algum desses sete DEGs poderia ser potencialmente regulado por algum dos 21 DE miRNAs identificados pela técnica de *microarray*, entretanto nenhum DEG alvo de DE miRNAs apresentou correlação oposta. Embora o *MYC* seja alvo do miR-744-5p validado na amostra expandida, ambos se encontram superexpressos. O gene *MYC* apresentou FC=1,55 e miR-744-5p apresentou FC de 1,65 pela técnica de *microarray* e FC de 1,61 pela validação na amostra expandida por qRT-PCR.

Realizamos a correlação de Pearson para os valores de expressão entre os sete DE miRNAs e os 83 mRNAs para os pacientes com tumor metastático (N=12) e doença localizada (N=12). Observamos uma mudança na correlação entre os níveis de expressão dos mRNA-miRNA nos tecidos de pacientes com doença metastática e localizada (Figura 18A). Para explorar melhor estas mudanças durante a progressão da doença e aumentar a acurácia da seleção do par mRNA-miRNA, construímos um gráfico colorindo os pares de acordo com o valor de p da correlação nos dois grupos (metastático e localizado; Figura 4B). Selecionamos os pares com valores de $p < 0,1$ em pelo menos um dos grupos (117 de 581 pares) e destes 117, selecionamos os pares com $AUC > 0,8$ para separar os grupos

metastático e localizado (Figura 18C e 19). Entre estes pares, identificamos dois miRNAs (miR-421 e o miR-744-5p) e nove mRNAs (*ABCB1*, *BCL2*, *CD274*, *LIN28A*, *MLH1*, *MYD88*, *PPARGCIA*, *STAT3* e *TLR4*). Sete destes 10 pares (miR-421 e *ABCB1*, *CD274*, *MYD88* e *STAT3*; miR-744 e *BCL2*, *PPARGCIA* e *TLR4*) apresentaram ruptura no padrão de regulação, mudando de uma correlação positiva ou sem correlação na doença localizada para uma correlação negativa na doença metastática (Figura 19).

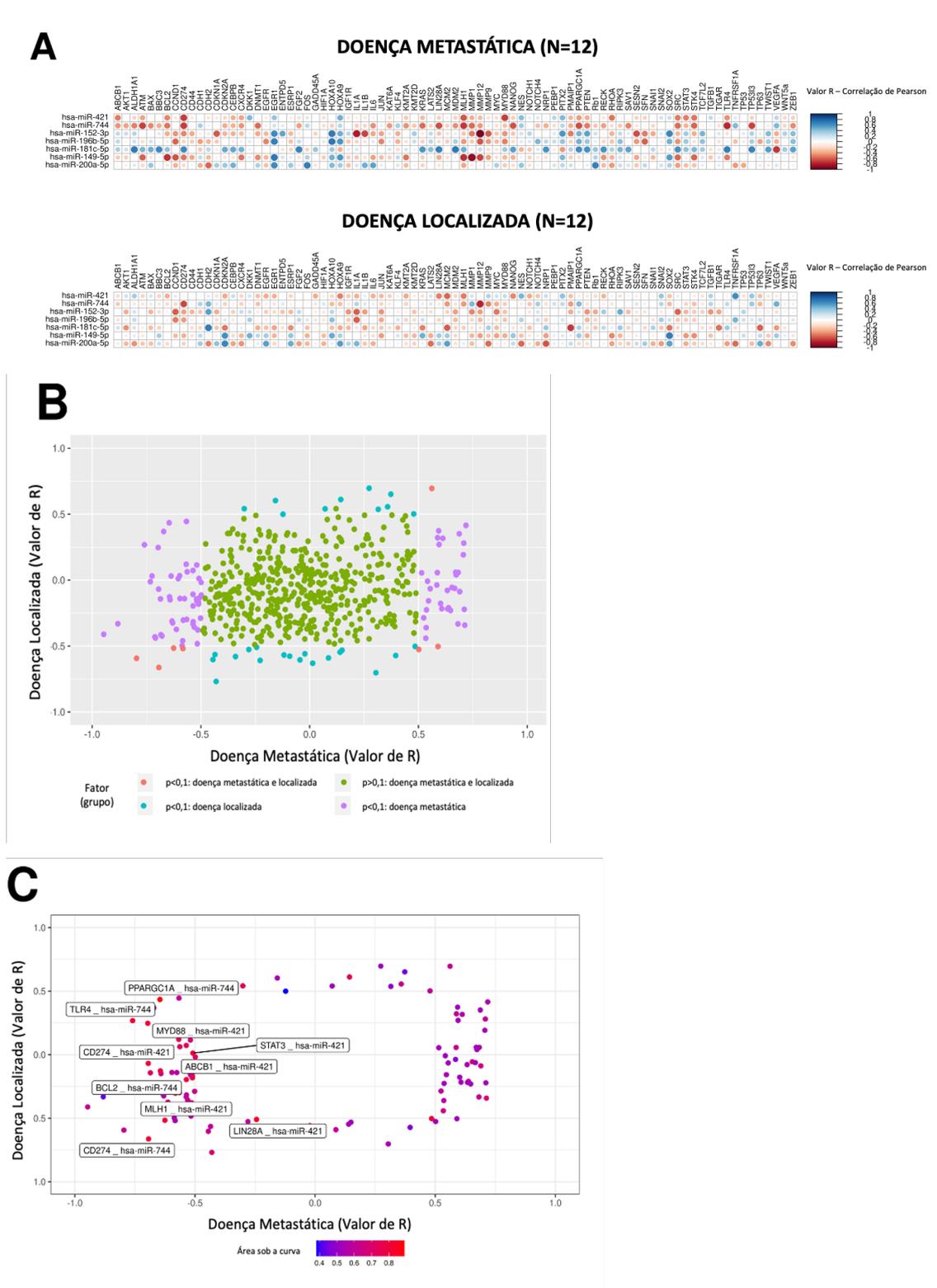


Figura 18 – Correlações entre as expressões dos sete miRNAs e 83 genes nas amostras de tumores dos pacientes com doença metastática e localizada de 24 pacientes com CaPe. (A) Coeficientes de correlação de Pearson entre os níveis de expressão dos miRNAs e genes entre doença metastática e localizada. As cores e tamanhos de cada ponto representam o valor de R e p; (B) Os valores de R foram colocados no gráfico de dispersão. Cada ponto foi colorido de acordo com valor de p para o tecido.; (C) Gráfico de dispersão para os pares mRNA-miRNA com correlações significativas em pelo menos um tecido. Os pontos foram coloridos de acordo com a área sob a curva para discriminação entre doença metastática (N=12) e localizada (N=12).

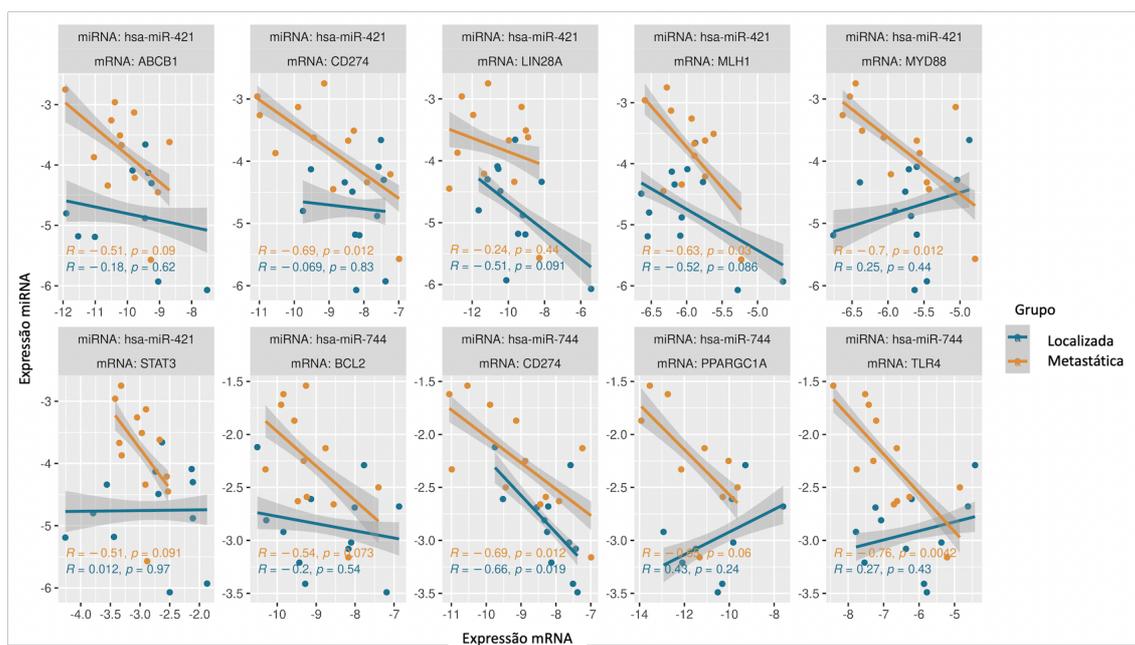


Figura 19 – Dez correlações inversas de pares miRNA-mRNA identificados pela correlação de Pearson entre expressão de sete miRNAs e 83 genes nos pacientes com tumores de pacientes com doença metastática e localizada na amostra total de 24 pacientes com CaPe.

Construindo curvas ROC para avaliar a capacidade de discriminação entre pacientes metastáticos daqueles com doença localizada dos 10 pares mRNA-miRNA com maior alteração na sua regulação durante o processo de metastatização, encontramos que eles possuem AUC maior que 0,8 (figura20).

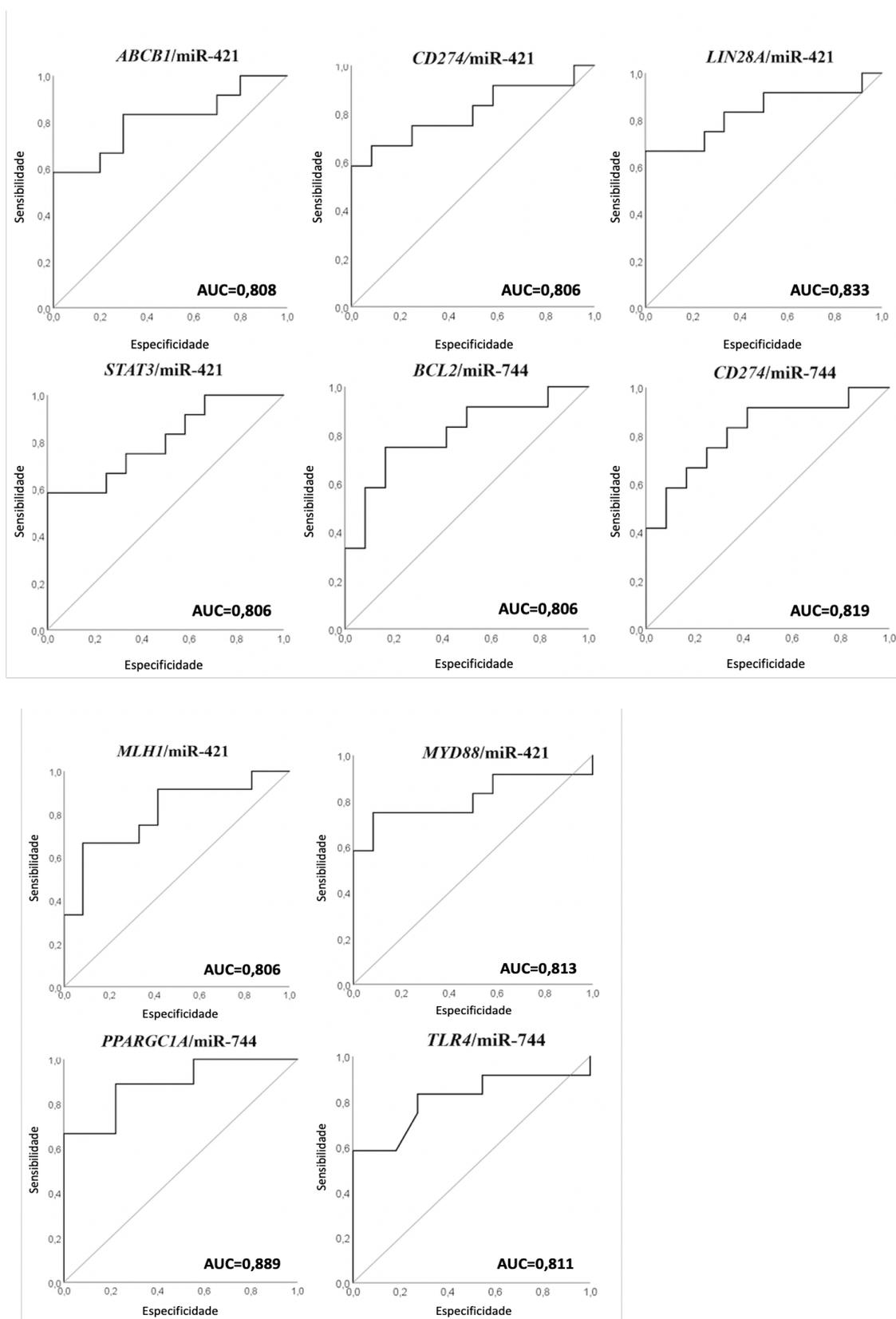


Figura 20 – Curvas ROC das razões dos dez pares mRNA-miRNA alterados e candidatos a biomarcadores para metástase em CaPe na evolução para metástase do CaPe e suas curvas ROC para discriminação entre os pacientes com doença metastática e localizada. ROC: *receiver operating characteristic*; AUC: *area under de curve*.

4.5 Associação entre os miRNAs e mRNAs e as variáveis clínico-patológicas

4.5.1 Análise comparativa da expressão dos miRNAs com as variáveis clínico-patológicas

Além da associação dos miRNAs com metástases, avaliamos a associação entre os DEmiRs e outros fatores de prognóstico no CaPe. A menor expressão do miR-31-3p foi associado com maior estágio pT, com FC de 0,39 e $p=0,043$ (Tabela 22). A menor expressão do miR-31-5p apresentou tendência de associação ($p=0,058$) com a mesma variável. Nenhum outro miRNA apresentou associação com os fatores de prognóstico.

Tabela 22 – Resultado das associações significativas entre os níveis de expressão dos 14 DEmiRs escolhidos para validação por qRT-PCR e as variáveis clínicas investigadas na amostra total de pacientes com CaPe (N=24).

miRNA	HPV		Tamanho		Grau		pT	
	Sim x não		>5cm x ≤5cm		G3 x G2+1		pT3-2 x pT1	
	FC	p	FC	p	FC	p	FC	p
miR-421	0,61	0,068	1,21	0,494	1,22	0,479	1,26	0,515
miR-744-5p	0,96	0,801	1,19	0,288	1,22	0,233	1,38	0,119
miR-152-3p	0,92	0,707	1,09	0,711	0,78	0,267	0,97	0,924
miR-196b-5p	0,68	0,067	1,22	0,359	0,96	0,833	1,14	0,636
miR-181c-5p	0,82	0,249	0,90	0,558	0,92	0,650	0,77	0,240
miR-145-5p	0,59	0,120	1,24	0,535	0,79	0,489	0,82	0,654
miR-149-5p	0,85	0,715	0,87	0,746	0,80	0,612	1,44	0,508
miR-200a-5p	0,91	0,631	0,86	0,431	0,90	0,594	0,96	0,870
miR-31-3p	1,17	0,683	1,01	0,989	1,30	0,503	0,39	0,043*
miR-31-5p	1,20	0,652	1,09	0,820	1,18	0,676	0,40	0,058
miR-30a-5p	0,91	0,640	1,23	0,301	1,00	0,987	0,65	0,086
miR-224-5p	1,21	0,467	1,41	0,188	0,80	0,396	0,74	0,381
miR-432-5p	0,61	0,357	0,81	0,702	1,94	0,214	0,56	0,396
miR-487b-3p	0,69	0,410	1,19	0,706	1,87	0,159	0,66	0,467

Continuação da Tabela 22.

miRNA	IMV Sim x não		Inv. Perineural Sim x não		Grupo de Risco** Alto x Int e baixo	
	FC	p	FC	p	FC	p
miR-421	1,54	0,143	1,13	0,635	1,26	0,515
miR-744-5p	1,24	0,229	0,97	0,833	1,38	0,119
miR-152-3p	0,97	0,914	0,94	0,771	0,97	0,924
miR-196b-5p	1,42	0,128	1,26	0,262	1,14	0,636
miR-181c-5p	0,88	0,503	1,02	0,908	0,77	0,240
miR-145-5p	0,92	0,833	0,91	0,766	0,82	0,654
miR-149-5p	1,24	0,644	0,64	0,284	1,44	0,508
miR-200a-5p	1,19	0,424	1,07	0,713	0,96	0,870
miR-31-3p	1,15	0,741	1,05	0,887	0,39	0,043*
miR-31-5p	1,16	0,731	1,13	0,753	0,40	0,058
miR-30a-5p	1,00	0,985	0,96	0,822	0,65	0,086
miR-224-5p	0,67	0,165	1,14	0,619	0,74	0,381
miR-432-5p	0,77	0,656	1,24	0,681	0,56	0,396
miR-487b-3p	0,90	0,833	1,07	0,882	0,66	0,467

DemiR: miRNA diferencialmente expresso; CaPe: câncer de pênis; N: número de indivíduos; HPV: *human papillomavirus*; pT: estágio patológico T; IMV: invasão microvascular; Inv: invasão; Int: intermediário; * p<0,05; ** Grupo de risco segundo a *European Association of Urology*.

4.5.2 Análise comparativa da expressão dos mRNAs com as variáveis clínico-patológicas

Em relação aos 83 transcritos investigados, detectamos diferenças significativas entre os valores de expressão de 17 genes e as características clínico-patológicas, de acordo com a tabela 23. Destaca-se o aumento da expressão do gene *MMP1* foi significativamente associado a presença de invasão perineural, grau de diferenciação, tamanho e pT. Além disso, quando construído as curvas ROC da associação da expressão deste transcrito com essas variáveis, elas apresentaram AUC maior que 0,76 (figura 21). A maior expressão dos genes *SRC*, *CCND1*, *EGFR*, *TP53I3* e *IL1A* também apresentaram AUC maior que 0,75 para separação entre grupos prognósticos conforme figura 22.

Tabela 23 – Resultado das associações significativas entre os níveis de expressão dos mRNAs e as variáveis clínicas investigadas no estudo.

Variável	mRNA	Fold Change	p
HPV (presença vs ausência)	<i>BAX</i>	0,724	0,030
	<i>SNAI2</i>	0,542	0,014
Tamanho (> 5cm vs ≤ 5cm)	<i>LIN28A</i>	0,362	0,047
	<i>MMP1</i>	3,983	0,042
	<i>NANOG</i>	0,398	0,042
	<i>TP53</i>	0,495	0,014
	<i>TP63</i>	0,668	0,050
Grau diferenciação (III vs I+II)	<i>CCND1</i>	1,915	0,006
	<i>EGFR</i>	5,267	0,001
	<i>MMP1</i>	3,911	0,045
	<i>RIPK3</i>	0,602	0,037
	<i>SRC</i>	1,675	0,005
Invasão perineural (Sim vs Não)	<i>KLF4</i>	0,472	0,040
	<i>MMP1</i>	5,433	0,007
	<i>MMP9</i>	0,279	0,044
	<i>TP53I3</i>	1,676	0,034
Grupo de Risco para metástase (alto vs médio+alto)	<i>ABCBI</i>	0,394	0,020
	<i>MMP1</i>	7,436	0,018
pT (T2+T3 vs T1)	<i>ABCBI</i>	0,394	0,020
	<i>MMP1</i>	7,436	0,018
Invasão linfovascular (Sim vs Não)	<i>IL1A</i>	3,291	0,027

HPV: *human papillomavirus*

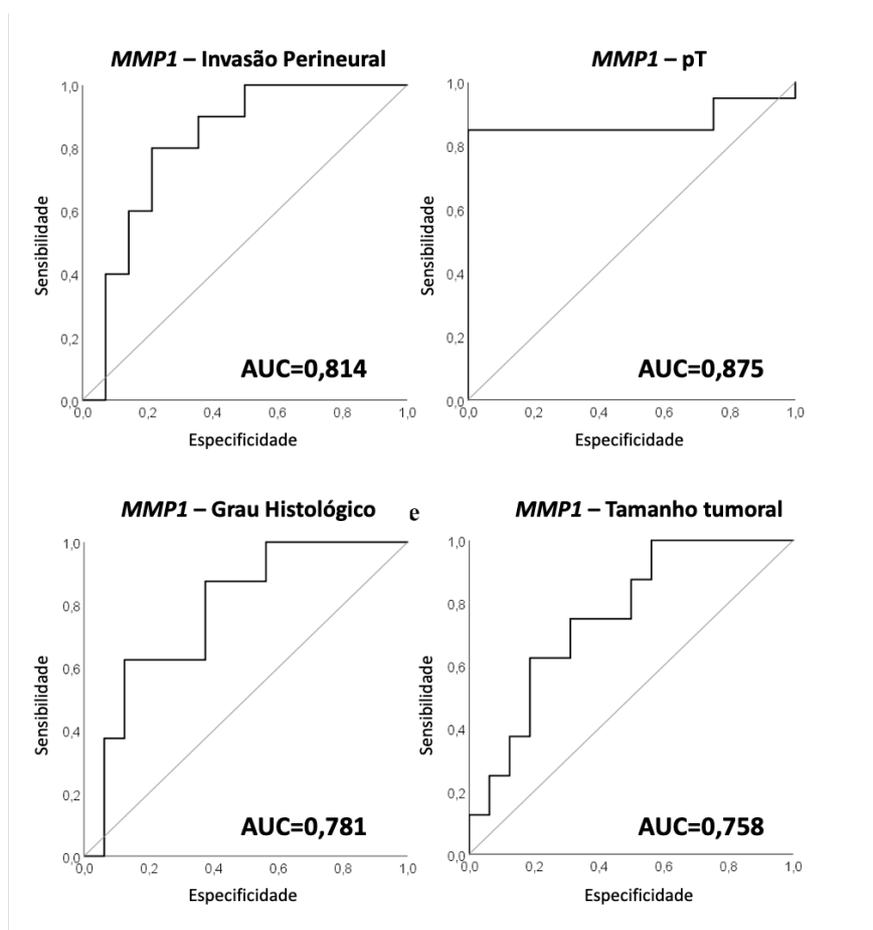


Figura 21 – Curvas ROC demonstrando que o nível de expressão do gene *MMP1* é um bom fator preditor de presença de invasão perineural, pior estágio pT (T2+T3), maior grau histológico (G3) e maior tamanho tumoral (>5cm); ROC: receiver operating characteristics; AUC: area under de curve.

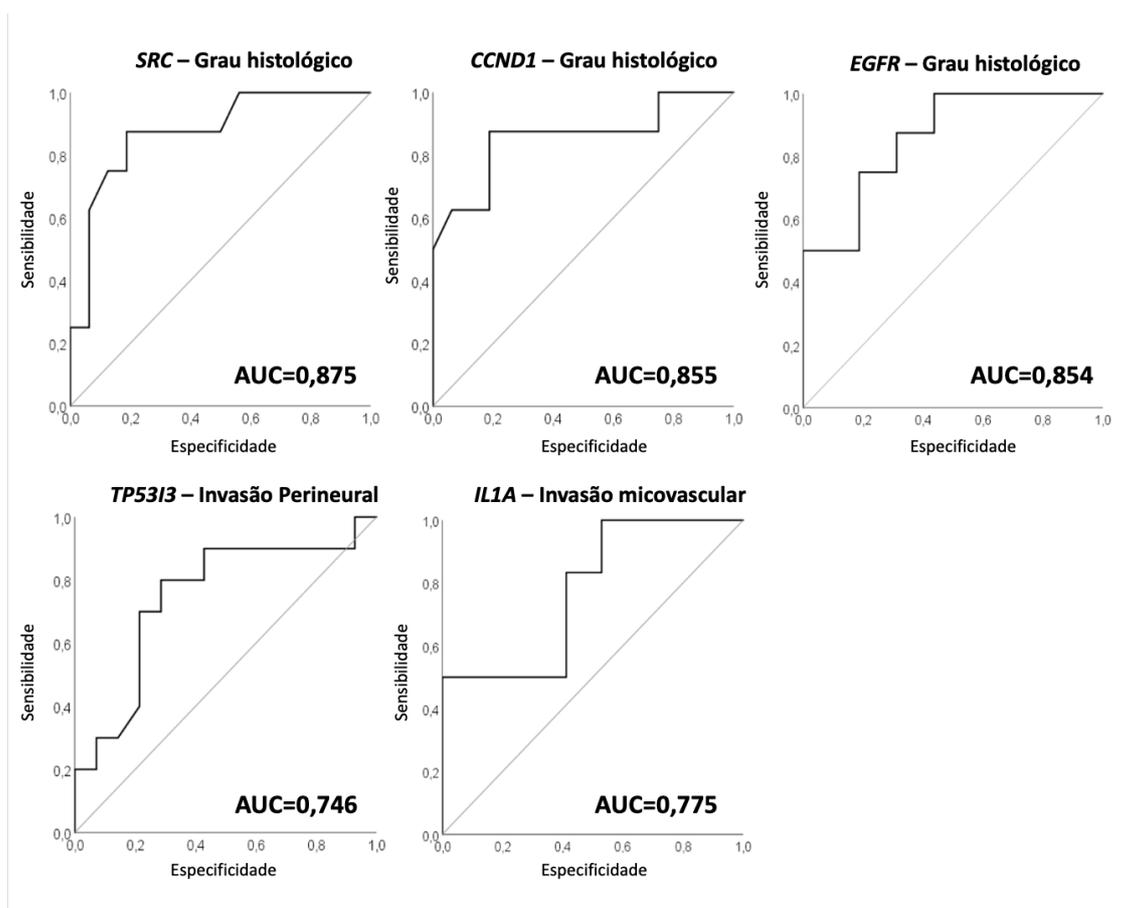


Figura 22 – Curvas ROC demonstrando que o nível de expressão dos genes *SRC*, *CCND1*, *EGFR*, *TP5313* e *IL1A* são bons fatores preditores de maior grau histológico (G3), presença de invasão perineural e microvascular, respectivamente; ROC: receiver operating characteristics; AUC: area under de curve.

4.6 Associação entre os miRNAs e mRNAs com sobrevida livre de recorrência, câncer-específica e sobrevida global

4.6.1 Associação entre os níveis de expressão dos miRNAs com SLR, SCE e SG

As tabelas 24, 25 e 26 descrevem as associações entre miRNA com SLR, SCE e SG, pelo teste de Log-rank, baseado na mediana do valor do -dCT. Detectamos que a superexpressão do miR-421 está associada a menor sobrevida global ($p=0,038$; tabela 26; figura 23). Entretanto, houve apenas tendência desta associação ($p=0,058$) pelo modelo de regressão de Cox (Tabela 26).

O aumento da expressão do miR-421 apresentou tendência a correlação com SLR ($p=0,051$) e SCE ($p=0,050$) e a redução de expressão do miR-31-3p com SCE (0,091) e SG ($p=0,064$).

Tabela 24 – Associação entre sobrevida livre de recorrência através do teste de log-rank e o cálculo do HR com IC de 95% por regressão de Cox para os níveis de expressão de cada miRNA avaliado, considerando a amostra total de casos com CaPe (n=24).

miRNAs	Expressão (mediana -dCT)	p log-rank	HR (95% IC)	p*
miR-421	baixa expressão ($\leq -4,26$)	0,051	1 (Ref)	0,544
	alta expressão ($> -4,26$)		1,93 (0,23-16,19)	
miR-744-5p	baixa expressão ($\leq -2,62$)	0,273	1 (Ref)	0,941
	alta expressão ($> 2,62$)		0,61 (0,12-3,19)	
miR-152-3p	baixa expressão ($\leq -0,68$)	0,553	1 (Ref)	0,583
	alta expressão ($> -0,68$)		0,66 (0,15-2,94)	
miR-196b-5p	baixa expressão ($\leq -3,07$)	0,661	1 (Ref)	0,673
	alta expressão ($> -3,07$)		0,72 (0,16-3,25)	
miR-181c-5p	baixa expressão ($\leq 0,33$)	0,657	1 (Ref)	0,698
	alta expressão ($> 0,33$)		1,35 (0,30-6,05)	
miR-149-5p	baixa expressão ($\leq -1,38$)	0,528	1 (Ref)	0,987
	alta expressão ($> -1,38$)		1,01 (0,23-4,56)	
miR-200a-5p	baixa expressão ($\leq -3,96$)	0,630	1 (Ref)	0,755
	alta expressão ($> -3,96$)		0,79 (0,17-3,55)	
miR-31-3p	baixa expressão ($\leq 3,45$)	0,104	1 (Ref)	0,207
	alta expressão ($> 3,45$)		0,34 (0,07-1,80)	
miR-31-5p	baixa expressão ($\leq 4,22$)	0,449	1 (Ref)	0,755
	alta expressão ($> 4,22$)		0,79 (0,17-3,55)	
miR-30a-5p	baixa expressão ($\leq -0,13$)	0,258	1 (Ref)	0,169
	alta expressão ($> -0,13$)		3,18 (0,61-16,51)	
miR-224-5p	baixa expressão ($\leq 1,68$)	0,557	1 (Ref)	0,604
	alta expressão ($> 1,68$)		0,67 (0,15-3,02)	
miR-432-5p	baixa expressão ($\leq -5,33$)	0,685	1 (Ref)	0,624
	alta expressão ($> -5,33$)		0,43 (0,15-3,08)	
miR-487b-3p	baixa expressão ($\leq -4,09$)	0,712	1 (Ref)	0,566
	alta expressão ($> -4,09$)		0,64 (0,14-2,89)	
miR-145-5p	baixa expressão ($\leq -2,35$)	0,719	1 (Ref)	0,523
	alta expressão ($> -2,35$)		1,64 (0,36-7,48)	

N: número de indivíduos; HR: *Hazard ratio*; IC: Intervalo de Confiança; * ajustado para metástase linfonodal.

Tabela 25 – Associação entre sobrevida câncer específica através do teste de log-rank e o cálculo do HR com IC de 95% por regressão de Cox para os níveis de expressão de cada miRNA avaliado, considerando a amostra total de casos com CaPe (n=24).

miRNAs	Expressão (mediana -dCT)	p log-rank	HR (95% IC)	p*
miR-421	baixa expressão ($\leq -4,26$)	0,050	1 (Ref)	0,425
	alta expressão ($> -4,26$)		2,40 (0,28-20,65)	
miR-744-5p	baixa expressão ($\leq -2,62$)	0,285	1 (Ref)	0,366
	alta expressão ($> 2,62$)		0,45 (0,08-2,55)	
miR-152-3p	baixa expressão ($\leq -0,68$)	0,563	1 (Ref)	0,281
	alta expressão ($> -0,68$)		0,38 (0,07-2,13)	
miR-196b-5p	baixa expressão ($\leq -3,07$)	0,622	1 (Ref)	0,594
	alta expressão ($> -3,07$)		0,65 (0,13-3,15)	
miR-181c-5p	baixa expressão ($\leq 0,33$)	0,733	1 (Ref)	0,750
	alta expressão ($> 0,33$)		1,29 (0,27-6,12)	
miR-149-5p	baixa expressão ($\leq -1,38$)	0,572	1 (Ref)	0,771
	alta expressão ($> -1,38$)		0,79 (0,16-3,85)	
miR-200a-5p	baixa expressão ($\leq -3,96$)	0,615	1 (Ref)	0,340
	alta expressão ($> -3,96$)		0,44 (0,81-2,38)	
miR-31-3p	baixa expressão ($\leq 3,45$)	0,091	1 (Ref)	0,124
	alta expressão ($> 3,45$)		0,23 (0,03-1,50)	
miR-31-5p	baixa expressão ($\leq 4,22$)	0,436	1 (Ref)	0,340
	alta expressão ($> 4,22$)		0,44 (0,08-2,38)	
miR-30a-5p	baixa expressão ($\leq -0,13$)	0,218	1 (Ref)	0,254
	alta expressão ($> -0,13$)		3,07 (0,45-21,13)	
miR-224-5p	baixa expressão ($\leq 1,68$)	0,463	1 (Ref)	0,069
	alta expressão ($> 1,68$)		0,11 (0,01-1,19)	
miR-432-5p	baixa expressão ($\leq -5,33$)	0,587	1 (Ref)	0,339
	alta expressão ($> -5,33$)		0,43 (0,08-2,42)	
miR-487b-3p	baixa expressão ($\leq -4,09$)	0,668	1 (Ref)	0,077
	alta expressão ($> -4,09$)		0,10 (0,01-1,28)	
miR-145-5p	baixa expressão ($\leq -2,35$)	0,673	1 (Ref)	0,969
	alta expressão ($> -2,35$)		0,97 (0,20-4,67)	

N: número de indivíduos; HR: *Hazard ratio*; IC: Intervalo de Confiança; * ajustado para invasão perineural e metástase linfonodal.

Tabela 26 – Associação entre sobrevida global através do teste de log-rank e o cálculo do HR com IC de 95% por regressão de Cox para os níveis de expressão de cada miRNA avaliado, considerando a amostra total de casos com CaPe (n=24).

miRNAs	Expressão (mediana -dCT)	p log-rank	HR (95% IC)	p
miR-421	baixa expressão ($\leq -4,26$)	0,038*	1 (Ref)	0,058
	alta expressão ($> -4,26$)		4,50 (0,95-21,33)	
miR-744-5p	baixa expressão ($\leq -2,62$)	0,560	1 (Ref)	0,562
	alta expressão ($> 2,62$)		1,45 (0,41-5,17)	
miR-152-3p	baixa expressão ($\leq -0,68$)	0,341	1 (Ref)	0,349
	alta expressão ($> -0,68$)		0,54 (0,15-1,94)	
miR-196b-5p	baixa expressão ($\leq -3,07$)	0,463	1 (Ref)	0,467
	alta expressão ($> -3,07$)		1,60 (0,45-5,67)	
miR-181c-5p	baixa expressão ($\leq 0,33$)	0,965	1 (Ref)	0,965
	alta expressão ($> 0,33$)		0,97 (0,28-3,37)	
miR-149-5p	baixa expressão ($\leq -1,38$)	0,705	1 (Ref)	0,706
	alta expressão ($> -1,38$)		0,78 (0,22-2,78)	
miR-200a-5p	baixa expressão ($\leq -3,96$)	0,483	1 (Ref)	0,486
	alta expressão ($> -3,96$)		0,64 (0,18-2,26)	
miR-31-3p	baixa expressão ($\leq 3,45$)	0,064	1 (Ref)	0,081
	alta expressão ($> 3,45$)		0,30 (0,08-1,16)	
miR-31-5p	baixa expressão ($\leq 4,22$)	0,296	1 (Ref)	0,305
	alta expressão ($> 4,22$)		0,51 (0,15-1,83)	
miR-30a-5p	baixa expressão ($\leq -0,13$)	0,154	1 (Ref)	0,170
	alta expressão ($> -0,13$)		2,58 (0,67-10,03)	
miR-224-5p	baixa expressão ($\leq 1,68$)	0,349	1 (Ref)	0,356
	alta expressão ($> 1,68$)		0,55 (0,15-1,96)	
miR-432-5p	baixa expressão ($\leq -5,33$)	0,378	1 (Ref)	0,384
	alta expressão ($> -5,33$)		1,76 (0,49-6,28)	
miR-487b-3p	baixa expressão ($\leq -4,09$)	0,477	1 (Ref)	0,481
	alta expressão ($> -4,09$)		1,58 (0,44-5,60)	
miR-145-5p	baixa expressão ($\leq -2,35$)	0,575	1 (Ref)	0,577
	alta expressão ($> -2,35$)		1,43 (0,40-5,09)	

N: número de indivíduos; HR: *Hazard ratio*; IC: Intervalo de Confiança

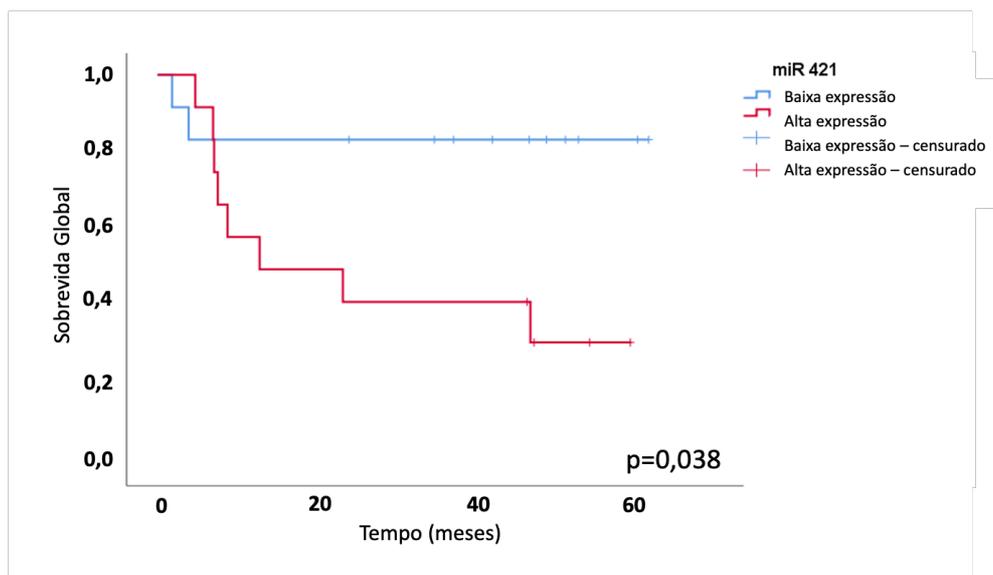


Figura 23 – Sobrevida global de acordo com a expressão do miR-421. Curva de Kaplan-Meier mostra que a alta expressão do miR-421 está associada com menor sobrevida global.

4.6.2 Associação entre os níveis de expressão dos genes selecionados com SLR, SCE e SG

Buscamos a associação dos 83 transcritos com a curva de SLR, SCE e SG. As Figuras 24 e 25 apresentam as associações estatisticamente significantes das curvas de sobrevidas entre a expressão dos transcritos (teste log-rank) e SLR e SCE. Observamos que a alta expressão dos genes *CCND1*, *EGFR*, *GADD45A*, *MYC*, *SNAI2* e *SRC* foram associadas ao menor tempo de SLR e SCE ($p < 0,05$). De forma oposta, a baixa expressão dos genes *CDH1*, *CDKN1*, *KLF4* e *TP63* foram associadas a menor SLR e SCE ($p < 0,05$).

Em seguida, calculamos os valores de HR e IC 95% para os níveis de expressão de cada um dos genes, estimando a magnitude de seus efeitos na sobrevida específica, com ajuste para metástase linfonodal na SLR e SCE e invasão perineural e metástase linfonodal para SCE (variáveis significativamente associadas às curvas de sobrevida na análise univariada) (Tabelas 27 e 28). Após ajuste, a alta expressão do gene *CDKN2A* aumentou em quatro vezes o risco de recidiva pelo modelo de Cox com $p = 0,042$ (tabela 27); e a alta expressão dos genes *CDKN2A* ($p = 0,018$), *GADD45A* ($p = 0,025$) e o *NRP1* ($p = 0,042$) aumentaram em 10, 20 e 7 vezes o risco de morte por CaPe pelo modelo de Cox, respectivamente (tabela 28).

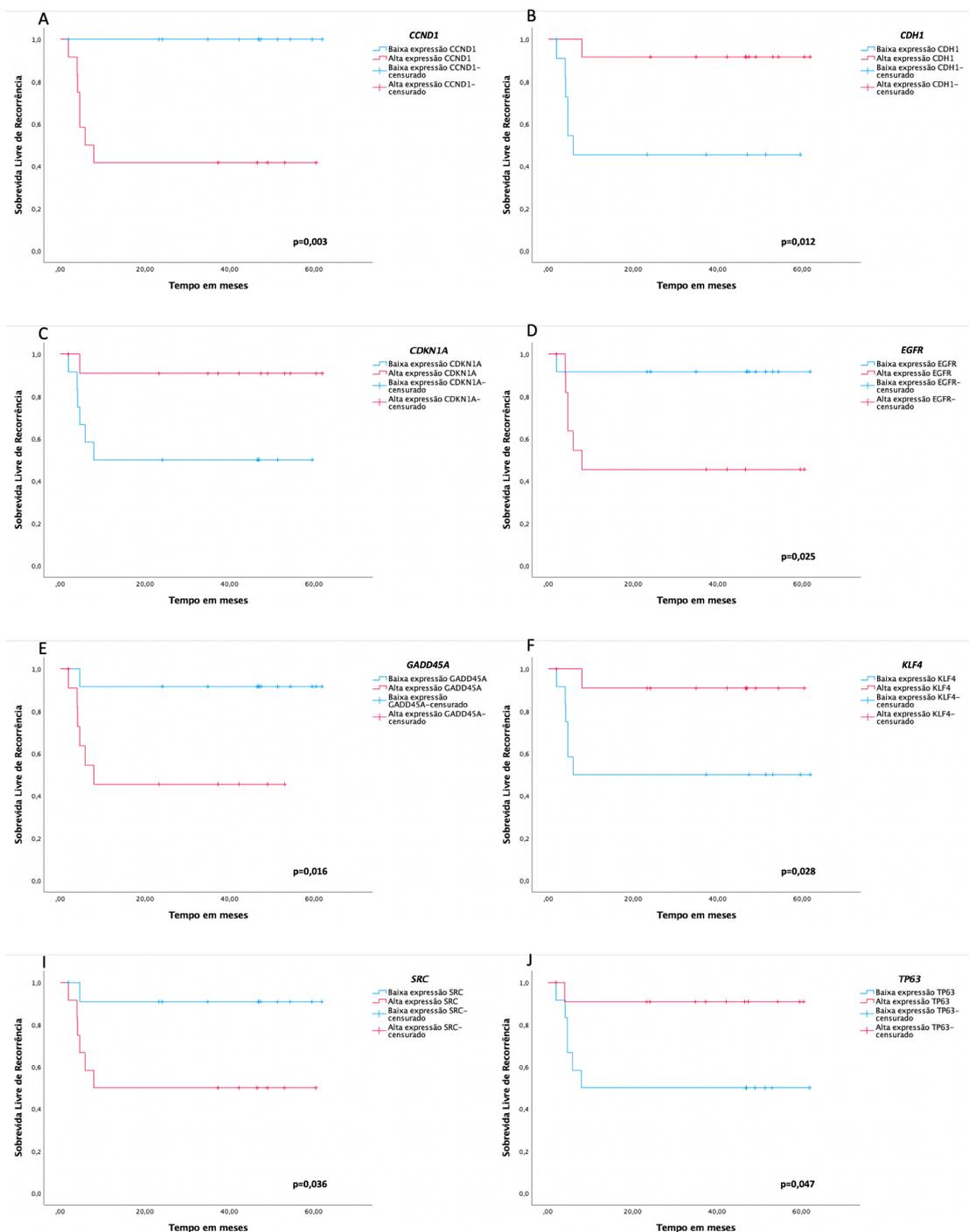


Figura 24 – Curvas de sobrevivida livre de recorrência de acordo com a expressão dos genes. A) *CCND1*; B) *CDH1*; C) *CDKN1A*; D) *EGFR*; E) *GADD45A*; F) *KLF4*; G) *MYC*; H) *SNAI2*; I) *SRC*; e J) *TP63*. Teste de log-rank.

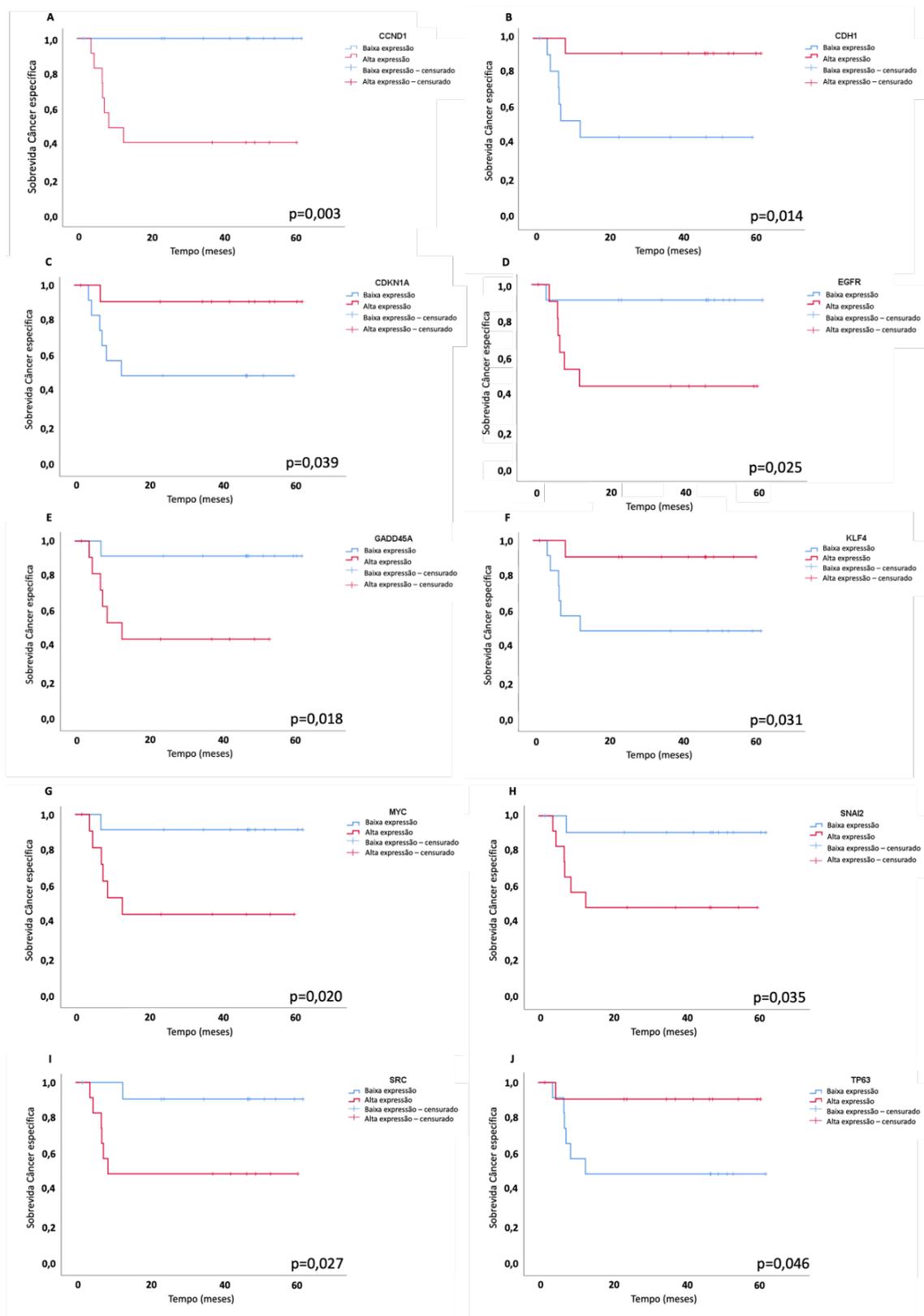


Figura 25 – Curvas de sobrevida câncer específica de acordo com a expressão dos genes. **A)** *CCND1*; **B)** *CDH1*; **C)** *CDKN1A*; **D)** *EGFR*; **E)** *GADD45A*; **F)** *KLF4*; **G)** *MYC*; **H)** *SNAI2*; **I)** *SRC*; e **J)** *TP63*. Teste de log-rank.

Tabela 27 – Associação entre sobrevida livre de recorrência através do teste de log-rank e o cálculo do HR com IC de 95% por regressão de Cox com os níveis de expressão dos genes escolhidos, considerando a amostra total de casos com CaPe (n=24).

Transcritos	Expressão (mediana -dCT)	p log-rank	HR (95% IC)	p**
<i>ABCB1</i>	baixa expressão ($\leq -9,84$) alta expressão ($> -9,84$)	0,222	1 (Ref) 0,44 (0,08-2,27)	0,325
<i>AKT1</i>	baixa expressão ($\leq -4,80$) alta expressão ($> -4,80$)	0,376	1 (Ref) 1,00 (0,22-4,48)	0,999
<i>ALDH1A1</i>	baixa expressão ($\leq -8,60$) alta expressão ($> -8,60$)	0,657	1 (Ref) 1,35 (0,30-6,05)	0,698
<i>ATM</i>	baixa expressão ($\leq -6,10$) alta expressão ($> -6,10$)	0,546	1 (Ref) 1,60 (0,35-7,23)	0,542
<i>BAX</i>	baixa expressão ($\leq -5,85$) alta expressão ($> -5,85$)	0,477	1 (Ref) 1,87 (0,42-8,39)	0,415
<i>BBC3</i>	baixa expressão ($\leq -10,33$) alta expressão ($> -10,33$)	0,681	1 (Ref) 0,87 (0,19-3,94)	0,860
<i>BCL2</i>	baixa expressão ($\leq -9,25$) alta expressão ($> -9,25$)	0,546	1 (Ref) 2,68 (0,58-12,41)	0,208
<i>CCND1</i>	baixa expressão ($\leq -6,0$) alta expressão ($> -6,0$)	0,003*	1 (Ref) 33,33 (0,11-9926,25)	0,228
<i>CD274</i>	baixa expressão ($\leq -8,31$) alta expressão ($> -8,31$)	0,953	1 (Ref) 3,37 (0,72-15,76)	0,122
<i>CD44</i>	baixa expressão ($\leq -2,81$) alta expressão ($> -2,81$)	0,574	1 (Ref) 1,48 (0,33-6,74)	0,609
<i>CDH1</i>	baixa expressão ($\leq -4,27$) alta expressão ($> -4,27$)	0,012*	1 (Ref) 0,18 (0,02-1,56)	0,120
<i>CDH2</i>	baixa expressão ($\leq -10,78$) alta expressão ($> -10,78$)	0,121	1 (Ref) 2,28 (0,43-11,91)	0,330
<i>CDKN1A</i>	baixa expressão ($\leq -3,37$) alta expressão ($> -3,37$)	0,036*	1 (Ref) 0,38 (0,05-3,21)	0,378
<i>CDKN2A</i>	baixa expressão ($\leq -6,47$) alta expressão ($> -6,47$)	0,429	1 (Ref) 4,84 (1,06-22,09)	0,042*
<i>CEBPB</i>	baixa expressão ($\leq -3,68$) alta expressão ($> -3,68$)	0,805	1 (Ref) 1,21 (0,27-5,44)	0,808
<i>CXCR4</i>	baixa expressão ($\leq -5,33$) alta expressão ($> -5,33$)	0,523	1 (Ref) 2,82 (0,61-12,98)	0,183
<i>DKK1</i>	baixa expressão ($\leq -8,83$) alta expressão ($> -8,83$)	0,243	1 (Ref) 2,10 (0,41-10,84)	0,377
<i>DNMT1</i>	baixa expressão ($\leq -5,45$) alta expressão ($> -5,45$)	0,661	1 (Ref) 1,71 (0,26-5,25)	0,837
<i>EGFR</i>	baixa expressão ($\leq -4,34$) alta expressão ($> -4,34$)	0,025*	1 (Ref) 1,93 (0,23-16,19)	0,544
<i>EGR1</i>	baixa expressão ($\leq -5,09$) alta expressão ($> -5,09$)	0,712	1 (Ref) 0,95 (0,21-4,25)	0,946
<i>ENTPD5</i>	baixa expressão ($\leq -6,83$) alta expressão ($> -6,83$)	0,142	1 (Ref) 0,80 (0,15-4,15)	0,787
<i>ESRP1</i>	baixa expressão ($\leq -3,91$) alta expressão ($> -3,91$)	0,859	1 (Ref) 0,42 (0,09-1,91)	0,264
<i>FGF2</i>	baixa expressão ($\leq -8,75$) alta expressão ($> -8,75$)	0,127	1 (Ref) 3,87 (0,74-20,16)	0,108
<i>FOS</i>	baixa expressão ($\leq -4,55$) alta expressão ($> -4,55$)	0,606	1 (Ref) 2,16 (0,48-9,76)	0,316
<i>GADD45A</i>	baixa expressão ($\leq -5,62$) alta expressão ($> -5,62$)	0,016*	1 (Ref) 7,08 (0,84-59,57)	0,072
<i>HIF1A</i>	baixa expressão ($\leq -2,49$) alta expressão ($> -2,49$)	0,142	1 (Ref) 2,31 (0,43-12,32)	0,325
<i>HOXA9</i>	baixa expressão ($\leq -8,81$) alta expressão ($> -8,81$)	0,631	1 (Ref) 0,46 (0,10-2,07)	0,309

Tabela 27 – continuação

Transcritos	Expressão (mediana -dCT)	p log-rank	HR (95% IC)	p**
<i>HOXA10</i>	baixa expressão ($\leq -8,77$)	0,082	1 (Ref)	0,377
	alta expressão ($> -8,77$)		2,10 (0,41-10,84)	
<i>IGF1R</i>	baixa expressão ($\leq -5,75$)	0,546	1 (Ref)	0,514
	alta expressão ($> -5,75$)		0,61 (0,13-2,72)	
<i>IL1A</i>	baixa expressão ($\leq -5,86$)	0,636	1 (Ref)	0,999
	alta expressão ($> -5,86$)		1,00 (0,22-4,95)	
<i>IL1B</i>	baixa expressão ($\leq -5,12$)	0,606	1 (Ref)	0,702
	alta expressão ($> -5,12$)		1,34 (0,30-6,02)	
<i>IL6</i>	baixa expressão ($\leq -7,06$)	0,125	1 (Ref)	0,350
	alta expressão ($> -7,06$)		2,20 (0,42-11,52)	
<i>JUN</i>	baixa expressão ($\leq -4,45$)	0,517	1 (Ref)	0,469
	alta expressão ($> -4,45$)		1,75 (0,38-8,04)	
<i>KAT6A</i>	baixa expressão ($\leq -5,47$)	0,746	1 (Ref)	0,469
	alta expressão ($> -5,47$)		1,75 (0,39-7,95)	
<i>KLF4</i>	baixa expressão ($\leq -3,75$)	0,028*	1 (Ref)	0,278
	alta expressão ($> -3,75$)		0,31 (0,04-2,60)	
<i>KMT2A</i>	baixa expressão ($\leq -6,33$)	0,804	1 (Ref)	0,702
	alta expressão ($> -6,33$)		0,75 (0,17-3,35)	
<i>KMT2D</i>	baixa expressão ($\leq -6,33$)	0,681	1 (Ref)	0,428
	alta expressão ($> -6,33$)		0,52 (0,12-2,47)	
<i>KRAS</i>	baixa expressão ($\leq -4,34$)	0,955	1 (Ref)	0,583
	alta expressão ($> -4,34$)		0,66 (0,15-2,94)	
<i>LATS2</i>	baixa expressão ($\leq -7,40$)	0,104	1 (Ref)	0,487
	alta expressão ($> -7,40$)		1,79 (0,35-9,32)	
<i>LIN28A</i>	baixa expressão ($\leq -10,04$)	0,685	1 (Ref)	0,452
	alta expressão ($> -10,04$)		1,78 (0,40-8,02)	
<i>MCM2</i>	baixa expressão ($\leq -6,37$)	0,235	1 (Ref)	0,325
	alta expressão ($> -6,37$)		0,43 (0,08-2,30)	
<i>MDM2</i>	baixa expressão ($\leq -5,02$)	0,606	1 (Ref)	0,709
	alta expressão ($> -5,02$)		1,33 (0,30-5,98)	
<i>MLH1</i>	baixa expressão ($\leq -6,03$)	0,546	1 (Ref)	0,999
	alta expressão ($> -6,03$)		1,00 (0,22-4,48)	
<i>MMP1</i>	baixa expressão ($\leq -2,37$)	0,712	1 (Ref)	0,946
	alta expressão ($> -2,37$)		0,95 (0,23-4,72)	
<i>MMP12</i>	baixa expressão ($\leq -4,61$)	0,738	1 (Ref)	0,514
	alta expressão ($> -4,61$)		1,65 (0,37-7,38)	
<i>MMP9</i>	baixa expressão ($\leq -6,70$)	0,273	1 (Ref)	0,563
	alta expressão ($> -6,70$)		1,63 (0,31-8,45)	
<i>MYC</i>	baixa expressão ($\leq -4,39$)	0,014*	1 (Ref)	0,330
	alta expressão ($> -4,39$)		2,88 (0,34-24,09)	
<i>MYD88</i>	baixa expressão ($\leq -5,65$)	0,273	1 (Ref)	0,189
	alta expressão ($> -5,65$)		0,33 (0,06-1,72)	
<i>NANOG</i>	baixa expressão ($\leq -8,15$)	0,746	1 (Ref)	0,952
	alta expressão ($> -8,15$)		1,05 (0,23-4,70)	
<i>NES</i>	baixa expressão ($\leq -11,00$)	0,100	1 (Ref)	0,050
	alta expressão ($> -11,00$)		9,11 (1,00-82,77)	
<i>NOTCH1</i>	baixa expressão ($\leq -6,97$)	0,546	1 (Ref)	0,542
	alta expressão ($> -6,97$)		1,60 (0,35-7,23)	
<i>NOTCH4</i>	baixa expressão ($\leq -9,78$)	0,661	1 (Ref)	0,673
	alta expressão ($> -9,78$)		0,72 (0,16-3,25)	
<i>NRP1</i>	baixa expressão ($\leq -4,90$)	0,127	1 (Ref)	0,108
	alta expressão ($> -4,90$)		3,87 (0,74-20,16)	
<i>PEBP1</i>	baixa expressão ($\leq -4,13$)	0,661	1 (Ref)	0,837
	alta expressão ($> -4,13$)		1,17 (0,26-5,25)	
<i>PITX2</i>	baixa expressão ($\leq -8,94$)	0,553	1 (Ref)	0,583
	alta expressão ($> -8,94$)		0,66 (0,15-2,94)	

Tabela 27 – continuação

Transcritos	Expressão (mediana -dCT)	p log-rank	HR (95% IC)	p**
<i>PMAIP1</i>	baixa expressão ($\leq -7,77$)	0,528	1 (Ref)	0,207
	alta expressão ($> -7,77$)		2,63 (0,59-11,82)	
<i>PPARGC1A</i>	baixa expressão ($\leq -10,81$)	0,763	1 (Ref)	0,554
	alta expressão ($> -10,81$)		1,72 (0,28-10,47)	
<i>PTEN</i>	baixa expressão ($\leq -2,47$)	0,240	1 (Ref)	0,359
	alta expressão ($> -2,47$)		0,46 (0,09-2,40)	
<i>Rb1</i>	baixa expressão ($\leq -4,89$)	0,471	1 (Ref)	0,801
	alta expressão ($> -4,89$)		1,21 (0,27-5,45)	
<i>RECK</i>	baixa expressão ($\leq -7,57$)	0,449	1 (Ref)	0,353
	alta expressão ($> -7,57$)		2,04 (0,45-9,25)	
<i>RIPK3</i>	baixa expressão ($\leq -8,36$)	0,746	1 (Ref)	0,952
	alta expressão ($> -8,36$)		1,05 (0,23-4,70)	
<i>RHOA</i>	baixa expressão ($\leq -2,68$)	0,719	1 (Ref)	0,207
	alta expressão ($> -2,68$)		0,38 (0,09-1,71)	
<i>SAV1</i>	baixa expressão ($\leq -5,97$)	0,123	1 (Ref)	0,267
	alta expressão ($> -5,97$)		2,56 (0,49-13,50)	
<i>SESN2</i>	baixa expressão ($\leq -7,27$)	0,243	1 (Ref)	0,760
	alta expressão ($> -7,27$)		0,77 (0,15-4,01)	
<i>SFN</i>	baixa expressão ($\leq -0,25$)	0,805	1 (Ref)	0,808
	alta expressão ($> -0,25$)		1,21 (0,27-5,44)	
<i>SNAI1</i>	baixa expressão ($\leq -8,21$)	0,258	1 (Ref)	0,169
	alta expressão ($> -8,21$)		3,18 (0,61-16,51)	
<i>SNAI2</i>	baixa expressão ($\leq -3,23$)	0,043*	1 (Ref)	0,460
	alta expressão ($> -3,23$)		2,22 (0,27-18,56)	
<i>SOX2</i>	baixa expressão ($\leq -6,55$)	0,712	1 (Ref)	0,498
	alta expressão ($> -6,55$)		0,59 (0,13-2,68)	
<i>SRC</i>	baixa expressão ($\leq -6,15$)	0,036*	1 (Ref)	0,176
	alta expressão ($> -6,15$)		4,33 (0,52-36,20)	
<i>STAT3</i>	baixa expressão ($\leq -2,89$)	0,226	1 (Ref)	0,680
	alta expressão ($> -2,89$)		0,71 (0,14-3,66)	
<i>STK4</i>	baixa expressão ($\leq -5,60$)	0,654	1 (Ref)	0,709
	alta expressão ($> -5,60$)		1,33 (0,30-5,97)	
<i>TCF7L2</i>	baixa expressão ($\leq -6,29$)	0,171	1 (Ref)	0,452
	alta expressão ($> -6,29$)		1,88 (0,36-9,73)	
<i>TGFB1</i>	baixa expressão ($\leq -3,59$)	0,893	1 (Ref)	0,896
	alta expressão ($> -3,59$)		1,11 (0,25-4,96)	
<i>TIGAR</i>	baixa expressão ($\leq -4,98$)	0,051	1 (Ref)	0,111
	alta expressão ($> -4,98$)		0,17 (0,02-1,49)	
<i>TLR4</i>	baixa expressão ($\leq -6,63$)	0,980	1 (Ref)	0,264
	alta expressão ($> -6,63$)		2,37 (0,52-10,75)	
<i>TNFRSF1A</i>	baixa expressão ($\leq -4,54$)	0,636	1 (Ref)	0,783
	alta expressão ($> -4,54$)		1,23 (0,27-5,54)	
<i>TP53</i>	baixa expressão ($\leq -5,63$)	0,980	1 (Ref)	0,918
	alta expressão ($> -5,63$)		1,08 (0,24-4,89)	
<i>TP53I3</i>	baixa expressão ($\leq -7,00$)	0,181	1 (Ref)	0,929
	alta expressão ($> -7,00$)		1,08 (0,21-5,58)	
<i>TP63</i>	baixa expressão ($\leq -1,07$)	0,047*	1 (Ref)	0,102
	alta expressão ($> -1,07$)		0,17 (0,02-1,42)	
<i>TWIST1</i>	baixa expressão ($\leq -7,51$)	0,127	1 (Ref)	0,298
	alta expressão ($> -7,51$)		2,40 (0,46-12,45)	
<i>VEGFA</i>	baixa expressão ($\leq -4,70$)	0,213	1 (Ref)	0,636
	alta expressão ($> -4,70$)		0,67 (0,13-3,49)	
<i>WNT5a</i>	baixa expressão ($\leq -6,63$)	0,837	1 (Ref)	0,727
	alta expressão ($> -6,63$)		1,31 (0,29-5,91)	
<i>ZEB1</i>	baixa expressão ($\leq -6,19$)	0,804	1 (Ref)	0,815
	alta expressão ($> -6,19$)		1,20 (0,27-5,39)	

N: número de indivíduos; HR: Hazard ratio; IC: Intervalo de Confiança; * p<0,05; ** p ajustado para metástase

Tabela 28 – Associação entre sobrevida câncer específica através do teste de log-rank e o cálculo do HR com IC de 95% por regressão de Cox com os níveis de expressão dos genes escolhidos, considerando a amostra total de casos com CaPe (n=24).

Transcritos	Expressão (mediana -dCT)	p log-rank	HR (95% IC)	p**
<i>ABCB1</i>	baixa expressão ($\leq -9,84$)	0,236	1 (Ref)	0,278
	alta expressão ($> -9,84$)		0,40 (0,08-2,09)	
<i>AKT1</i>	baixa expressão ($\leq -4,80$)	0,341	1 (Ref)	0,803
	alta expressão ($> -4,80$)		0,82 (0,17-3,95)	
<i>ALDH1A1</i>	baixa expressão ($\leq -8,60$)	0,733	1 (Ref)	0,750
	alta expressão ($> -8,60$)		1,29 (0,27-6,12)	
<i>ATM</i>	baixa expressão ($\leq -6,10$)	0,505	1 (Ref)	0,923
	alta expressão ($> -6,10$)		1,09 (0,20-5,94)	
<i>BAX</i>	baixa expressão ($\leq -5,85$)	0,442	1 (Ref)	0,053
	alta expressão ($> -5,85$)		10,23 (0,97-107,56)	
<i>BBC3</i>	baixa expressão ($\leq -10,33$)	0,792	1 (Ref)	0,250
	alta expressão ($> -10,33$)		3,19 (0,45-22,89)	
<i>BCL2</i>	baixa expressão ($\leq -9,25$)	0,505	1 (Ref)	0,200
	alta expressão ($> -9,25$)		3,00 (0,56-16,08)	
<i>CCND1</i>	baixa expressão ($\leq -6,0$)	0,003*	1 (Ref)	0,068
	alta expressão ($> -6,0$)		115,14 (0,71-18810,10)	
<i>CD274</i>	baixa expressão ($\leq -8,31$)	0,879	1 (Ref)	0,210
	alta expressão ($> -8,31$)		2,75 (0,57-13,79)	
<i>CD44</i>	baixa expressão ($\leq -2,81$)	0,541	1 (Ref)	0,159
	alta expressão ($> -2,81$)		3,83 (0,59-24,86)	
<i>CDH1</i>	baixa expressão ($\leq -4,27$)	0,014*	1 (Ref)	0,219
	alta expressão ($> -4,27$)		0,25 (0,03-2,25)	
<i>CDH2</i>	baixa expressão ($\leq -10,78$)	0,146	1 (Ref)	0,125
	alta expressão ($> -10,78$)		4,69 (0,65-33,73)	
<i>CDKN1A</i>	baixa expressão ($\leq -3,37$)	0,039*	1 (Ref)	0,669
	alta expressão ($> -3,37$)		0,61 (0,07-5,74)	
<i>CDKN2A</i>	baixa expressão ($\leq -6,47$)	0,389	1 (Ref)	0,018*
	alta expressão ($> -6,47$)		10,40 (1,51-71,82)	
<i>CEBPB</i>	baixa expressão ($\leq -3,68$)	0,755	1 (Ref)	0,973
	alta expressão ($> -3,68$)		1,03 (0,23-4,63)	
<i>CXCR4</i>	baixa expressão ($\leq -5,33$)	0,568	1 (Ref)	0,141
	alta expressão ($> -5,33$)		3,40 (0,67-17,31)	
<i>DKK1</i>	baixa expressão ($\leq -8,83$)	0,224	1 (Ref)	0,221
	alta expressão ($> -8,83$)		2,84 (0,53-15,11)	
<i>DNMT1</i>	baixa expressão ($\leq -5,45$)	0,534	1 (Ref)	0,646
	alta expressão ($> -5,45$)		1,43 (0,31-6,61)	
<i>EGFR</i>	baixa expressão ($\leq -4,34$)	0,025*	1 (Ref)	0,425
	alta expressão ($> -4,34$)		2,40 (0,28-20,65)	
<i>EGR1</i>	baixa expressão ($\leq -5,09$)	0,668	1 (Ref)	0,506
	alta expressão ($> -5,09$)		0,57 (0,11-2,99)	
<i>ENTPD5</i>	baixa expressão ($\leq -6,83$)	0,153	1 (Ref)	0,169
	alta expressão ($> -6,83$)		0,17 (0,01-2,15)	
<i>ESRP1</i>	baixa expressão ($\leq -3,91$)	0,941	1 (Ref)	0,08
	alta expressão ($> -3,91$)		0,19 (0,03-1,21)	
<i>FGF2</i>	baixa expressão ($\leq -8,75$)	0,111	1 (Ref)	0,176
	alta expressão ($> -8,75$)		3,61 (0,56-23,06)	
<i>FOS</i>	baixa expressão ($\leq -4,55$)	0,624	1 (Ref)	0,388
	alta expressão ($> -4,55$)		1,94 (0,43-8,74)	
<i>GADD45A</i>	baixa expressão ($\leq -5,62$)	0,018*	1 (Ref)	0,025*
	alta expressão ($> -5,62$)		20,89 (1,47-297,0)	
<i>HIF1A</i>	baixa expressão ($\leq -2,49$)	0,153	1 (Ref)	0,575
	alta expressão ($> -2,49$)		1,63 (0,29-9,00)	
<i>HOXA9</i>	baixa expressão ($\leq -8,81$)	0,649	1 (Ref)	0,274
	alta expressão ($> -8,81$)		0,41 (0,09-2,01)	

Tabela 28 – continuação

Transcritos	Expressão (mediana -dCT)	p log-rank	HR (95% IC)	p**
<i>HOXA10</i>	baixa expressão ($\leq -8,77$)	0,071	1 (Ref)	0,582
	alta expressão ($> -8,77$)		1,64 (0,28-9,46)	
<i>IGF1R</i>	baixa expressão ($\leq -5,75$)	0,592	1 (Ref)	0,649
	alta expressão ($> -5,75$)		0,70 (0,15-3,32)	
<i>IL1A</i>	baixa expressão ($\leq -5,86$)	0,687	1 (Ref)	0,277
	alta expressão ($> -5,86$)		2,73 (0,45-16,68)	
<i>IL1B</i>	baixa expressão ($\leq -5,12$)	0,624	1 (Ref)	0,583
	alta expressão ($> -5,12$)		1,53 (0,33-6,98)	
<i>IL6</i>	baixa expressão ($\leq -7,06$)	0,099	1 (Ref)	0,065
	alta expressão ($> -7,06$)		8,75 (0,87-87,83)	
<i>JUN</i>	baixa expressão ($\leq -4,45$)	0,619	1 (Ref)	0,375
	alta expressão ($> -4,45$)		2,12 (0,40-11,21)	
<i>KAT6A</i>	baixa expressão ($\leq -5,47$)	0,855	1 (Ref)	0,223
	alta expressão ($> -5,47$)		2,85 (0,53-15,29)	
<i>KLF4</i>	baixa expressão ($\leq -3,75$)	0,031*	1 (Ref)	0,352
	alta expressão ($> -3,75$)		0,36 (0,04-3,08)	
<i>KMT2A</i>	baixa expressão ($\leq -6,33$)	0,824	1 (Ref)	0,583
	alta expressão ($> -6,33$)		0,65 (0,14-2,99)	
<i>KMT2D</i>	baixa expressão ($\leq -6,33$)	0,792	1 (Ref)	0,857
	alta expressão ($> -6,33$)		0,87 (0,19-3,99)	
<i>KRAS</i>	baixa expressão ($\leq -4,34$)	0,931	1 (Ref)	0,658
	alta expressão ($> -4,34$)		1,48 (0,26-8,42)	
<i>LATS2</i>	baixa expressão ($\leq -7,40$)	0,123	1 (Ref)	0,565
	alta expressão ($> -7,40$)		1,62 (0,31-8,46)	
<i>LIN28A</i>	baixa expressão ($\leq -10,04$)	0,587	1 (Ref)	0,136
	alta expressão ($> -10,04$)		3,97 (0,65-24,43)	
<i>MCM2</i>	baixa expressão ($\leq -6,37$)	0,249	1 (Ref)	0,575
	alta expressão ($> -6,37$)		0,61 (0,11-3,39)	
<i>MDM2</i>	baixa expressão ($\leq -5,02$)	0,561	1 (Ref)	0,772
	alta expressão ($> -5,02$)		1,25 (0,27-5,82)	
<i>MLH1</i>	baixa expressão ($\leq -6,03$)	0,505	1 (Ref)	0,803
	alta expressão ($> -6,03$)		0,82 (0,17-3,95)	
<i>MMP1</i>	baixa expressão ($\leq -2,37$)	0,668	1 (Ref)	0,890
	alta expressão ($> -2,37$)		0,90 (0,19-4,24)	
<i>MMP12</i>	baixa expressão ($\leq -4,61$)	0,789	1 (Ref)	0,145
	alta expressão ($> -4,61$)		3,59 (0,64-19,95)	
<i>MMP9</i>	baixa expressão ($\leq -6,70$)	0,231	1 (Ref)	0,207
	alta expressão ($> -6,70$)		5,32 (0,40-71,28)	
<i>MYC</i>	baixa expressão ($\leq -4,39$)	0,020*	1 (Ref)	0,327
	alta expressão ($> -4,39$)		2,92 (0,34-24,9)	
<i>MYD88</i>	baixa expressão ($\leq -5,65$)	0,285	1 (Ref)	0,300
	alta expressão ($> -5,65$)		0,41 (0,8-2,20)	
<i>NANOG</i>	baixa expressão ($\leq -8,15$)	0,855	1 (Ref)	0,425
	alta expressão ($> -8,15$)		1,98 (0,37-10,59)	
<i>NES</i>	baixa expressão ($\leq -11,00$)	0,109	1 (Ref)	0,061
	alta expressão ($> -11,00$)		5,89 (0,92-37,50)	
<i>NOTCH1</i>	baixa expressão ($\leq -6,97$)	0,505	1 (Ref)	0,923
	alta expressão ($> -6,97$)		1,09 (0,20-5,94)	
<i>NOTCH4</i>	baixa expressão ($\leq -9,78$)	0,534	1 (Ref)	0,459
	alta expressão ($> -9,78$)		0,52 (0,09-2,89)	
<i>NRP1</i>	baixa expressão ($\leq -4,90$)	0,111	1 (Ref)	0,042*
	alta expressão ($> -4,90$)		7,25 (1,07-49,17)	
<i>PEBP1</i>	baixa expressão ($\leq -4,13$)	0,534	1 (Ref)	0,646
	alta expressão ($> -4,13$)		1,43 (0,31-6,61)	
<i>PITX2</i>	baixa expressão ($\leq -8,94$)	0,563	1 (Ref)	0,281
	alta expressão ($> -8,94$)		0,40 (0,07-2,13)	

Tabela 28 – Continuação

<i>PMAIP1</i>	baixa expressão ($\leq -7,77$)	0,487	1 (Ref)	0,051
	alta expressão ($> -7,77$)		6,23 (0,99-39,23)	
<i>PPARGC1A</i>	baixa expressão ($\leq -10,81$)	0,858	1 (Ref)	0,547
	alta expressão ($> -10,81$)		2,11 (0,19-23,74)	
<i>PTEN</i>	baixa expressão ($\leq -2,47$)	0,287	1 (Ref)	0,112
	alta expressão ($> -2,47$)		0,20 (0,03-1,45)	
<i>Rb1</i>	baixa expressão ($\leq -4,89$)	0,517	1 (Ref)	0,593
	alta expressão ($> -4,89$)		0,64 (0,12-3,33)	
<i>RECK</i>	baixa expressão ($\leq -7,57$)	0,436	1 (Ref)	0,205
	alta expressão ($> -7,57$)		2,89 (0,56-14,94)	
<i>RIPK3</i>	baixa expressão ($\leq -8,36$)	0,855	1 (Ref)	0,951
	alta expressão ($> -8,36$)		0,95 (0,20-4,63)	
<i>RHOA</i>	baixa expressão ($\leq -2,68$)	0,767	1 (Ref)	0,255
	alta expressão ($> -2,68$)		0,41 (0,09-1,89)	
<i>SAV1</i>	baixa expressão ($\leq -5,97$)	0,112	1 (Ref)	0,297
	alta expressão ($> -5,97$)		2,43 (0,46-12,91)	
<i>SESN2</i>	baixa expressão ($\leq -7,27$)	0,224	1 (Ref)	0,842
	alta expressão ($> -7,27$)		0,84 (0,15-4,59)	
<i>SFN</i>	baixa expressão ($\leq -0,25$)	0,755	1 (Ref)	0,314
	alta expressão ($> -0,25$)		2,55 (0,41-15,88)	
<i>SNAI1</i>	baixa expressão ($\leq -8,21$)	0,218	1 (Ref)	0,075
	alta expressão ($> -8,21$)		5,67 (0,84-38,36)	
<i>SNAI2</i>	baixa expressão ($\leq -3,23$)	0,035*	1 (Ref)	0,212
	alta expressão ($> -3,23$)		3,98 (0,46-34,63)	
<i>SOX2</i>	baixa expressão ($\leq -6,55$)	0,668	1 (Ref)	0,323
	alta expressão ($> -6,55$)		0,44 (0,87-2,24)	
<i>SRC</i>	baixa expressão ($\leq -6,15$)	0,027*	1 (Ref)	0,055
	alta expressão ($> -6,15$)		13,92 (0,95-204,1)	
<i>STAT3</i>	baixa expressão ($\leq -2,89$)	0,239	1 (Ref)	0,409
	alta expressão ($> -2,89$)		0,49 (0,09-2,67)	
<i>STK4</i>	baixa expressão ($\leq -5,60$)	0,706	1 (Ref)	0,372
	alta expressão ($> -5,60$)		2,07 (0,42-10,28)	
<i>TCF7L2</i>	baixa expressão ($\leq -6,29$)	0,180	1 (Ref)	0,468
	alta expressão ($> -6,29$)		1,84 (0,35-9,56)	
<i>TGFB1</i>	baixa expressão ($\leq -3,59$)	0,911	1 (Ref)	0,874
	alta expressão ($> -3,59$)		1,13 (0,25-5,11)	
<i>TIGAR</i>	baixa expressão ($\leq -4,98$)	0,050	1 (Ref)	0,170
	alta expressão ($> -4,98$)		0,21 (0,02-1,93)	
<i>TLR4</i>	baixa expressão ($\leq -6,63$)	0,932	1 (Ref)	0,079
	alta expressão ($> -6,63$)		5,20 (0,83-32,80)	
<i>TNFRSF1A</i>	baixa expressão ($\leq -4,54$)	0,598	1 (Ref)	0,488
	alta expressão ($> -4,54$)		1,72 (0,37-7,93)	
<i>TP53</i>	baixa expressão ($\leq -5,63$)	0,941	1 (Ref)	0,494
	alta expressão ($> -5,63$)		1,79 (0,34-9,57)	
<i>TP53I3</i>	baixa expressão ($\leq -7,00$)	0,163	1 (Ref)	0,937
	alta expressão ($> -7,00$)		0 (0-2,05E+104)	
<i>TP63</i>	baixa expressão ($\leq -1,07$)	0,046*	1 (Ref)	0,153
	alta expressão ($> -1,07$)		0,20 (0,02-1,80)	
<i>TWIST1</i>	baixa expressão ($\leq -7,51$)	0,111	1 (Ref)	0,337
	alta expressão ($> -7,51$)		2,29 (0,42-12,34)	
<i>VEGFA</i>	baixa expressão ($\leq -4,70$)	0,191	1 (Ref)	0,520
	alta expressão ($> -4,70$)		0,58 (0,11-3,03)	
<i>WNT5a</i>	baixa expressão ($\leq -6,63$)	0,700	1 (Ref)	0,811
	alta expressão ($> -6,63$)		0,83 (0,18-3,77)	
<i>ZEB1</i>	baixa expressão ($\leq -6,19$)	0,821	1 (Ref)	0,809
	alta expressão ($> -6,19$)		0,82 (0,17-4,02)	

N: número de indivíduos; HR: Hazard ratio; IC: Intervalo de Confiança; * $p < 0,05$; ** ajustado para Invasão perineural e metástase

As mesmas correlações foram realizadas para sobrevida global. A Figura 26 apresenta a associação da expressão dos genes e a sobrevida global (teste log-rank). Observamos que a alta expressão dos genes *FGF2*, *GADD45A*, *IL6*, *MYC*, *NES* e *NRP1* e a baixa expressão do gene *CDHI* foram associadas com menor sobrevida global ($p < 0,05$).

Em seguida, calculamos os valores de HR e IC 95% para os níveis de expressão de cada um dos genes, estimando seus efeitos na sobrevida global (Tabela 29). Os genes *CDHI*, *FGF2*, *GADD45A*, *MYC*, *NES* e *NRP1* mantiveram correlação significativa na regressão de Cox ($p < 0,05$).

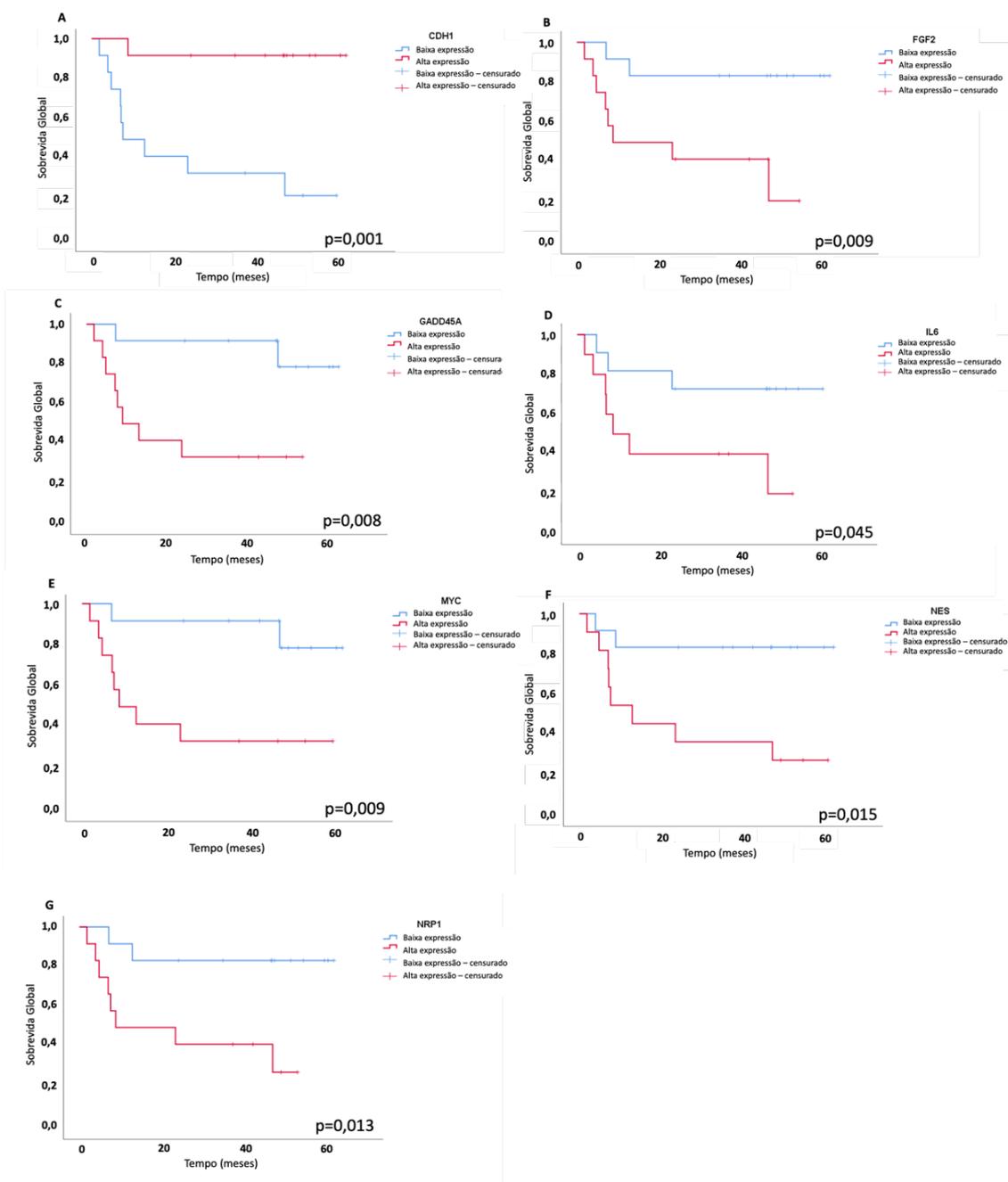


Figura 26 – Curvas de sobrevida global de acordo com o nível de expressão dos genes. A) *CDH1*; B) *FGF2*; C) *GADD45A*; D) *IL6*; E) *MYC*; F) *NES*; e G) *NRPI*. Teste de log-rank.

Tabela 29 – Associação entre sobrevida global através do teste de log-rank e o cálculo do HR com IC de 95% por regressão de Cox com os níveis de expressão dos genes escolhidos, considerando a amostra total de casos com CaPe (n=24).

Transcritos	Expressão (mediana -dCT)	p log-rank	HR (95% IC)	p
<i>ABCBI</i>	baixa expressão ($\leq -9,84$) alta expressão ($> -9,84$)	0,471	1 (Ref) 0,63 (0,18-2,24)	0,475
<i>AKT1</i>	baixa expressão ($\leq -4,80$) alta expressão ($> -4,80$)	0,180	1 (Ref) 2,33 (0,65-8,29)	0,193
<i>ALDH1A1</i>	baixa expressão ($\leq -8,60$) alta expressão ($> -8,60$)	0,979	1 (Ref) 1,02 (0,29-3,52)	0,979
<i>ATM</i>	baixa expressão ($\leq -6,10$) alta expressão ($> -6,10$)	0,342	1 (Ref) 1,83 (0,52-6,52)	0,349
<i>BAX</i>	baixa expressão ($\leq -5,85$) alta expressão ($> -5,85$)	0,269	1 (Ref) 2,01 (0,57-7,15)	0,279
<i>BBC3</i>	baixa expressão ($\leq -10,33$) alta expressão ($> -10,33$)	0,896	1 (Ref) 1,09 (0,31-3,76)	0,896
<i>BCL2</i>	baixa expressão ($\leq -9,25$) alta expressão ($> -9,25$)	0,342	1 (Ref) 1,83 (0,52-6,52)	0,349
<i>CCND1</i>	baixa expressão ($\leq -6,0$) alta expressão ($> -6,0$)	0,076	1 (Ref) 3,23 (0,82-12,64)	0,093
<i>CD274</i>	baixa expressão ($\leq -8,31$) alta expressão ($> -8,31$)	0,390	1 (Ref) 1,73 (0,49-6,14)	0,395
<i>CD44</i>	baixa expressão ($\leq -2,81$) alta expressão ($> -2,81$)	0,366	1 (Ref) 1,78 (0,50-6,31)	0,373
<i>CDH1</i>	baixa expressão ($\leq -4,27$) alta expressão ($> -4,27$)	0,001*	1 (Ref) 0,07 (0,01-0,56)	0,012*
<i>CDH2</i>	baixa expressão ($\leq -10,78$) alta expressão ($> -10,78$)	0,258	1 (Ref) 2,06 (0,57-7,36)	0,267
<i>CDKN1A</i>	baixa expressão ($\leq -3,37$) alta expressão ($> -3,37$)	0,108	1 (Ref) 0,34 (0,09-1,34)	0,124
<i>CDKN2A</i>	baixa expressão ($\leq -6,47$) alta expressão ($> -6,47$)	0,196	1 (Ref) 2,27 (0,63-8,13)	0,208
<i>CEBPB</i>	baixa expressão ($\leq -3,68$) alta expressão ($> -3,68$)	0,469	1 (Ref) 1,59 (0,45-5,64)	0,473
<i>CXCR4</i>	baixa expressão ($\leq -5,33$) alta expressão ($> -5,33$)	0,132	1 (Ref) 2,27 (0,70-10,49)	0,149
<i>DKK1</i>	baixa expressão ($\leq -8,83$) alta expressão ($> -8,83$)	0,886	1 (Ref) 1,09 (0,32-3,79)	0,886
<i>DNMT1</i>	baixa expressão ($\leq -5,45$) alta expressão ($> -5,45$)	0,323	1 (Ref) 1,88 (0,53-6,70)	0,330
<i>EGFR</i>	baixa expressão ($\leq -4,34$) alta expressão ($> -4,34$)	0,058	1 (Ref) 3,5 (0,88-13,87)	0,074
<i>EGR1</i>	baixa expressão ($\leq -5,09$) alta expressão ($> -5,09$)	0,939	1 (Ref) 0,95 (0,27-3,30)	0,939
<i>ENTPD5</i>	baixa expressão ($\leq -6,83$) alta expressão ($> -6,83$)	0,249	1 (Ref) 2,09 (0,58-7,57)	0,259
<i>ESRP1</i>	baixa expressão ($\leq -3,91$) alta expressão ($> -3,91$)	0,391	1 (Ref) 0,58 (0,16-2,06)	0,397
<i>FGF2</i>	baixa expressão ($\leq -8,75$) alta expressão ($> -8,75$)	0,009*	1 (Ref) 6,23 (1,30-29,84)	0,022*
<i>FOS</i>	baixa expressão ($\leq -4,55$) alta expressão ($> -4,55$)	0,465	1 (Ref) 1,59 (0,45-5,67)	0,469
<i>GADD45A</i>	baixa expressão ($\leq -5,62$) alta expressão ($> -5,62$)	0,008*	1 (Ref) 6,43 (1,34-30,83)	0,020*
<i>HIF1A</i>	baixa expressão ($\leq -2,49$) alta expressão ($> -2,49$)	0,072	1 (Ref) 3,31 (0,84-13,05)	0,088
<i>HOXA10</i>	baixa expressão ($\leq -8,77$) alta expressão ($> -8,77$)	0,148	1 (Ref) 2,48 (0,69-8,82)	0,162

Tabela 29 – continuação

<i>HOXA9</i>	baixa expressão ($\leq -8,81$)	0,833	1 (Ref)	0,833
	alta expressão ($> -8,81$)		1,14 (0,33-3,97)	
<i>IGF1R</i>	baixa expressão ($\leq -5,75$)	0,837	1 (Ref)	0,837
	alta expressão ($> -5,75$)		1,14 (0,33-3,94)	
<i>IL1A</i>	baixa expressão ($\leq -5,86$)	0,169	1 (Ref)	0,183
	alta expressão ($> -5,86$)		0,40 (0,10-1,55)	
<i>IL1B</i>	baixa expressão ($\leq -5,12$)	0,381	1 (Ref)	0,387
	alta expressão ($> -5,12$)		1,75 (0,49-6,25)	
<i>IL6</i>	baixa expressão ($\leq -7,06$)	0,045*	1 (Ref)	0,061
	alta expressão ($> -7,06$)		3,68 (0,94-14,36)	
<i>JUN</i>	baixa expressão ($\leq -4,45$)	0,377	1 (Ref)	0,383
	alta expressão ($> -4,45$)		1,76 (0,49-6,28)	
<i>KAT6A</i>	baixa expressão ($\leq -5,47$)	0,404	1 (Ref)	0,409
	alta expressão ($> -5,47$)		1,70 (0,48-6,05)	
<i>KLF4</i>	baixa expressão ($\leq -3,75$)	0,371	1 (Ref)	0,378
	alta expressão ($> -3,75$)		0,56 (0,16-2,01)	
<i>KMT2A</i>	baixa expressão ($\leq -6,33$)	0,924	1 (Ref)	0,924
	alta expressão ($> -6,33$)		1,06 (0,31-3,68)	
<i>KMT2D</i>	baixa expressão ($\leq -6,33$)	0,992	1 (Ref)	0,992
	alta expressão ($> -6,33$)		0,99 (0,29-3,46)	
<i>KRAS</i>	baixa expressão ($\leq -4,34$)	0,569	1 (Ref)	0,571
	alta expressão ($> -4,34$)		1,43 (0,41-4,97)	
<i>LATS2</i>	baixa expressão ($\leq -7,40$)	0,098	1 (Ref)	0,114
	alta expressão ($> -7,40$)		2,99 (0,77-11,63)	
<i>LIN28A</i>	baixa expressão ($\leq -10,04$)	0,807	1 (Ref)	0,807
	alta expressão ($> -10,04$)		1,17 (0,34-4,06)	
<i>MCM2</i>	baixa expressão ($\leq -6,37$)	0,559	1 (Ref)	0,561
	alta expressão ($> -6,37$)		0,69 (0,19-2,45)	
<i>MDM2</i>	baixa expressão ($\leq -5,02$)	0,340	1 (Ref)	0,347
	alta expressão ($> -5,02$)		1,84 (0,52-6,56)	
<i>MLH1</i>	baixa expressão ($\leq -6,03$)	0,096	1 (Ref)	0,112
	alta expressão ($> -6,03$)		3,01 (0,77-11,70)	
<i>MMP1</i>	baixa expressão ($\leq -2,37$)	0,995	1 (Ref)	0,995
	alta expressão ($> -2,37$)		1,00 (0,29-3,48)	
<i>MMP12</i>	baixa expressão ($\leq -4,61$)	0,898	1 (Ref)	0,898
	alta expressão ($> -4,61$)		1,08 (0,31-3,75)	
<i>MMP9</i>	baixa expressão ($\leq -6,70$)	0,900	1 (Ref)	0,900
	alta expressão ($> -6,70$)		0,92 (0,27-3,21)	
<i>MYC</i>	baixa expressão ($\leq -4,39$)	0,009*	1 (Ref)	0,021*
	alta expressão ($> -4,39$)		6,31 (1,31-30,29)	
<i>MYD88</i>	baixa expressão ($\leq -5,65$)	0,903	1 (Ref)	0,903
	alta expressão ($> -5,65$)		1,08 (0,31-3,77)	
<i>NANOG</i>	baixa expressão ($\leq -8,15$)	0,786	1 (Ref)	0,786
	alta expressão ($> -8,15$)		1,19 (0,34-4,13)	
<i>NES</i>	baixa expressão ($\leq -11,00$)	0,015*	1 (Ref)	0,031*
	alta expressão ($> -11,00$)		5,56 (1,17-26,37)	
<i>NOTCH1</i>	baixa expressão ($\leq -6,97$)	0,416	1 (Ref)	0,421
	alta expressão ($> -6,97$)		1,69 (0,47-6,06)	
<i>NOTCH4</i>	baixa expressão ($\leq -9,78$)	0,361	1 (Ref)	0,368
	alta expressão ($> -9,78$)		1,79 (0,50-6,36)	
<i>NRP1</i>	baixa expressão ($\leq -4,90$)	0,013*	1 (Ref)	0,027*
	alta expressão ($> -4,90$)		5,78 (1,22-27,35)	
<i>PEBP1</i>	baixa expressão ($\leq -4,13$)	0,361	1 (Ref)	0,368
	alta expressão ($> -4,13$)		1,79 (0,50-6,35)	
<i>PITX2</i>	baixa expressão ($\leq -8,94$)	0,381	1 (Ref)	0,387
	alta expressão ($> -8,94$)		0,57 (0,16-2,03)	
<i>PMAIP1</i>	baixa expressão ($\leq -7,77$)	0,682	1 (Ref)	0,683
	alta expressão ($> -7,77$)		1,30 (0,37-4,50)	

Tabela 29 – continuação

Transcritos	Expressão (mediana -dCT)	p log-rank	HR (95% IC)	p
<i>PPARGC1A</i>	baixa expressão ($\leq -10,81$)	0,355	1 (Ref)	0,363
	alta expressão ($> -10,81$)		1,95 (0,46-8,17)	
<i>PTEN</i>	baixa expressão ($\leq -2,47$)	0,516	1 (Ref)	0,519
	alta expressão ($> -2,47$)		0,66 (0,19-2,34)	
<i>Rb1</i>	baixa expressão ($\leq -4,89$)	0,710	1 (Ref)	0,711
	alta expressão ($> -4,89$)		1,27 (0,37-4,39)	
<i>RECK</i>	baixa expressão ($\leq -7,57$)	0,064	1 (Ref)	0,080
	alta expressão ($> -7,57$)		3,40 (0,86-13,39)	
<i>RIPK3</i>	baixa expressão ($\leq -8,36$)	0,404	1 (Ref)	0,409
	alta expressão ($> -8,36$)		1,70 (0,48-6,05)	
<i>RHOA</i>	baixa expressão ($\leq -2,68$)	0,973	1 (Ref)	0,973
	alta expressão ($> -2,68$)		1,02 (0,29-3,54)	
<i>SAV1</i>	baixa expressão ($\leq -5,97$)	0,077	1 (Ref)	0,094
	alta expressão ($> -5,97$)		3,18 (0,82-12,36)	
<i>SESN2</i>	baixa expressão ($\leq -7,27$)	0,437	1 (Ref)	0,442
	alta expressão ($> -7,27$)		0,61 (0,17-2,16)	
<i>SFN</i>	baixa expressão ($\leq -0,25$)	0,984	1 (Ref)	0,984
	alta expressão ($> -0,25$)		1,01 (0,29-3,51)	
<i>SNAI1</i>	baixa expressão ($\leq -8,21$)	0,176	1 (Ref)	0,191
	alta expressão ($> -8,21$)		2,47 (0,64-9,61)	
<i>SNAI2</i>	baixa expressão ($\leq -3,23$)	0,100	1 (Ref)	0,117
	alta expressão ($> -3,23$)		2,97 (0,76-11,58)	
<i>SOX2</i>	baixa expressão ($\leq -6,55$)	0,995	1 (Ref)	0,995
	alta expressão ($> -6,55$)		1,00 (0,29-0,35)	
<i>SRC</i>	baixa expressão ($\leq -6,15$)	0,279	1 (Ref)	0,288
	alta expressão ($> -6,15$)		2,00 (0,56-7,15)	
<i>STAT3</i>	baixa expressão ($\leq -2,89$)	0,911	1 (Ref)	0,911
	alta expressão ($> -2,89$)		0,93 (0,27-3,22)	
<i>STK4</i>	baixa expressão ($\leq -5,60$)	0,549	1 (Ref)	0,552
	alta expressão ($> -5,60$)		1,47 (0,41-5,21)	
<i>TCF7L2</i>	baixa expressão ($\leq -6,29$)	0,102	1 (Ref)	0,118
	alta expressão ($> -6,29$)		2,95 (0,76-11,51)	
<i>TGFB1</i>	baixa expressão ($\leq -3,59$)	0,332	1 (Ref)	0,339
	alta expressão ($> -3,59$)		0,54 (0,15-1,92)	
<i>TIGAR</i>	baixa expressão ($\leq -4,98$)	0,129	1 (Ref)	0,145
	alta expressão ($> -4,98$)		0,36 (0,09-1,42)	
<i>TLR4</i>	baixa expressão ($\leq -6,63$)	0,286	1 (Ref)	0,295
	alta expressão ($> -6,63$)		1,97 (0,55-7,01)	
<i>TNFRSF1A</i>	baixa expressão ($\leq -4,54$)	0,445	1 (Ref)	0,450
	alta expressão ($> -4,54$)		1,63 (0,46-5,79)	
<i>TP53</i>	baixa expressão ($\leq -5,63$)	0,612	1 (Ref)	0,614
	alta expressão ($> -5,63$)		1,38 (0,39-4,84)	
<i>TP53I3</i>	baixa expressão ($\leq -7,00$)	0,356	1 (Ref)	0,363
	alta expressão ($> -7,00$)		1,80 (0,51-6,41)	
<i>TP63</i>	baixa expressão ($\leq -1,07$)	0,163	1 (Ref)	0,178
	alta expressão ($> -1,07$)		0,39 (0,10-1,53)	
<i>TWIST1</i>	baixa expressão ($\leq -7,51$)	0,052	1 (Ref)	0,068
	alta expressão ($> -7,51$)		3,59 (0,91-14,11)	
<i>VEGFA</i>	baixa expressão ($\leq -4,70$)	0,395	1 (Ref)	0,400
	alta expressão ($> -4,70$)		0,58 (0,16-2,06)	
<i>WNT5a</i>	baixa expressão ($\leq -6,63$)	0,977	1 (Ref)	0,977
	alta expressão ($> -6,63$)		1,02 (0,29-3,52)	
<i>ZEB1</i>	baixa expressão ($\leq -6,19$)	0,382	1 (Ref)	0,388
	alta expressão ($> -6,19$)		1,75 (0,49-6,24)	

N: número de indivíduos; HR: Hazard ratio; IC: Intervalo de Confiança; * p<0,05

4.7 Expressão proteica

Os resultados da expressão das oito proteínas escolhidas, HOXA10, IGF1R, IL1A, MMP1, MYC, PTEN, RHOA e SNAI2, foram avaliados nos tecidos tumorais da amostra total de pacientes (N=24). Estas proteínas foram escolhidas por seus genes estarem diferencialmente expressos entre TT e TNN (*MMP1, IL1A, RHOA, PTEN*), diferencialmente expressos entre os tecidos tumorais metastático e localizado (*MYC, SNAI2, IGF1R, HOXA10*) e associações com variáveis clínicas (*MMP1, IL1A, SNAI2*). Os critérios de seleção estão descritos na tabela 4. Os anticorpos escolhidos mostraram-se difusamente expressos ou não expressos. Desta forma, realizamos a avaliação da expressão de forma qualitativa em presente ou ausente.

A positividade de expressão das proteínas nas 24 amostras de TT está apresentada na tabela 30. Nesta mesma tabela, encontra-se a associação entre a expressão das proteínas e as características clínico patológicas. Não realizamos a análise estatística da proteína IGF1R por estar presente em todas as amostras. Não encontramos nenhuma correlação significativa entre a expressão proteica e os fatores de prognóstico no CaPe. A maior presença de expressão da proteína MYC apresentou tendência a associação com tamanho tumoral $\leq 5\text{cm}$ ($p=0,08$), presença de invasão microvascular ($p=0,06$) e presença de metástase linfonodal ($p=0,10$).

Não houve associação significativa entre a expressão proteica com sobrevida câncer específica ou sobrevida global em nossa amostra, pelo teste de Log-rank (tabela 31).

Tabela 30 – Associação entre as proteínas escolhidas para análise nas 24 amostras de TT e as características clínico-patológicas (presença da expressão da proteína nos diferentes grupos).

PROTEÍNA	Grau			pT		
	G3, n=8 (%)	G1-2, n=16 (%)	p*	pT3-2, n=20 (%)	pT1, n=4 (%)	p*
HOXA10	1 (12,5)	3 (18,7)	1,00	3 (15)	1 (25)	0,54
IGF1R	8 (100)	16 (100)	-	20 (100)	4 (100)	-
IL1A	7 (87,5)	16 (100)	0,33	19 (95)	4 (100)	1,00
MMP1	2 (25)	5 (31,3)	0,75	5 (25)	2 (50)	0,55
MYC	4 (50)	8 (50)	1,00	10 (50)	2 (50)	1,00
PTEN	3 (37,5)	11 (68,7)	0,20	12 (60)	2 (50)	1,00
RHOA	6 (75)	8 (50)	0,24	11 (55)	3 (75)	0,62
SNAI2	8 (100)	15 (93,7)	1,00	19 (95)	4 (100)	1,00

PROTEÍNA	Invasão Microvascular			HPV		
	+, n=6 (%)	-, n=18(%)	p*	+, n=8 (%)	-, n=16 (%)	p*
HOXA10	1 (16,7)	3 (16,7)	1,00	0	4 (25)	1,00
IGF1R	6 (100)	18 (100)	-	8 (100)	16 (100)	-
IL1A	5 (83,3)	18 (100)	0,25	8 (100)	15 (93,7)	1,00
MMP1	1 (16,7)	6 (33,3)	0,63	2 (25)	5 (31,3)	0,75
MYC	5 (83,3)	7 (63,6)	0,06	3 (37,5)	9 (56,3)	0,67
PTEN	3 (50)	11 (61,1)	0,63	5 (62,5)	9 (56,3)	0,77
RHOA	4 (66,7)	10 (55,5)	1,00	5 (62,5)	9 (56,3)	0,77
SNAI2	6 (100)	17 (94,4)	1,00	8 (100)	15 (93,7)	1,00

PROTEÍNA	Tamanho (cm)			Metástase Linfonodal		
	≥5, n=8 (%)	<5, n=16 (%)	p*	+, n=12 (%)	-, n=12 (%)	p*
HOXA10	3 (37,5)	1 (6,3)	0,09	3 (25)	1 (8,3)	0,59
IGF1R	8 (100)	16 (100)	-	12 (100)	12 (100)	-
IL1A	7 (87,5)	16 (100)	0,33	11 (91,7)	12 (100)	1,00
MMP1	3 (37,5)	4 (25)	0,53	3 (25)	4 (33,3)	0,65
MYC	2 (25)	10 (62,5)	0,08	8 (66,7)	4 (33,3)	0,10
PTEN	6 (75)	8 (50)	0,24	7 (58,3)	7 (58,3)	1,00
RHOA	4 (50)	10 (62,5)	0,56	8 (66,7)	6 (50)	0,41
SNAI2	8 (100)	15 (93,7)	1,00	12 (100)	11 (91,7)	1,00

*p pelo Teste exato de Fisher/Qui-quadrado

Tabela 31 – Associação da expressão das proteínas selecionadas nos tecidos tumorais dos 24 pacientes com CaPe e sobrevida câncer específica e sobrevida global pelo teste de Log Rank.

PROTEÍNA/ EXPRESSÃO	Sobrevida Câncer Específica			Sobrevida Global		
	Óbitos, n=7 (%)	Censurados, n=17 (%)	p (Log rank)	Óbitos, n=10 (%)	Vivos, n=14 (%)	p (Log rank)
HOXA10	1 (14,3)	3 (17,6)	0,70	2 (20)	2 (14,3)	0,92
IGF1R	7 (100)	17 (100)	-	10 (100)	14 (100)	-
IL1A	7 (100)	16 (94,1)	0,54	10 (100)	13 (92,8)	0,49
MMP1	3 (42,9)	4 (23,5)	0,37	4 (40)	3 (21,4)	0,36
MYC	5 (71,4)	7 (41,2)	0,27	6 (60)	6 (42,9)	0,40
PTEN	5 (71,4)	9 (52,9)	0,32	7 (70)	7 (50)	0,29
RHOA	3 (48,8)	11 (64,7)	0,42	5 (50)	9 (64,3)	0,55
SNAI2	7 (100)	16 (94,1)	0,54	10 (100)	13 (92,8)	0,44

4.8 Resultados dos DNAs de HPV encontrados

O DNA do HPV foi avaliado no TT. Entre os 24 pacientes incluídos, oito (33,3%) pacientes apresentavam HPV no tumor. Cinco (41,7%) pacientes do grupo não metastático e três (25%) do grupo metastático. Como descrito anteriormente, a presença do HPV não foi associada à nenhuma característica clínico-patológica ou à SLR, SCE ou SG. Os tipos encontrados foram o 16 em três pacientes, 11, 33, 35, 52, 58, 59 e 68 aparecendo em uma amostra cada. Um paciente apresentava os tipos de HPV 11 e 16 e outro caso os 58 e 59.

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

O CaPe (CaPe) é uma doença rara no Brasil(2) e no Mundo(1) e, portanto, as alterações moleculares associadas à sua carcinogênese são pouco compreendidas. Desenhamos este estudo com o objetivo de identificar alterações na expressão de miRNAs e seus genes alvos que estejam associadas à carcinogênese e ao prognóstico, buscando novos biomarcadores em CaPe. Encontramos 69 DEmiRs na comparação entre os TT e TNN adjacente através da técnica de *microarray*. Destes, nove (miR-31-3p, miR-31-5p, miR-224-5p, miR-200a-5p, miR-145-5p, miR-149-5p, miR-30a-5p, miR-487b-3p, miR-432-5p) foram capazes de separar as amostras em TT e TNN adjacente no agrupamento hierárquico. Na validação em amostra independente, apenas o miR-149-5p não manteve significância, mas apresentou tendência de associação com $p=0,097$. Na validação em amostra expandida por qRT-PCR, todos os nove DEmiRs apresentaram diferença significativa de expressão entre os grupos com valores de FC e valor de p semelhantes ao observado no *microarray*, o que os tornam potenciais candidatos a marcador de diagnóstico em CaPe.

Realizamos de forma inédita na literatura uma análise de varredura de expressão de miRNAs pela técnica de *Microarray* em grupos de pior (metastáticos) versus melhor prognóstico (não metastáticos) seguido de confirmação por qRT-PCR em amostra expandida com 24 pacientes de forma prospectiva. Desta forma, entre 21 DEmiRs identificados no *microarray*, encontramos sete DEmiRs (miR-744-5p, miR-152-3p, miR-196b-5p, miR-181c-5p, miR-421, miR-200a-5p e miR-149-5p) que são capazes de separar os pacientes entre os grupos (metastático versus não metastático) no agrupamento hierárquico. Destes sete DEmiRs, dois (miR-149-5p e miR-200a-5p) já haviam sido identificados como DEmiRs entre os grupos de TT e TNN. Na validação independente não conseguimos confirmar correlação significativa para esses sete DEmiRs sendo observado apenas tendência para o miR-421. Na análise com a amostra expandida por qRT-PCR com os 24 casos do estudo, confirmamos que os miR-421 e miR-744-5p estavam diferencialmente expressos de forma significativa entre os dois grupos. Portanto, estes tornam-se candidatos a biomarcadores de prognóstico e para terapia alvo no CaPe.

Postulamos que o tamanho da amostra da validação independente da comparação prognóstica de apenas 13 pacientes (6 metastáticos versus 7 localizados) foi um fator limitante para estes resultados e pode explicar a ausência de correlação nessa validação;

tanto que conseguimos validação quase total na amostra independente da comparação tumor versus normal, pois cada paciente forneceu uma amostra tumoral e outra normal, embora tenhamos avaliado os mesmos 13 pacientes mas dobrando o número de amostras avaliadas. Nesse mesmo sentido, na análise expandida com todos os 24 casos, a amostra da comparação não metastático versus metastático representa metade da comparação TT e TNN, pois comparamos 12 pacientes metastáticos contra 12 não metastáticos, ao invés de 24 amostras de TT versus 24 de TNN, o que pode ter reduzido o poder estatístico da análise.

Outra razão para explicar a menor validação de DEmiRs da análise metastático versus localizado quando comparada à de TT versus TNN na amostra independente é que os tecidos comparados, tumor metastático versus localizado, devem apresentar menor diferença de expressão de miRNAs em relação a comparação entre TT versus TNN, pois ambas as amostras são de tumor. Outra explicação reside no fato do ICESP ser um centro universitário terciário recebendo, portanto, casos mais agressivos e em estágio mais avançado, verificado pela rara ocorrência de tumores com estágio pTa ou pT1 de grau 1, dificultando a análise de prognóstico entre dois extremos de fenótipo que era o nosso objetivo inicial.

Em relação aos resultados de expressão de DEmiRs entre TT versus TNN, o nosso estudo representa atualmente o quarto na literatura que avaliou a expressão de DEmiRs por técnica de varredura. Entretanto, o nosso foi o único que realizou validação dos resultados por qRT-PCR em amostra independente com todos os tecidos (tumoral e normal) pareados pelos mesmos pacientes. O primeiro destes estudos foi publicado em 2015 por Zhang e cols. (133), quando já tínhamos iniciado a nossa pesquisa. Neste, espécimes cirúrgicos de tumores e tecido normal de 10 pacientes foram comparados e 56 DEmiRs foram encontrados entre os dois grupos utilizando uma técnica diferente à utilizada por nós para avaliação de expressão dos miRNAs, denominada *Next-Generation Sequencing (NGS)*. Destes 56 DEmiRs, nós encontramos os mesmos miR-145-5p, miR-509-3p subexpressos e o miR-187-3p superexpresso no TT em nossos pacientes. De forma surpreendente, o miR-199a-5p estava superexpresso no resultado deles e subexpresso no nosso. Por qRT-PCR, eles validaram 10 miRNAs na amostra expandida do NGS com 13 pacientes(133), incluindo o miR-145-5p validado por nós também. Através do banco de dados com os resultados originais (E-MTAB-3087) obtidos deste estudo(133), confirmamos através de validação externa *in silico* a superexpressão

do miR-31-5p e a subexpressão dos miR-30a-5p, miR-432-5p, miR-487b-3p e do miR-145-5p, demonstrando a robustez dos nossos dados.

O segundo estudo publicado foi em 2017 por Kuasne e cols. e utilizou a técnica com *TaqMan Low Density Assay* para identificação dos miRNAs diferencialmente expressos(135). Neste estudo, foram identificados 81 miRNAs com diferença entre o TT versus TNN de 21 pacientes. Os miR-134-5p, miR-139-3p, miR-139-5p, miR-145-5p, miR-574-3p e o let-7c-5p também estavam subexpressos em nossa pesquisa e os miR-18a-5p, miR-31-5p, miR-183-5p e o miR-224-5p superexpressos, como na deles. Novamente, encontramos o miR-34a-5p subexpresso em nossos resultados e superexpresso no deles. Oito miRNAs foram validados por qRT-PCR em amostra expandida utilizando 21 pacientes do *microarray* e mais 33 amostras de novos pacientes (amostra independente), entre eles o miR-31-5p, o miR-145-5p e o miR-224-5p, os quais também validamos(135). Assim como neste estudo, avaliamos a capacidade dos miRNAs validados em discriminar TT versus TNN através da construção de curvas ROC e análise das AUC. Kuasne e cols. demonstraram que os miR-31-5p, miR-223-3p e o miR-224-5p possuíam boa AUC (todas maiores que 0,73) na discriminação entre TT e TNN(135). Entretanto, os miR-31-5p e o miR-224-5p não confirmaram estes resultados em nossa pesquisa e o miR-223-3p não foi avaliado por nós. Todavia, obtivemos quatro DEmiRs (miR-30a-5p, miR-432-5p, miR-487b-3p e miR-145-5p) com boa acurácia para discriminar os grupos entre TT e TNN ($AUC \geq 0,89$).

Por último, Ayoubian et cols. publicaram em 2021 uma análise de varredura por *microarray* em tecido parafinado, mas surpreendentemente não encontraram nenhum DEmiR na comparação entre 22 tumores de pênis contra oito tecidos não neoplásicos(148). Os autores conseguiram encontrar 876 DEmiRs na comparação entre tumores de pênis HPV positivos versus negativo e 95 DEmiRs entre TT e TNN nos pacientes com CEC de pênis do tipo usual negativos para HPV(148). Destes 95, nós encontramos dois em nossos resultados (miR-99a-5p e o miR-125b-2-3p) também subexpressos no TT, embora nossa comparação seja de tumores do tipo CEC usual, mas sem a distinção de positividade para HPV.

As diferenças de alguns resultados obtidos entre os três estudos previamente publicados e o nosso podem ser explicadas por diferenças entre as técnicas utilizadas (NGS versus *microarray*), características tumorais distintas e tamanho de amostra pequena. Com relação ao estudo de Zhang e cols.(133), o número de 10 casos avaliados

na análise por NGS é próximo à nossa de 11 pacientes avaliados por *microarray*, entretanto a nossa amostra para validação é independente; ou maior na amostra expandida como eles fizeram, 24 versus 13 pacientes, respectivamente, tornando nossos resultados mais sólidos. Não é possível fazer comparações sobre as características dos tumores entre os estudos, pois não há dados clínicos sobre os pacientes estudados por Zhang e cols. Além disso, utilizaram uma técnica de varredura dos miRNAs diferente do nosso estudo, a qual possui grande variabilidade técnica e alto custo para sua realização(149, 150).

No estudo de Kuasne e cols., foram utilizadas 21 amostras de CaPe e comparados com seis amostras de tecido normal e cinco amostras de glânde de cadáveres para o *microarray* e, para fase de validação, 33 amostras de tumores, 20 de tecido normal adjacente e sete glândes de cadáver(135). Apesar de maior número de casos avaliados com CaPe, nesta análise não foram utilizadas amostras pareadas entre todos os pacientes como fizemos, podendo explicar algumas diferenças entre os miRNAs encontrados nas comparações entre os estudos. O tecido adjacente ao tumor pode não ser comparável ao tecido de um pênis sem tumor. Ademais, cerca de 10% dos tumores estudados por Kuasne e cols. eram de subtipo histológico diferente (misto e papilares) do nosso (usual em 100% dos casos). As mesmas críticas podem ser feitas ao estudo publicado por Ayoubian e cols., pois também não utilizaram todas as amostras pareadas e quase 50% dos casos eram de subtipo histológico não usual (basaloide, verrucoso, células claras)(138). Pode-se ainda explicar a diferença pelo menor número de casos bem diferenciados e estágio pT1 encontrados em nosso estudo em relação aos dois estudos prévios(135, 138).

Na análise de expressão dos DEGs entre TT versus TNN, identificamos 37 genes diferencialmente expressos (31 subexpressos e seis superexpressos). Destes, 25 são alvos validados por algum dos 69 DEmiRs identificados por nós pela técnica de *microarray*. O gene mais expresso no TT foi o *MMP1* (FC=28) e o *IL1A* (FC=13,4). As funções biológicas destes 37 genes desregulados, analisados por GSEA e banco de dados de GO, mostraram que eles estão envolvidos em vias relacionadas à resposta celular ao estímulo endógeno, resposta de fatores crescimento, reguladores da atividade de transcrição e proteólise.

O estudo de Kuasne e cols. também utilizou a técnica de *microarray* para identificar genes diferencialmente expressos entre TT versus TNN. Este estudo identificou 2700 genes diferencialmente expressos entre os dois grupos (135). A análise entre os DEmiRs e os alvos preditos ou validados deste estudo encontrou 598 interações

entre os miRNAs e os mRNAs. Comparando os resultados deste estudo com os nossos achados encontramos alguns genes em comum com as mesmas características em termos de expressão entre o tecido normal e tumoral, como a menor expressão dos genes *BCL2*, *EGR1*, *FGF2*, *LATS2*, *PPARGC1A*, *RECK* e *ZEB1* e a maior expressão do gene *MMP12*. De fato, utilizando os dados originais (GSE57955) do estudo de Kuasne e cols.(135), fomos capazes de realizar a validação externa *in silico* de 15 dos 37 DEGs identificados em nosso estudo, dos quais, cinco estavam superexpressos (*IL1A*, *MCM2*, *MMP1*, *MMP12* e *SFN*) e 10 estavam subexpressos (*ABCB1*, *BCL2*, *EGR1*, *FGF2*, *FOS*, *PEBP1*, *PPARGC1A*, *RECK*, *TLR4* e *ZEB1*).

Interessante notar que conseguimos identificar algumas interações miRNA-mRNA em nosso estudo que podem ser candidatos potenciais a biomarcadores em CaPe. Doze dos 37 DEGs são regulados por seis DE miRs validados em nossa casuística (miR-30a-5p, o miR-432-5p, miR-224-5p; miR-31-5p, miR-31-3p, miR-145-5p) de acordo com o miRTarBase 8.0. Na análise da curva ROC dos 37 DEGs identificados, encontramos seis superexpressos (*IL1A*, *MCM2*, *MMP1*, *MMP12*, *SFN* e *VEGFA*) que apresentaram boa acurácia para distinguir TT de TNN. Cinco destes são regulados por dois DE miRs validados e subexpressos na nossa amostra que também mostraram boa AUC na curva ROC (miR-145-5p e *MCM2*, *MMP1*, *MMP12* e *VEGFA*; miR-30a-5p e *IL1A*). De fato, a alteração de expressão do miR-145-5p já foi demonstrada nos estudos de Zhang e cols.(133) e Kuasne e cols.(135), bem como a superexpressão dos genes *MMP1* e *MMP12* foram validados por qRT-PCR por Kuasne e cols. em pacientes com CaPe, mostrando boa acurácia para distinguir TT e TNN (AUC de 0,923 e 0,865, respectivamente)(135). A superexpressão de *MMP1* e *MMP12* tem sido associado com o desenvolvimento de tumores em outras regiões anatômicas, incluindo CEC esôfago e cabeça e pescoço(151). *MCM2* também já foi associado com fatores prognósticos em CaPe, enquanto o *VEGFA* foi demonstrado superexpresso também em outro CEC, de cavidade oral(89, 152).

A expressão do miR-31 está alterada em vários tipos de câncer e foi demonstrado que esta alteração tem influência em atividades celulares como migração, proliferação, viabilidade, metastatização, apoptose e sensibilidade a terapias(153). Seu papel funcional é complexo e parece agir como um miRNA supressor tumoral ou oncomiR em diferentes tipos de tumores num modo contexto dependente(153). Em nosso estudo, o miR-31-5p foi o mais superexpresso e já foi implicado previamente na carcinogênese do CaPe(135). Um dos seus alvos é o gene supressor de tumor *LATS2*, um transcrito que encontramos

subexpresso em nossa análise, e que promove progressão de CEC de cavidade oral por inibir a via de sinalização Hippo(154). O gene *MLHI* também estava subexpresso em nossa análise e também é um alvo direto do miR-31-5p em linhagem celular de câncer de pulmão não pequena células(155).

Investigamos a regulação da expressão dos nove miRNAs e 83 mRNA do nosso estudo através de análise integrativa de correlação miRNA-mRNA. Acreditamos que estas análises são mais confiáveis do que a média dos valores de expressão do miRNA e mRNA entre os grupos, pois avalia par a par. Encontramos uma ruptura na dinâmica de regulação dos pares miRNA-mRNA em CaPe mostrando que oito pares mudaram o padrão de correlação durante o desenvolvimento do tumor, ou seja, correlações negativas tornaram-se positivas ou vice-versa quando comparados os grupos de TT e TNN. O par com mudança mais marcante foi o miR-432-5p-*TP53*, o qual mostrava correlação negativa entre miRNA-mRNA no TNN mudando para positiva no TT. De acordo com o miRTarBase 8.0, o único par validado previamente na literatura, ou seja, mRNA alvo do miRNA, foi o miR-149-5p-*HOXA10*. O miR-149-5p já foi demonstrado subexpresso em CEC de colo de útero HPV positivo(156) e o *HOXA10* exerce papel na proliferação, migração e invasão do CEC de cavidade oral(157). Entretanto, pela primeira vez demonstramos que esta interação miR-149-5p-*HOXA10* pode estar implicada na carcinogênese do CaPe. O miR-149-5p também teve sua correlação alterada com os transcritos *DKK1* e *SOX2*, ambos superexpressos em CEC de cabeça e pescoço(158, 159). Os demais pares miRNA-mRNA com ruptura identificados pela nossa análise integrativa também foram demonstrados alterados pela primeira vez em CaPe neste estudo.

Além de biomarcadores e melhor entendimento no processo de carcinogênese, buscamos marcadores associados ao maior risco de metástases que possam selecionar melhor os pacientes candidatos a linfadenectomia inguinal, especialmente aqueles sem linfonodos palpáveis (cN0). Apesar deste procedimento servir como parte do tratamento e ferramenta de estadiamento, ele apresenta alta chance de complicações e morbidade(25, 46). Infelizmente, até o momento, urologistas utilizam apenas parâmetros clínico-patológicos para indicar a realização da linfadenectomia inguinal(42). Entretanto, se realizada de forma ampla e irrestrita, até 70% dos pacientes cN0 serão tratados de forma desnecessária, adicionando apenas a morbidade inerente ao procedimento cirúrgico (25). Na literatura, encontramos poucos estudos que investigaram o papel dos miRNAs como biomarcadores associados a maior chance de metástases em CaPe e nenhum apresentou

dados consistentes para utilização na prática clínica. Em nosso estudo, encontramos o miR-421 e o miR-744-5p superexpressos no grupo de doentes com metástases e até o momento nenhum destes dois DEmiRs foi descrito como biomarcadores de pior prognóstico em CaPe, denotando a originalidade de nossos resultados.

De acordo com a literatura, a expressão do miR-421 está aumentada e tem correlação com pior prognóstico e metástase linfonodal do câncer de pulmão não pequena células (160) e câncer gástrico (161), sugerindo um papel oncogênico deste DEmiR nestas neoplasias, em concordância com nosso resultado. Entretanto, em câncer de mama sua menor expressão está correlacionada com pior estágio T, metástase linfonodal e maior grau histológico(162), sugerindo um papel de miRNA supressor de tumor nesta neoplasia.

O miR-744-5p é pouco estudado em oncologia atuando como oncomiR e miR supressor a depender da neoplasia considerada e não há nenhum estudo que tenha avaliado o seu papel em CEC. A menor expressão deste miRNA ocorre em células de câncer de ovário e está associada a mortalidade pela doença(163), da mesma forma que foi descrita em linhagens celulares de câncer de pulmão não pequena células(164). Neste estudo, sua expressão aumentada foi capaz de inibir a proliferação e invasão celular *in vitro*(164). Novamente, de forma contrária aos nossos achados, a menor expressão do miR-744-5p foi encontrada em tecido de câncer colorretal, sendo sua superexpressão capaz de reduzir a proliferação celular e induzir apoptose *in vitro*(165). De forma oposta, a maior expressão do miR-744 foi demonstrada em tecido de câncer pancreático e sua concentração plasmática elevada esteve associado a metástase linfonodal(166). Alguns estudos demonstram que o mesmo miRNA pode agir como oncomiR ou supressor tumoral em diferentes tecidos humanos. Estas ações diferentes podem ser explicadas pelos diferentes genes alvos do miRNA, fatores ambientais, aspectos relacionados ao tecido ou interação com tratamento(167).

O primeiro estudo que investigou associação entre miRNAs e metástase em CaPe foi publicado em 2016 e identificou três miRNAs (miR-1, miR-101 e miR-204) com menor expressão em pacientes metastáticos(134). Além disso, quando esses três miRNAs tinham expressão reduzida, os pacientes apresentavam pior sobrevida câncer-específica. Entretanto, esses autores não realizaram estudo de varredura para análise de expressão de todos os potenciais DEmiRs; ao invés, eles utilizaram um ensaio com apenas 384 miRNAs, enquanto o nosso estudo utilizou um ensaio com 4603 sondas para miRNAs. No ano seguinte, Kuasne e cols.(135) identificaram DEmiRs entre os tecidos

normais e tumorais e, dentre estes, demonstraram que a subexpressão dos miR-106a-5p, miR-17-5p, miR-512-3p estavam associados a metástase linfonodal (135), mas também não realizaram o estudo de varredura entre os grupos metastático e com doença localizada como fizemos. Em 2020, Pinho e cols. mostraram que a superexpressão do miR-223-3p correlacionava-se com metástase linfonodal através de qRT-PCR(136), mas estudaram apenas três miRNAs baseados nos achados de Zhang e cols(133). Em 2021, Ayoubian et cols. publicaram estudo de varredura entre tumores metastático e localizado da sua coorte de pacientes com CEC do tipo usual sem infecção por HPV de forma semelhante ao nosso projeto e identificaram 118 DEmiRs(138), tendo um único miRNA em comum com os nossos achados (miR-1296-5p). Eles confirmaram, por qRT-PCR, a superexpressão dos miR-137 e miR-328-3p nos pacientes com doença metastática por CaPe, mas este estudo foi retrospectivo em sua natureza e não prospectivo como o nosso.

Além do perfil de expressão de miRNAs em pacientes metastáticos versus não metastático, investigamos também a expressão de 83 genes pela plataforma Fluidigm®. Sete mostraram maior expressão no grupo metastático (*CCND1*, *EGFR*, *ENTPD5*, *HOXA10*, *IGF1R*, *MYC* e *SNAI2*) e mostraram boa acurácia para separação dos grupos, com AUC igual ou maior que 0,74. Desta forma concluímos que os setes são potenciais candidatos a importantes biomarcadores de progressão em CaPe.

McDaniel e cols. mostraram que ganho de cópias do *CCND1* estão associadas ao pior prognóstico em CaPe(69), enquanto Gunia e cols. mostraram que a superexpressão desse gene estava relacionada à superexpressão do p53, mas não ao pior prognóstico(168). O gene *ENTPD5* não foi estudado em CaPe nem em carcinoma escamoso de outro sítio, mas é descrito como um oncogene alvo do p53 mutante que promove sua expressão necessária à migração celular, invasão e metástase(169). Em CEC de cavidade oral, a superexpressão de *HOXA10* por IHQ em 60 pacientes esteve associado a pior estágio T, sobrevida câncer-específica e sobrevida global(170). A maior expressão do *IGF1R*, avaliada por *tissue microarray* e IHQ, também já foi descrito em CaPe com associação ao pior grau tumoral em casuística com 112 amostras(88) e pior sobrevida livre de progressão em outra série com 53 pacientes com CaPe(171).

O gene *MYC* superexpresso é o único regulado por um dos miRNAs validados (miR-744-5p); entretanto, de forma inesperada, este miRNA também está superexpresso, demonstrando que as interações e expressões dos miRNAs e genes são muito mais complexas e nem sempre óbvias, sofrendo influência de diversos outros fatores genéticos

e epigenéticos pouco compreendidos. Na literatura, o ganho de cópias do gene *MYC* está associado a pior prognóstico no CaPe, sendo observado um aumento progressivo do número de cópias com evolução da doença *in situ* para o tumor invasivo e metastático. Neste estudo foram avaliadas 88 amostras de CEC de pênis e os ganhos de cópias foram avaliados através de técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH)(172). Baseado em nossos resultados, propomos que a maior expressão de *MYC* seja um potencial marcador de pior prognóstico no CaPe e sua interação com o miR-744-5p, apesar de não ser o padrão, pode estar relacionada como acontece em outras interações miRNA-mRNA(108). O gene *SNAI2* não possui relação com o CaPe na literatura, porém está associado a metástase linfonodal e mortalidade geral em pacientes com CEC de língua, provavelmente atuando na promoção da via de transição epitélio-mesênquima(173). Em nossa casuística, a maior expressão do gene *SNAI2*, esteve associada aos tumores HPV negativos, metástase linfonodal e pior sobrevida câncer específica.

Com relação as correlações entre a expressão dos 14 DEmiRs identificados no *microarray*, e selecionados para validação, versus os fatores prognósticos clássicos no CaPe, observamos que a menor expressão do miR-31-3p apresentou correlação significativa com o pior estágio do tumor primário (pT) e que a menor expressão do miR-31-5p ($p=0,058$) teve tendência à correlação com o mesmo fator prognóstico. Os demais DEmiRs estudados não se correlacionaram com as variáveis clínicas dos pacientes, como grau de diferenciação tumoral, estágio T, IMV, risco para metástase, presença de HPV e tamanho tumoral. O miR-31-3p não foi descrito em CaPe até o momento. Entretanto, em recente meta-análise, Zeljic e cols. demonstraram que este miRNA estava elevado em pacientes com câncer de cavidade oral em quatro estudos de forma consistente, com aproximadamente 250 pacientes avaliados, indicando um papel oncogênico para este DEmiR assim como o observado em nosso estudo(174). Em relação ao miR-31-5p, Kuasne e cols. também encontraram maior expressão deste DEmiR nas amostras de CaPe, mas não observaram nenhuma correlação significativa com os fatores clássicos de prognóstico(135). Zeljic e cols. também observaram maior expressão do miR-31-5p nos pacientes com câncer de cavidade oral(174). Outros miRNAs da família miR-31 também estavam superexpressos em estudos que avaliaram tumores epiteliais como câncer colorretal(175) e cavidade oral(176), onde também estavam associados a fatores de pior prognóstico. Os nossos resultados demonstram que os miR-31-3p e miR-35-5p estão

elevados no TT e diminuídos no grupo de pacientes com maior estágio T. Ainda que possam ser implicados como oncomiRs, esses miRNAs podem ter papel importante no início do processo de carcinogênese em CaPe, mas durante a progressão da neoplasia parece ocorrer redução de sua importância verificada pela subexpressão associada ao maior estágio tumoral.

Nas correlações entre expressão dos DEmiRs e sobrevida, encontramos que a maior expressão do miR-421 esteve associada à pior sobrevida global ($p=0,038$), com tendência à pior sobrevida câncer específica ($p=0,05$). Outro DEmiR que teve tendência a correlação com sobrevida câncer-específica e global foi o miR-31-3p ($p=0,091$ e $p=0,064$; respectivamente), cuja maior de expressão está associada a menor mortalidade em ambos os desfechos. Acreditamos que a casuística relativamente pequena e poucos pacientes com características clínico-patológicas mais favoráveis talvez expliquem a falta de significância estatística destes resultados.

Na literatura, outros estudos encontraram associação entre miRNAs e características clínico-patológicas no CaPe. Na primeira publicação, Barzon e cols. demonstraram que havia tendência a menor expressão do miR-218 nos pacientes com tumores HPV positivos e que o miR-196a estava superexpresso nos tumores grau 2 e 3(130). Kuasne e cols.(135), além das associações entre miRNAs e metástases linfonodais descritas previamente, também demonstraram que o miR-320a estava subexpresso nos tumores T3-4 em relação ao T1-2. Identificaram ainda que os miR-505-3p, miR-29b-3p, miR-146a-5p, miR-185-5p e o let-7b-5p estavam diminuídos nos pacientes com HPV. Pinho e cols. em 2020 demonstraram que a maior expressão do miR-107 estava associada a pior grau, estágio e maior tamanho tumoral em CaPe(136). O mesmo grupo publicou em 2021 a associação da expressão reduzida do miR-145 em tumores de pacientes associados ao HPV e a expressão aumentada com invasão perineural(137). Ayoubian e cols. encontraram associação entre a maior expressão do miR-181d-5p e a menor expressão do miR-211-5p em tumores HPV positivos com subtipos histológicos do tipo basalóide, verrucoso ou verrucoso-basalóide(148).

Nas associações de expressão dos DEGs com as características clínicas e fatores de prognóstico, encontramos correlação da menor expressão dos genes *BAX* e *SNAI2* com infecção pelo HPV; maior expressão de *MMP1* e menores de *NANOG*, *TP53* com tamanho tumoral; maior grau tumoral e maior expressão de *CCND1*, *EGFR*, *MMP1*; maior expressão de *MMP1* e invasão perineural, pior grupo de risco para metástase e

maior estágio pT; e IMV com maior expressão de *IL1A*. O gene *MMP1* mostrou-se associado a quase todas as características, exceto presença de HPV e IMV. Este gene teve a maior diferença de expressão entre TT e TNN em nosso estudo e apresentou associação com metástase linfonodal, grau histológico, invasão perineural e maior estágio patológico no estudo de Kuasne e cols(135). O *MMP1* é regulado pelo miR-145-5p que está diminuído nos tumores de nossa amostra de *microarray* e foi validado por qRT-PCR em nosso estudo e no estudo de Kuasne e cols(135). O *MMP1* codifica uma proteinase de matriz extracelular que promove a digestão da matriz, facilitando a invasão e disseminação celular, portanto, atuando como um oncogene(177). Em tumores de CEC do esôfago, por exemplo, sua expressão elevada correlaciona-se diretamente com pior sobrevida câncer-específica e global(178).

Nas correlações entre as expressões dos DEGS com as curvas de sobrevida, a maior expressão dos genes *CCND1*, *EGFR*, *GADD45A*, *MYC*, *SNAI2* e *SRC* e a menor expressão dos genes *CDH1*, *CDKN1A*, *KLF4* e *TP63* estavam associadas a menor sobrevida câncer específica nas curvas de Kaplan-Meier ($p < 0,05$). Porém nas correlações de expressão gênica com sobrevida, ajustados para metástase e invasão perineural, apenas a maior expressão do gene *GADD45A* mostrou-se independentemente associado à sobrevida câncer-específica, reduzindo em 20 vezes a sobrevida quando elevado. Para sobrevida global, a maior expressão dos transcritos *FGF2*, *GADD45A*, *IL6*, *MYC*, *NES* e *NRP1* e a menor expressão do gene *CDH1* estavam associadas a menor sobrevida global de modo significativo e todos, à exceção do *IL6*, mantiveram significância na regressão de Cox, com risco aproximadamente seis vezes maior de morte nos superexpressos e redução de 90% do risco no subexpresso.

A associação do ganho de cópias dos genes ou alterações únicas de nucleotídeos dos genes *CCND1* e *MYC* com pior sobrevida em CaPe foi descrita em 43 amostras de pacientes com CEC de pênis(69). O aumento do número de cópias do *EGFR* através da técnica de FISH e o aumento da expressão da proteína EGFR por IHQ, um potencial gene para terapias-alvo, também demonstraram associação a menor sobrevida câncer específica em CaPe e maior recorrência, respectivamente, em amostras de 139 pacientes(80). O *SNAI2*, que se encontra reduzido nos pacientes com infecção por HPV e elevado nos pacientes com metástase, está associado a via de transição epitélio-mesênquima, através da supressão do gene *CDH1* (E-caderina), cuja subexpressão está associada a maior mortalidade câncer específica e global em nosso estudo. Uma das

características genótípicas da transição epitélio mesênquimal é a perda de expressão de E-caderina e ganho de expressão das caderinas mesenquimais P-, N-, e OB-caderina. Este *switch* de caderinas resulta em fenótipo caracterizado por menor adesão intercelular e arranjo frouxo mesenquimal que facilita a invasão, migração e disseminação da célula neoplásica(179). Em carcinoma de células escamosas de língua, o *SNAI2* elevado está associado a maior mortalidade global(173). Até o presente momento, não há estudo que correlacione este gene com sobrevida câncer-específica em CaPe. A superexpressão do gene *GADD45A* esteve associada tanto à mortalidade câncer específica quanto global, de forma independente pela regressão de COX em nosso estudo. Em ambas, o HR para SCE e SG (20,89 e 6,43, respectivamente) foi o maior entre os genes estudados. O *GADD45A*, que é um gene relacionado a resposta ao dano de DNA, pode agir como um oncogene ou um gene supressor tumoral dependendo da resposta distinta ao estímulo oncogênico (180, 181). Na literatura, podemos encontrar sua expressão elevada ou reduzida em outros CECs, embora nunca tenha sido descrito como alterado em pênis (182, 183).

De forma semelhante a avaliação do TT com TNN, investigamos a regulação da expressão dos sete miRNAs e 83 mRNAs do nosso estudo através de análise integrativa de correlação miRNA-mRNA. Encontramos ruptura na dinâmica de regulação dos pares miRNA-mRNA em pacientes com CaPe metastático, mostrando uma mudança no padrão de correlação durante o processo de metastatização. Dez pares apresentaram boa acurácia na distinção entre os tecidos quando avaliadas as relações entre as expressões dos miRNAs e dos genes. Destacamos, dentre estes, quatro pares que apresentam relações entre miRNAs e genes relacionados a resposta imune (miR-421-*CD274*, miR-421-*MYD88*, miR-744-5p-*CD274* e miR-744-5p-*TLR4*). O gene *CD274* codifica a proteína PD-L1, que quando ligada ao seu receptor no linfócito T (PD1), “desliga” o linfócito reduzindo sua resposta imunológica(184). A expressão de PD-L1 está presente em até 32% dos tumores de pênis e está associada a menor SCE nesta população(185). Os outros dois genes *MYD88* e *TLR4* estão implicados na resposta imune inata; parte desta resposta deve-se à ativação do *TLR4*, pelo *MYD88*, que promove a liberação de citocinas pró-inflamatórias(186). O gene *MYD88* não foi correlacionado com carcinogênese ou prognóstico em CaPe até o momento. Entretanto, a subexpressão da proteína TLR4 foi demonstrada por IHQ em amostras de CaPe HPV positivos de 31 pacientes(95). Embora nossos achados não tenham confirmado esses resultados em pacientes HPV positivos, encontramos uma menor expressão do gene *TLR4* no TT em relação ao TNN.

Nenhuma proteína em nosso estudo esteve associada às características clínico-patológicas ou mortalidade. Observamos apenas que a proteína c-MYC foi a única que teve tendência de associação de sua maior expressão com invasão microvascular e metástase linfonodal ($p=0,06$ e $p=0,10$, respectivamente). Masferrer et col., estudando 79 casos, mostraram associação entre a superexpressão da proteína MYC e a presença de HPV no CaPe, associação que não conseguimos demonstrar em nosso estudo (172). Neste estudo, foi demonstrado também que a superexpressão da proteína MYC em pacientes HPV negativos esteve associado ao ganho de cópias do gene *MYC*, o que por sua vez esteve associado a pior prognóstico em CaPe (172).

A presença do HPV no TT também foi investigada e foram encontrados oito (33,3%) pacientes com HPV no tumor, sendo o HPV 16 mais prevalente. No mundo, a prevalência de HPV no TT encontra-se entre 25% e 63%(8, 11). Nestes estudos, o HPV 16 é o mais encontrado nos tumores, atingindo quase 50% dos casos. Não encontramos miRNA associado à presença do HPV, mas os genes *SNAI2* e *BAX* apresentavam menor expressão no grupo de pacientes com HPV. Entretanto, Kuasne e cols. encontram quatro miRNAs e dois genes subexpressos, e 11 genes superexpressos nos pacientes com HPV(135). Ayoubian e cols. demonstraram por microarray 876 DEmiRs entre pacientes com CaPe e presença de HPV versus HPV negativos(138). Como discutido anteriormente, a presença de HPV não teve relação com mortalidade em nossa coorte, embora os tumores associados ao HPV tenham maior sobrevida câncer específica em cinco anos versus os HPV negativos (93% x 78%)(187).

Em relação aos dados clínicos e demográficos, nossa casuística mostra como o fator socioeconômico está associado ao CaPe, pois 87% dos nossos pacientes estudaram apenas até o primeiro grau. Com relação à raça, os pardos e os negros são a maioria, com aproximadamente dois terços da amostra. Mais da metade eram fumantes e o número de parceiras elevado. Além disso, a maioria de nossos pacientes vinham da região nortordeste do país e de áreas rurais. Somado a estes fatores, encontramos um número alto de DSTs relatados, bem como de zoofilia em nossa amostra. Todos são fatores de risco para CaPe bem descritos na literatura(3-7).

O ICESP onde foi desenvolvido o estudo é um hospital quaternário e, portanto, é de se esperar que os casos atendidos nele sejam de maior complexidade e gravidade. Conforme esperado, nossos pacientes chegaram ao hospital com doença avançada (cT3) ou disseminada (cN+) em 33% e 62% dos casos, respectivamente. Esses números foram

um pouco menores no estadiamento patológico, com 29% de pT3 e 45,8% de pN+, mas ainda bastante elevados. Attalla e cols. mostraram que pacientes tratados em hospitais universitários tinham 30% maior risco de doença igual ou maior que pT2 e quase 60% de doença pN+ do que aqueles tratados em hospitais comunitários numa amostra de mais de 13000 doentes com CaPe(188). Em nosso estudo, mais de 80% estavam classificados no grupo de alto risco para metástase linfonodal, conforme classificação da Sociedade Européia de Urologia(42). Esta característica mais agressiva de nossos pacientes pode ter comprometido as correlações do grupo metastático versus localizado, onde apenas invasão perineural e metástase linfonodal correlacionaram-se com a sobrevida específica. Postulamos que necessitaríamos de um número maior de pacientes para atingir significância estatística para algumas variáveis se continuássemos com 80% dos casos classificados como alto risco; e que se talvez tivéssemos uma amostra com mais casos favoráveis pTa/pT1 e grau 1 as correlações dos fatores de prognóstico provavelmente teriam resultado diferente do encontrado.

Nossa coorte apresenta um seguimento mediano de 39,8 meses e seguimento máximo de 62 meses. Esse seguimento é suficiente para que a maioria das recorrências aconteça, o que parece ser ao redor de 24 meses(48). Entre as variáveis clínicas estudadas, a invasão perineural esteve associada a sobrevida câncer-específica, aumentando em quase cinco vezes o risco de mortalidade pela doença. Outros autores já mostraram seu fator prognóstico(189), bem como sua relação com alterações do processo de transição epitélio-mesênquima(190) e expressão da proteína EGFR(80). Os parâmetros que não foram associados à sobrevida câncer-específica, como presença do HPV, grau de diferenciação, estadiamento T, invasão microvascular, grupos de risco para metástase linfonodal e tamanho tumoral podem não ter atingido relevância estatística em nosso estudo devido ao tamanho amostral e, principalmente, pelo motivo já exposto de que a maioria de nossos casos são de pior prognóstico. Na literatura, os pacientes com coilocitose (presença de HPV)(35), pior diferenciação tumoral(25), invasão linfovascular(35) e maior estadiamento T(25) tem pior prognóstico bem estabelecido.

O CaPe além do estigma do próprio câncer ainda vem acompanhado de morbidade e mutilação durante seu tratamento, com perda ou diminuição da função sexual conforme demonstrado em pacientes submetidos a algum tipo de cirurgia parcial para CaPe(191, 192). Aparentemente, mesmo procedimentos menores, como a excisão local ampliada, apresentam queda de qualidade da função sexual assim como na penectomia

parcial(192). Nenhum dos nossos pacientes foi tratado com preservação do pênis, tendo sido submetidos a penectomia parcial em 17 casos (70,8%) e penectomia total no restante. A linfadenectomia inguinal é um procedimento de estadiamento e ao mesmo tempo curativa. Nossos pacientes realizaram-na em dois terços dos casos. Três pacientes recusaram-se a realizar a linfadenectomia e todos encontram-se até o último seguimento vivos e sem evidência de doença. Eles apresentavam tumor bem ou moderadamente diferenciado (G1, G2) e estágio pT2. Dos pacientes submetidos a linfadenectomia inguinal, 68,7% dos pacientes apresentavam linfonodo positivo. Ornellas e cols. mostraram em seu estudo com 688 pacientes, que a sobrevida câncer-específica em pacientes pN0 era de 96% contra 35% naqueles pN+ em 10 anos de seguimento(25), confirmando que o estadiamento linfonodal talvez seja o divisor de prognóstico entre aqueles que vão sobreviver ou vir a falecer de CaPe e confirmando nosso achado de que a metástase linfonodal esteve associada a pior SCE. Biomarcadores com capacidade de indicar aqueles com potencial metastático ou ainda que sirvam para terapias alvo tornam-se o objetivo dos estudos em CaPe e os nossos resultados indicam um caminho para a descoberta desses biomarcadores.

A linfadenectomia inguinal também é conhecida pela sua morbidade. Em nossa coorte, 15 (93,8%) pacientes que haviam sido submetidos a linfadenectomia apresentaram algum tipo de complicação no pós-operatório. Seis pacientes com complicações Clavien-Dindo I, basicamente deiscência de cicatriz e linfocele, dois Clavien-Dindo II com infecção de sítio cirúrgico tratado com antibiótico e TEP tratado com anticoagulante, quatro pacientes com complicações IIIa ou IIIb que necessitaram de tratamento cirúrgico e desbridamento local e um paciente que foi a óbito por sepse no pós-operatório, Clavien-Dindo V. Adicionalmente, seis (37,5%) pacientes apresentaram alguma seqüela do procedimento (5 linfedemas e 1 parestesia de membros inferiores). Obtivemos um número semelhante de complicações àquele relatado em literatura prévia, que também aponta como as maiores causas de complicações a infecção de sítio cirúrgico e a linfocele(193, 194). A expressão dos DEmiRs miR-421 e miR-744-5p e dos seis DEGs podem ser empregados com o intuito de reduzir a necessidade destas cirurgias no futuro.

Nosso estudo apresenta algumas limitações. Pela raridade da doença e por ser prospectivo, levamos dois anos e meio para coletar todas as amostras teciduais, resultando em apenas 24 casos incluídos. Nossa amostra tem um tamanho pequeno, o que previne conclusões de pequenas variações entre os grupos. Isso acontece, por exemplo, em tecidos

com alterações genéticas similares, como no caso de comparação entre dois tecidos tumorais (um localizado e outro metastático), principalmente na validação independente com apenas 13 amostras. Tal prejuízo parece ser menor quando comparamos tumores com tecidos normais, onde as alterações são mais evidentes, e pudemos obter resultados mais consistentes na fase de validação. Outra dificuldade encontrada é devida à característica de nosso serviço, onde recebemos pacientes de gravidade elevada, diminuindo os casos de bom prognóstico e dificultando a análise das variáveis entre grupos de bom e mau prognóstico. Finalmente, não realizamos análise de varredura da expressão dos DEGs da mesma forma que fizemos para a varredura dos DEmiRs por *microarray* devido a limitações financeiras; a seleção dos genes alvo foi realizada *in silico*, através de bioinformática, o que pode ter dificultado a comprovação de interação entre alguns miRNAs e seus respectivos mRNAs.

Apesar das dificuldades mencionadas, foi possível realizar uma análise compreensiva, desde os miRNAs, passando pela expressão gênica dos mRNAs até a expressão proteica, comparando de forma única e prospectiva, tecidos tumorais versus não tumorais e tecidos de pacientes com tumores de pênis metastáticos versus localizados em mesma coorte de pacientes. Cabe ressaltar que nenhum estudo realizou avaliação por varredura de DEmiRs ou DEGs entre grupos de prognóstico distintos (metastáticos versus localizados), tornando nosso estudo pioneiro e os resultados originais. Adicionalmente, o nosso estudo foi o quarto estudo a realizar, através de um método de varredura, a avaliação de DEmiRs entre TT e TNN, devendo-se anotar que Zhang e cols.(133) utilizaram uma amostra de validação menor e Kuasne e cols.(135) não possuíam amostras pareadas nos mesmo pacientes para comparação como em nossa análise. No terceiro estudo, Ayoubian e cols., não identificaram DEmiRs entre TT e TNN na coorte estudada (148). Outro ponto forte foi o caráter prospectivo de nossa pesquisa, enquanto todos os estudos prévios foram retrospectivos e com os vieses associados a esse tipo de desenho. Além disso, realizamos uma análise integrativa entre os DEmiRs e os mRNAs, de forma inédita na literatura em CaPe. E completamos o ciclo com a avaliação da expressão proteica no TT. Finalmente, além dos potenciais alvos de nossos DEmiRs identificados, nós também incluímos na análise de expressão gênica outros genes que acreditávamos serem importantes no prognóstico e carcinogênese do CaPe, através de literatura pertinente, ampliando o resultado da nossa análise.

6 Conclusão

6 CONCLUSÃO

Descrevemos uma assinatura molecular baseada em nove miRNAs (miR-432-5p, miR-478b-3p, miR-145-5p, miR-149-5p, miR-30a-5p, miR-200a-5p, miR-224-5p, miR-31-3p e miR-31-5p) e 37 genes cujas expressões estavam associadas a carcinogênese peniana, sendo seis com boa acurácia para distinguir TT de TNN (*IL1A*, *MCM2*, *MMP1*, *MMP12*, *SFN* e *VEGFA*). Descrevemos ainda alterações na regulação de oito pares de miRNA-mRNA durante o desenvolvimento tumoral de forma inédita. Estes DEmiRs e genes, bem como os pares na análise integrativa, tornam-se candidatos a marcadores diagnósticos e terapias alvo no CaPe.

Observamos maior expressão dos miR-421 e miR-744-5p no tumor metastático quando comparado ao tumor localizado. A expressão dos genes *CCND1*, *EGFR*, *ENTPD5*, *HOXA10*, *IGF1R*, *MYC* e *SNAI2* também se mostraram elevados no grupo de pacientes com tumores metastáticos e apresentaram boa acurácia para separar os grupos de pacientes com doença localizada e à distância. Postulamos que estes DEmiRs e genes são candidatos a biomarcadores de prognóstico no CaPe.

Demonstramos que a menor expressão do miR-31-3p estava significativamente associada a maior estadiamento pT e a maior expressão do miR-421 esteve associada a menor sobrevida global, sendo potenciais marcadores de prognóstico no CaPe.

A expressão dos genes *MMP1*, *SNAI2*, *BAX*, *LIN28A*, *NANOG*, *TP53*, *CCND1*, *EGFR*, *RIPK3*, *SRC*, *KLF4*, *MMP9*, *TP5313*, *ABCB1*, *IL1A* mostraram correlação com fatores de prognóstico clássicos no CaPe. Demonstramos menor tempo de sobrevida livre de recorrência e câncer específica quando os genes *CCND1*, *EGFR*, *GADD45A*, *MYC*, *SNAI2* e *SRC* estavam superexpressos e os *CDH1*, *CDKN1A*, *KLF4*, *TP63* estavam subexpressos. Encontramos ainda que a superexpressão dos genes *FGF2*, *GADD45A*, *MYC*, *NES* e *NRP1* e subexpressão do *CDH1* estavam associadas a menor sobrevida global, sugerindo papel de marcador de prognóstico para estes genes.

Não encontramos associação entre as proteínas *HOXA10*, *IGFR1*, *IL1A*, *MMP1*, *MYC*, *PTEN*, *RHOA* e *SNAI2* e os fatores prognósticos clássicos ou mortalidade câncer específica e global no CaPe.

7 Referências

7 REFERÊNCIAS

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-49.
2. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil Rio de Janeiro:INCA,2015: Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância.; 2015 [updated 05-28-2017; cited 2017 04-28-2018]. Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/tabelaestados.asp?UF=BR>.
3. Tsen HF, Morgenstern H, Mack T, Peters RK. Risk factors for penile cancer: results of a population-based case-control study in Los Angeles County (United States). *Cancer Causes Control.* 2001;12(3):267-77.
4. Daling JR, Madeleine MM, Johnson LG, Schwartz SM, Shera KA, Wurscher MA, et al. Penile cancer: importance of circumcision, human papillomavirus and smoking in in situ and invasive disease. *Int J Cancer.* 2005;116(4):606-16.
5. Ulf-Moller CJ, Simonsen J, Frisch M. Marriage, cohabitation and incidence trends of invasive penile squamous cell carcinoma in Denmark 1978-2010. *Int J Cancer.* 2013;133(5):1173-9.
6. Benard VB, Johnson CJ, Thompson TD, Roland KB, Lai SM, Cokkinides V, et al. Examining the association between socioeconomic status and potential human papillomavirus-associated cancers. *Cancer.* 2008;113(10 Suppl):2910-8.
7. Zequi Sde C, Guimaraes GC, da Fonseca FP, Ferreira U, de Matheus WE, Reis LO, et al. Sex with animals (SWA): behavioral characteristics and possible association with penile cancer. A multicenter study. *J Sex Med.* 2012;9(7):1860-7.
8. Saraiya M, Unger ER, Thompson TD, Lynch CF, Hernandez BY, Lyu CW, et al. US assessment of HPV types in cancers: implications for current and 9-valent HPV vaccines. *J Natl Cancer Inst.* 2015;107(6):djv086.
9. Sudenga SL, Torres BN, Fulp WJ, Silva R, Villa LL, Lazcano-Ponce E, et al. Country-specific HPV-related genital disease among men residing in Brazil, Mexico and The United States: The HIM study. *Int J Cancer.* 2017;140(2):337-45.
10. Sudenga SL, Ingles DJ, Pierce Campbell CM, Lin HY, Fulp WJ, Messina JL, et al. Genital Human Papillomavirus Infection Progression to External Genital Lesions: The HIM Study. *Eur Urol.* 2016;69(1):166-73.
11. Djajadiningrat RS, Jordanova ES, Kroon BK, van Werkhoven E, de Jong J, Pronk DT, et al. Human papillomavirus prevalence in invasive penile cancer and association with clinical outcome. *J Urol.* 2015;193(2):526-31.
12. Razzaghi H, Saraiya M, Thompson TD, Henley SJ, Viens L, Wilson R. Five-year relative survival for human papillomavirus-associated cancer sites. *Cancer.* 2018;124(1):203-11.
13. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol.* 2016;70(1):93-105.
14. Sanchez DF, Soares F, Alvarado-Cabrero I, Canete S, Fernandez-Nestosa MJ, Rodriguez IM, et al. Pathological factors, behavior, and histological prognostic risk groups in subtypes of penile squamous cell carcinomas (SCC). *Semin Diagn Pathol.* 2015;32(3):222-31.
15. Cubilla AL, Velazques EF, Reuter VE, Oliva E, Mihm MC, Jr., Young RH. Warty (condylomatous) squamous cell carcinoma of the penis: a report of 11 cases and proposed classification of 'verruciform' penile tumors. *Am J Surg Pathol.* 2000;24(4):505-12.
16. Koifman L, Vides AJ, Koifman N, Carvalho JP, Ornellas AA. Epidemiological aspects of penile cancer in Rio de Janeiro: evaluation of 230 cases. *Int Braz J Urol.* 2011;37(2):231-40; discussion 40-3.
17. Burgers JK, Badalament RA, Drago JR. Penile cancer. Clinical presentation, diagnosis, and staging. *Urol Clin North Am.* 1992;19(2):247-56.

18. Gao W, Song LB, Yang J, Song NH, Wu XF, Song NJ, et al. Risk factors and negative consequences of patient's delay for penile carcinoma. *World J Surg Oncol*. 2016;14:124.
19. Persson B, Sjodin JG, Holmberg L, Windahl T, Steering Committee of the National Penile Cancer Register in S. The National Penile Cancer Register in Sweden 2000-2003. *Scand J Urol Nephrol*. 2007;41(4):278-82.
20. Bhagat SK, Gopalakrishnan G, Kekre NS, Chacko NK, Kumar S, Manipadam MT, et al. Factors predicting inguinal node metastasis in squamous cell cancer of penis. *World J Urol*. 2010;28(1):93-8.
21. Brierley JDG, M.K.; Wittekind, C. *TNM Classification of Malignant Tumors*, 8th Edition.: Wiley-Blackwell; 2016.
22. Lont AP, Besnard AP, Gallee MP, van Tinteren H, Horenblas S. A comparison of physical examination and imaging in determining the extent of primary penile carcinoma. *BJU Int*. 2003;91(6):493-5.
23. Kayes O, Minhas S, Allen C, Hare C, Freeman A, Ralph D. The role of magnetic resonance imaging in the local staging of penile cancer. *Eur Urol*. 2007;51(5):1313-8; discussion 8-9.
24. Hanchanale V, Yeo L, Subedi N, Smith J, Wah T, Harnden P, et al. The accuracy of magnetic resonance imaging (MRI) in predicting the invasion of the tunica albuginea and the urethra during the primary staging of penile cancer. *BJU Int*. 2016;117(3):439-43.
25. Ornellas AA, Kinchin EW, Nobrega BL, Wisnescky A, Koifman N, Quirino R. Surgical treatment of invasive squamous cell carcinoma of the penis: Brazilian National Cancer Institute long-term experience. *J Surg Oncol*. 2008;97(6):487-95.
26. Zhu Y, Zhang SL, Ye DW, Yao XD, Jiang ZX, Zhou XY. Predicting pelvic lymph node metastases in penile cancer patients: a comparison of computed tomography, Cloquet's node, and disease burden of inguinal lymph nodes. *Onkologie*. 2008;31(1-2):37-41.
27. Lucchesi FR, Reis RB, Faria EF, Machado RD, Rossini RR, Borregales LD, et al. Incremental value of MRI for preoperative penile cancer staging. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. 2017;45(1):118-24.
28. Hungerhuber E, Schlenker B, Karl A, Frimberger D, Rothenberger KH, Stief CG, et al. Risk stratification in penile carcinoma: 25-year experience with surgical inguinal lymph node staging. *Urology*. 2006;68(3):621-5.
29. Sadeghi R, Gholami H, Zakavi SR, Kakhki VR, Horenblas S. Accuracy of 18F-FDG PET/CT for diagnosing inguinal lymph node involvement in penile squamous cell carcinoma: systematic review and meta-analysis of the literature. *Clin Nucl Med*. 2012;37(5):436-41.
30. Scher B, Seitz M, Reiser M, Hungerhuber E, Hahn K, Tiling R, et al. 18F-FDG PET/CT for staging of penile cancer. *J Nucl Med*. 2005;46(9):1460-5.
31. Sun M, Djajadiningrat RS, Alnajjar HM, Trinh QD, Graafland NM, Watkin N, et al. Development and external validation of a prognostic tool for prediction of cancer-specific mortality after complete loco-regional pathological staging for squamous cell carcinoma of the penis. *BJU Int*. 2015;116(5):734-43.
32. Rieken M, Djajadiningrat RS, Kluth LA, Favaretto RL, Xylinas E, Guimaraes GC, et al. Predictors of cancer-specific mortality after disease recurrence in patients with squamous cell carcinoma of the penis. *Eur Urol*. 2014;66(5):811-4.
33. Slaton JW, Morgenstern N, Levy DA, Santos MW, Jr., Tamboli P, Ro JY, et al. Tumor stage, vascular invasion and the percentage of poorly differentiated cancer: independent prognosticators for inguinal lymph node metastasis in penile squamous cancer. *J Urol*. 2001;165(4):1138-42.
34. Ficarra V, Akduman B, Bouchot O, Palou J, Tobias-Machado M. Prognostic factors in penile cancer. *Urology*. 2010;76(2 Suppl 1):S66-73.
35. Ornellas AA, Nobrega BL, Wei Kin Chin E, Wisnescky A, da Silva PC, de Santos Schwindt AB. Prognostic factors in invasive squamous cell carcinoma of the penis: analysis of 196 patients treated at the Brazilian National Cancer Institute. *J Urol*. 2008;180(4):1354-9.

36. Aita GA, Zequi SC, Costa WH, Guimaraes GC, Soares FA, Giuliangelis TS. Tumor histologic grade is the most important prognostic factor in patients with penile cancer and clinically negative lymph nodes not submitted to regional lymphadenectomy. *Int Braz J Urol.* 2016;42(6):1136-43.
37. Torbrand C, Wigertz A, Drevin L, Folkvaljon Y, Lambe M, Hakansson U, et al. Socioeconomic factors and penile cancer risk and mortality; a population-based study. *BJU Int.* 2017;119(2):254-60.
38. Steffens S, Al Ghazal A, Steinestel J, Lehmann R, Wegener G, Schnoeller TJ, et al. High CRP values predict poor survival in patients with penile cancer. *BMC Cancer.* 2013;13:223.
39. Ma C, Zhou Y, Zhou S, Zhao K, Lu B, Sun E. Preoperative peripheral plasma fibrinogen level is an independent prognostic marker in penile cancer. *Oncotarget.* 2017;8(7):12355-63.
40. Perisanidis C, Psyrii A, Cohen EE, Engelmann J, Heinze G, Perisanidis B, et al. Prognostic role of pretreatment plasma fibrinogen in patients with solid tumors: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev.* 2015;41(10):960-70.
41. Zhu Y, Zhou XY, Yao XD, Zhang SL, Dai B, Zhang HL, et al. Prognostic value of carbonic anhydrase IX expression in penile squamous cell carcinoma: a pilot study. *Urol Oncol.* 2013;31(5):706-11.
42. Hakenberg OM, E.S.; Necchi, A.; Protzel, C.; Watkin, N.; Compérat, E. The European Association of Urology (EAU) Guidelines on Penile Cancer 2018 [Available from: <http://uroweb.org/guideline/penile-cancer/#10>.
43. Leijte JA, Kirrander P, Antonini N, Windahl T, Horenblas S. Recurrence patterns of squamous cell carcinoma of the penis: recommendations for follow-up based on a two-centre analysis of 700 patients. *Eur Urol.* 2008;54(1):161-8.
44. Kieffer JM, Djajadiningrat RS, van Muilekom EA, Graafland NM, Horenblas S, Aaronson NK. Quality of life for patients treated for penile cancer. *J Urol.* 2014;192(4):1105-10.
45. Wood HM, Angermeier KW. Anatomic considerations of the penis, lymphatic drainage, and biopsy of the sentinel node. *Urol Clin North Am.* 2010;37(3):327-34.
46. Gopman JM, Djajadiningrat RS, Baumgarten AS, Espiritu PN, Horenblas S, Zhu Y, et al. Predicting postoperative complications of inguinal lymph node dissection for penile cancer in an international multicentre cohort. *BJU Int.* 2015;116(2):196-201.
47. Saisorn I, Lawrentschuk N, Leewansangtong S, Bolton DM. Fine-needle aspiration cytology predicts inguinal lymph node metastasis without antibiotic pretreatment in penile carcinoma. *BJU Int.* 2006;97(6):1225-8.
48. Kroon BK, Horenblas S, Lont AP, Tanis PJ, Gallee MP, Nieweg OE. Patients with penile carcinoma benefit from immediate resection of clinically occult lymph node metastases. *J Urol.* 2005;173(3):816-9.
49. Solsona E, Iborra I, Rubio J, Casanova JL, Ricos JV, Calabuig C. Prospective validation of the association of local tumor stage and grade as a predictive factor for occult lymph node micrometastasis in patients with penile carcinoma and clinically negative inguinal lymph nodes. *J Urol.* 2001;165(5):1506-9.
50. Cabanas RM. An approach for the treatment of penile carcinoma. *Cancer.* 1977;39(2):456-66.
51. Wespes E, Simon J, Schulman CC. Cabanas approach: is sentinel node biopsy reliable for staging penile carcinoma? *Urology.* 1986;28(4):278-9.
52. Horenblas S, Jansen L, Meinhardt W, Hoefnagel CA, de Jong D, Nieweg OE. Detection of occult metastasis in squamous cell carcinoma of the penis using a dynamic sentinel node procedure. *J Urol.* 2000;163(1):100-4.
53. Kroon BK, Horenblas S, Estourgie SH, Lont AP, Valdes Olmos RA, Nieweg OE. How to avoid false-negative dynamic sentinel node procedures in penile carcinoma. *J Urol.* 2004;171(6 Pt 1):2191-4.
54. Neto AS, Tobias-Machado M, Ficarra V, Wroclawski ML, Amarante RD, Pompeo AC, et al. Dynamic sentinel node biopsy for inguinal lymph node staging in patients with penile

- cancer: a systematic review and cumulative analysis of the literature. *Ann Surg Oncol*. 2011;18(7):2026-34.
55. Lam W, Alnajjar HM, La-Touche S, Perry M, Sharma D, Corbishley C, et al. Dynamic sentinel lymph node biopsy in patients with invasive squamous cell carcinoma of the penis: a prospective study of the long-term outcome of 500 inguinal basins assessed at a single institution. *Eur Urol*. 2013;63(4):657-63.
56. Sadeghi R, Gholami H, Zakavi SR, Kakhki VR, Tabasi KT, Horenblas S. Accuracy of sentinel lymph node biopsy for inguinal lymph node staging of penile squamous cell carcinoma: systematic review and meta-analysis of the literature. *J Urol*. 2012;187(1):25-31.
57. Kumar V, Sethia KK. Prospective study comparing video-endoscopic radical inguinal lymph node dissection (VEILND) with open radical ILND (OILND) for penile cancer over an 8-year period. *BJU Int*. 2017;119(4):530-4.
58. Singh A, Jaipuria J, Goel A, Shah S, Bhardwaj R, Baidya S, et al. Comparing outcomes of robotic and open inguinal lymph node dissection in patients with carcinoma penis. *J Urol*. 2018.
59. Lughezzani G, Catanzaro M, Torelli T, Piva L, BIASONI D, Stagni S, et al. The relationship between characteristics of inguinal lymph nodes and pelvic lymph node involvement in penile squamous cell carcinoma: a single institution experience. *J Urol*. 2014;191(4):977-82.
60. Sharma P, Djajadiningrat R, Zargar-Shoshtari K, Catanzaro M, Zhu Y, Nicolai N, et al. Adjuvant chemotherapy is associated with improved overall survival in pelvic node-positive penile cancer after lymph node dissection: a multi-institutional study. *Urol Oncol*. 2015;33(11):496 e17-23.
61. Nicolai N, Sangalli LM, Necchi A, Giannatempo P, Paganoni AM, Colecchia M, et al. A Combination of Cisplatin and 5-Fluorouracil With a Taxane in Patients Who Underwent Lymph Node Dissection for Nodal Metastases From Squamous Cell Carcinoma of the Penis: Treatment Outcome and Survival Analyses in Neoadjuvant and Adjuvant Settings. *Clin Genitourin Cancer*. 2016;14(4):323-30.
62. Leijte JA, Kerst JM, Bais E, Antonini N, Horenblas S. Neoadjuvant chemotherapy in advanced penile carcinoma. *Eur Urol*. 2007;52(2):488-94.
63. Bermejo C, Busby JE, Spiess PE, Heller L, Pagliaro LC, Pettaway CA. Neoadjuvant chemotherapy followed by aggressive surgical consolidation for metastatic penile squamous cell carcinoma. *J Urol*. 2007;177(4):1335-8.
64. Pond GR, Di Lorenzo G, Necchi A, Eigel BJ, Kolinsky MP, Chacko RT, et al. Prognostic risk stratification derived from individual patient level data for men with advanced penile squamous cell carcinoma receiving first-line systemic therapy. *Urol Oncol*. 2014;32(4):501-8.
65. Pizzocaro G, Nicolai N, Milani A. Taxanes in combination with cisplatin and fluorouracil for advanced penile cancer: preliminary results. *Eur Urol*. 2009;55(3):546-51.
66. Nicholson S, Hall E, Harland SJ, Chester JD, Pickering L, Barber J, et al. Phase II trial of docetaxel, cisplatin and 5FU chemotherapy in locally advanced and metastatic penis cancer (CRUK/09/001). *Br J Cancer*. 2013;109(10):2554-9.
67. Stephens PJ, Tarpey PS, Davies H, Van Loo P, Greenman C, Wedge DC, et al. The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature*. 2012;486(7403):400-4.
68. Motzer RJ, Tannir NM, McDermott DF, Aren Frontera O, Melichar B, Choueiri TK, et al. Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2018;378(14):1277-90.
69. McDaniel AS, Hovelson DH, Cani AK, Liu CJ, Zhai Y, Zhang Y, et al. Genomic Profiling of Penile Squamous Cell Carcinoma Reveals New Opportunities for Targeted Therapy. *Cancer Res*. 2015;75(24):5219-27.
70. Ferrandiz-Pulido C, Hernandez-Losa J, Masferrer E, Vivancos A, Somoza R, Mares R, et al. Identification of somatic gene mutations in penile squamous cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2015;54(10):629-37.

71. Lopes A, Bezerra AL, Pinto CA, Serrano SV, de Mell OC, Villa LL. p53 as a new prognostic factor for lymph node metastasis in penile carcinoma: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy. *J Urol*. 2002;168(1):81-6.
72. Busso-Lopes AF, Marchi FA, Kuasne H, Scapulatempo-Neto C, Trindade-Filho JC, de Jesus CM, et al. Genomic profiling of human penile carcinoma predicts worse prognosis and survival. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2015;8(2):149-56.
73. Chaux A, Munari E, Cubilla AL, Hicks J, Lecksell K, Burnett AL, et al. Immunohistochemical expression of the mammalian target of rapamycin pathway in penile squamous cell carcinomas: a tissue microarray study of 112 cases. *Histopathology*. 2014;64(6):863-71.
74. Ferrandiz-Pulido C, Masferrer E, Toll A, Hernandez-Losa J, Mojal S, Pujol RM, et al. mTOR signaling pathway in penile squamous cell carcinoma: pmTOR and pEIF4E over expression correlate with aggressive tumor behavior. *J Urol*. 2013;190(6):2288-95.
75. Faraj SF, Chaux A, Gonzalez-Roibon N, Munari E, Cubilla AL, Shih Ie M, et al. Immunohistochemical expression of ARID1A in penile squamous cell carcinomas: a tissue microarray study of 112 cases. *Hum Pathol*. 2015;46(5):761-6.
76. Arya M, Thrasivoulou C, Henrique R, Millar M, Hamblin R, Davda R, et al. Targets of Wnt/ss-catenin transcription in penile carcinoma. *PLoS One*. 2015;10(4):e0124395.
77. Grandis JR, Sok JC. Signaling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy. *Pharmacol Ther*. 2004;102(1):37-46.
78. Chaux A, Munari E, Katz B, Sharma R, Lecksell K, Cubilla AL, et al. The epidermal growth factor receptor is frequently overexpressed in penile squamous cell carcinomas: a tissue microarray and digital image analysis study of 112 cases. *Hum Pathol*. 2013;44(12):2690-5.
79. Gou HF, Li X, Qiu M, Cheng K, Li LH, Dong H, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR)-RAS signaling pathway in penile squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2013;8(4):e62175.
80. Silva Amancio AM, Cunha IW, Neves JI, Quetz JD, Carraro DM, Rocha RM, et al. Epidermal growth factor receptor as an adverse survival predictor in squamous cell carcinoma of the penis. *Hum Pathol*. 2017;61:97-104.
81. Necchi A, Nicolai N, Colecchia M, Catanzaro M, Torelli T, Piva L, et al. Proof of activity of anti-epidermal growth factor receptor-targeted therapy for relapsed squamous cell carcinoma of the penis. *J Clin Oncol*. 2011;29(22):e650-2.
82. Carthon BC, Ng CS, Pettaway CA, Pagliaro LC. Epidermal growth factor receptor-targeted therapy in locally advanced or metastatic squamous cell carcinoma of the penis. *BJU Int*. 2014;113(6):871-7.
83. Gunia S, Erbersdobler A, Hakenberg OW, Koch S, May M. C-MET is expressed in the majority of penile squamous cell carcinomas and correlates with polysomy-7 but is not associated with MET oncogene amplification, pertinent histopathologic parameters, or with cancer-specific survival. *Pathol Res Pract*. 2013;209(4):215-20.
84. Yang ES, Willey CD, Mehta A, Crowley MR, Crossman DK, Chen D, et al. Kinase analysis of penile squamous cell carcinoma on multiple platforms to identify potential therapeutic targets. *Oncotarget*. 2017;8(13):21710-8.
85. Buchou T, Vernet M, Blond O, Jensen HH, Pointu H, Olsen BB, et al. Disruption of the regulatory beta subunit of protein kinase CK2 in mice leads to a cell-autonomous defect and early embryonic lethality. *Mol Cell Biol*. 2003;23(3):908-15.
86. Li ZS, Deng CZ, Ye YL, Yao K, Guo SJ, Chen JP, et al. More precise prediction in Chinese patients with penile squamous cell carcinoma: protein kinase CK2alpha catalytic subunit (CK2alpha) as a poor prognosticator. *Oncotarget*. 2017;8(31):51542-50.
87. Iams WT, Lovly CM. Molecular Pathways: Clinical Applications and Future Direction of Insulin-like Growth Factor-1 Receptor Pathway Blockade. *Clin Cancer Res*. 2015;21(19):4270-7.
88. Faraj SF, Gonzalez-Roibon N, Munari E, Sharma R, Burnett AL, Cubilla AL, et al. Strong association of insulin-like growth factor 1 receptor expression with histologic grade, subtype, and

HPV status in penile squamous cell carcinomas: a tissue microarray study of 112 cases. *Virchows Arch.* 2017;470(6):695-701.

89. May M, Burger M, Otto W, Hakenberg OW, Wieland WF, May D, et al. Ki-67, mini-chromosome maintenance 2 protein (MCM2) and geminin have no independent prognostic relevance for cancer-specific survival in surgically treated squamous cell carcinoma of the penis. *BJU Int.* 2013;112(4):E383-90.

90. Li D, Han Z, Liu J, Zhang X, Ren J, Yan L, et al. Upregulation of nucleus HDGF predicts poor prognostic outcome in patients with penile squamous cell carcinoma bypass VEGF-A and Ki-67. *Med Oncol.* 2013;30(4):702.

91. Mannweiler S, Sygulla S, Winter E, Regauer S. Two major pathways of penile carcinogenesis: HPV-induced penile cancers overexpress p16ink4a, HPV-negative cancers associated with dermatoses express p53, but lack p16ink4a overexpression. *J Am Acad Dermatol.* 2013;69(1):73-81.

92. Zargar-Shoshtari K, Spiess PE, Berglund AE, Sharma P, Powsang JM, Giuliano A, et al. Clinical Significance of p53 and p16(ink4a) Status in a Contemporary North American Penile Carcinoma Cohort. *Clin Genitourin Cancer.* 2016;14(4):346-51.

93. Tang DH, Clark PE, Giannico G, Hameed O, Chang SS, Gellert LL. Lack of P16ink4a over expression in penile squamous cell carcinoma is associated with recurrence after lymph node dissection. *J Urol.* 2015;193(2):519-25.

94. La-Touche S, Lemetre C, Lambros M, Stankiewicz E, Ng CK, Weigelt B, et al. DNA Copy Number Aberrations, and Human Papillomavirus Status in Penile Carcinoma. Clinico-Pathological Correlations and Potential Driver Genes. *PLoS One.* 2016;11(2):e0146740.

95. Damasdi M, Kovacs K, Farkas N, Jakab F, Kovacs G. Down-regulation of Toll-like Receptor TLR4 Is Associated with HPV DNA Integration in Penile Carcinoma. *Anticancer Res.* 2017;37(10):5515-9.

96. Calmon MF, Mota MT, Babeto E, Candido NM, Girol AP, Mendiburu CF, et al. Overexpression of ANXA1 in penile carcinomas positive for high-risk HPVs. *PLoS One.* 2013;8(1):e53260.

97. Poetsch M, Hemmerich M, Kakies C, Kleist B, Wolf E, vom Dorp F, et al. Alterations in the tumor suppressor gene p16(INK4A) are associated with aggressive behavior of penile carcinomas. *Virchows Arch.* 2011;458(2):221-9.

98. Zou W, Wolchok JD, Chen L. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations. *Sci Transl Med.* 2016;8(328):328rv4.

99. Ottenhof SR, Djajadiningrat RS, de Jong J, Thygesen HH, Horenblas S, Jordanova ES. Expression of Programmed Death Ligand 1 in Penile Cancer is of Prognostic Value and Associated with HPV Status. *J Urol.* 2017;197(3 Pt 1):690-7.

100. Baweja A, Mar N. Metastatic penile squamous cell carcinoma with dramatic response to combined checkpoint blockade with ipilimumab and nivolumab. *J Oncol Pharm Pract.* 2021;27(1):212-5.

101. Rogenhofer S, Miersch H, Goke F, Kahl P, Wieland WF, Hofstadter F, et al. Histone methylation defines an epigenetic entity in penile squamous cell carcinoma. *J Urol.* 2013;189(3):1117-22.

102. Hagan JP, Croce CM. MicroRNAs in carcinogenesis. *Cytogenet Genome Res.* 2007;118(2-4):252-9.

103. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75(5):843-54.

104. Berezikov E. Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. *Nat Rev Genet.* 2011;12(12):846-60.

105. Pinhal DN, P.G.; Oliveira, A.C.; Bovolenta, L.A.; Herkenhoff, M.E. Origem e Evolução de MicroRNAs. In: Pereira TC, editor. *Introdução ao mundo dos microRNAs*. 1: Editora Cubo; 2015. p. 342.

106. Arantes ILGV, M.F.S.; Corrêa, C.A.P.; Pereira, T.C.; Corrêa, R.L. Regulação da abundância de miRNAs. In: Pereira TC, editor. Introdução ao mundo dos microRNAs. 1. Ribeirão Preto: Editora Cubo; 2015. p. 342.
107. Zhang Y, Fan M, Zhang X, Huang F, Wu K, Zhang J, et al. Cellular microRNAs up-regulate transcription via interaction with promoter TATA-box motifs. *RNA*. 2014;20(12):1878-89.
108. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*. 2007;318(5858):1931-4.
109. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 2000;408(6808):86-9.
110. Fuziwara CSDD, C.B.; Kimura, E.T. miRNAs na fisiologia humana. In: Pereira TC, editor. Introdução ao mundo dos microRNAs. 1. Ribeirão Preto: Editora Cubo; 2015. p. 342.
111. Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, et al. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature*. 2005;438(7068):685-9.
112. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature*. 2004;432(7014):226-30.
113. Aronica E, Fluiter K, Iyer A, Zurolo E, Vreijling J, van Vliet EA, et al. Expression pattern of miR-146a, an inflammation-associated microRNA, in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci*. 2010;31(6):1100-7.
114. Ashhab MU, Omran A, Kong H, Gan N, He F, Peng J, et al. Expressions of tumor necrosis factor alpha and microRNA-155 in immature rat model of status epilepticus and children with mesial temporal lobe epilepsy. *J Mol Neurosci*. 2013;51(3):950-8.
115. Zerneck A, Bidzhekov K, Noels H, Shagdarsuren E, Gan L, Denecke B, et al. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal*. 2009;2(100):ra81.
116. Corsten MF, Papageorgiou A, Verhesen W, Carai P, Lindow M, Obad S, et al. MicroRNA profiling identifies microRNA-155 as an adverse mediator of cardiac injury and dysfunction during acute viral myocarditis. *Circ Res*. 2012;111(4):415-25.
117. Duttagupta R, Jiang R, Gollub J, Getts RC, Jones KW. Impact of cellular miRNAs on circulating miRNA biomarker signatures. *PLoS One*. 2011;6(6):e20769.
118. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15524-9.
119. Xu XM, Qian JC, Deng ZL, Cai Z, Tang T, Wang P, et al. Expression of miR-21, miR-31, miR-96 and miR-135b is correlated with the clinical parameters of colorectal cancer. *Oncol Lett*. 2012;4(2):339-45.
120. Cheng H, Zhang L, Cogdell DE, Zheng H, Schetter AJ, Nykter M, et al. Circulating plasma MiR-141 is a novel biomarker for metastatic colon cancer and predicts poor prognosis. *PLoS One*. 2011;6(3):e17745.
121. Leite KR, Sousa-Canavez JM, Reis ST, Tomiyama AH, Camara-Lopes LH, Sanudo A, et al. Change in expression of miR-let7c, miR-100, and miR-218 from high grade localized prostate cancer to metastasis. *Urol Oncol*. 2011;29(3):265-9.
122. Leite KR, Tomiyama A, Reis ST, Sousa-Canavez JM, Sanudo A, Dall'Oglio MF, et al. MicroRNA-100 expression is independently related to biochemical recurrence of prostate cancer. *J Urol*. 2011;185(3):1118-22.
123. Chen ZH, Zhang GL, Li HR, Luo JD, Li ZX, Chen GM, et al. A panel of five circulating microRNAs as potential biomarkers for prostate cancer. *Prostate*. 2012;72(13):1443-52.
124. Zheng C, Yinghao S, Li J. MiR-221 expression affects invasion potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting DVL2. *Med Oncol*. 2012;29(2):815-22.
125. Leao R, van Agthoven T, Figueiredo A, Jewett MAS, Fadaak K, Sweet J, et al. Serum miRNA Predicts Viable Disease after Chemotherapy in Patients with Testicular Nonseminoma Germ Cell Tumor. *J Urol*. 2018;200(1):126-35.

126. Pereira PM, Marques JP, Soares AR, Carreto L, Santos MA. MicroRNA expression variability in human cervical tissues. *PLoS One*. 2010;5(7):e11780.
127. Lee JW, Choi CH, Choi JJ, Park YA, Kim SJ, Hwang SY, et al. Altered MicroRNA expression in cervical carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2008;14(9):2535-42.
128. Hu X, Schwarz JK, Lewis JS, Jr., Huettner PC, Rader JS, Deasy JO, et al. A microRNA expression signature for cervical cancer prognosis. *Cancer Res*. 2010;70(4):1441-8.
129. Zheng ZM, Wang X. Regulation of cellular miRNA expression by human papillomaviruses. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1809(11-12):668-77.
130. Barzon L, Cappellesso R, Peta E, Militello V, Sinigaglia A, Fassan M, et al. Profiling of expression of human papillomavirus-related cancer miRNAs in penile squamous cell carcinomas. *Am J Pathol*. 2014;184(12):3376-83.
131. Peta E, Cappellesso R, Masi G, Sinigaglia A, Trevisan M, Grassi A, et al. Down-regulation of microRNA-146a is associated with high-risk human papillomavirus infection and epidermal growth factor receptor overexpression in penile squamous cell carcinoma. *Hum Pathol*. 2017;61:33-40.
132. Munoz JJ, Drigo SA, Barros-Filho MC, Marchi FA, Scapulatempo-Neto C, Pessoa GS, et al. Down-Regulation of SLC8A1 as a Putative Apoptosis Evasion Mechanism by Modulation of Calcium Levels in Penile Carcinoma. *J Urol*. 2015;194(1):245-51.
133. Zhang L, Wei P, Shen X, Zhang Y, Xu B, Zhou J, et al. MicroRNA Expression Profile in Penile Cancer Revealed by Next-Generation Small RNA Sequencing. *PLoS One*. 2015;10(7):e0131336.
134. Hartz JM, Engelmann D, Furst K, Marquardt S, Spitschak A, Goody D, et al. Integrated Loss of miR-1/miR-101/miR-204 Discriminates Metastatic from Nonmetastatic Penile Carcinomas and Can Predict Patient Outcome. *J Urol*. 2016;196(2):570-8.
135. Kuasne H, Barros-Filho MC, Busso-Lopes A, Marchi FA, Pinheiro M, Munoz JJ, et al. Integrative miRNA and mRNA analysis in penile carcinomas reveals markers and pathways with potential clinical impact. *Oncotarget*. 2017;8(9):15294-306.
136. Pinho JD, Silva GEB, Teixeira Junior AAL, Belfort MRC, Mendes JM, Cunha IWD, et al. MIR-107, MIR-223-3P and MIR-21-5P Reveals Potential Biomarkers in Penile Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2020;21(2):391-7.
137. Pinho JD, Barros Silva GE, Teixeira Junior AAL, Belfort MRC, Mendes JMM, Calixto JRR, et al. Downregulation of miR-145 is associated with perineural invasion in penile carcinoma. *Transl Androl Urol*. 2021;10(5):2019-26.
138. Ayoubian H, Heinzelmann J, Hölters S, Khalmurzaev O, Pryalukhin A, Loertzer P, et al. miRNA Expression Characterizes Histological Subtypes and Metastasis in Penile Squamous Cell Carcinoma. *Cancers*. 2021;13(6):1480.
139. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
140. Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, et al. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques*. 2003;34(2):374-8.
141. Licursi V, Conte F, Fiscon G, Paci P. MIENTURNET: an interactive web tool for microRNA-target enrichment and network-based analysis. *BMC Bioinformatics*. 2019;20(1):545.
142. Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res*. 2004;64(15):5245-50.
143. Kuasne H, Colus IM, Busso AF, Hernandez-Vargas H, Barros-Filho MC, Marchi FA, et al. Genome-wide methylation and transcriptome analysis in penile carcinoma: uncovering new molecular markers. *Clin Epigenetics*. 2015;7:46.
144. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102(43):15545-50.

145. Kleter B, van Doorn LJ, ter Schegget J, Schrauwen L, van Krimpen K, Burger M, et al. Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. *Am J Pathol.* 1998;153(6):1731-9.
146. Kleter B, van Doorn LJ, Schrauwen L, Molijn A, Sastrowijoto S, ter Schegget J, et al. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *J Clin Microbiol.* 1999;37(8):2508-17.
147. Dindo D, Demartines N, Clavien PA. Classification of surgical complications: a new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey. *Ann Surg.* 2004;240(2):205-13.
148. Ayoubian H, Heinzelmann J, Holters S, Khalmurzaev O, Pryalukhin A, Loertzer P, et al. miRNA Expression Characterizes Histological Subtypes and Metastasis in Penile Squamous Cell Carcinoma. *Cancers (Basel).* 2021;13(6).
149. Roy S, Coldren C, Karunamurthy A, Kip NS, Klee EW, Lincoln SE, et al. Standards and Guidelines for Validating Next-Generation Sequencing Bioinformatics Pipelines. *The Journal of Molecular Diagnostics.* 2018;20(1):4-27.
150. Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nature Reviews Genetics.* 2012;13(5):358-69.
151. Gobin E, Bagwell K, Wagner J, Mysona D, Sandirasegarane S, Smith N, et al. A pan-cancer perspective of matrix metalloproteases (MMP) gene expression profile and their diagnostic/prognostic potential. *BMC Cancer.* 2019;19(1).
152. Nayak S, Goel MM, Chandra S, Bhatia V, Mehrotra D, Kumar S, et al. VEGF-A immunohistochemical and mRNA expression in tissues and its serum levels in potentially malignant oral lesions and oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 2012;48(3):233-9.
153. Laurila EM, Kallioniemi A. The diverse role of miR-31 in regulating cancer associated phenotypes. *Genes, Chromosomes and Cancer.* 2013;52(12):1103-13.
154. Yuan Y, Wang Z, Chen M, Jing Y, Shu W, Xie Z, et al. Macrophage-Derived Exosomal miR-31-5p Promotes Oral Squamous Cell Carcinoma Tumorigenesis Through the Large Tumor Suppressor 2-Mediated Hippo Signalling Pathway. *J Biomed Nanotechnol.* 2021;17(5):822-37.
155. Zhong Z, Dong Z, Yang L, Chen X, Gong Z. MicroRNA-31-5p modulates cell cycle by targeting human mutL homolog 1 in human cancer cells. *Tumour Biol.* 2013;34(3):1959-65.
156. Yuan Y, Shi X, Li B, Peng M, Zhu T, Lv G, et al. Integrated analysis of key microRNAs /TFs /mRNAs/ in HPV-positive cervical cancer based on microRNA sequencing and bioinformatics analysis. *Pathology - Research and Practice.* 2020;216(6):152952.
157. Carrera M, Bitu CC, de Oliveira CE, Cervigne NK, Graner E, Manninen A, et al. HOXA10 controls proliferation, migration and invasion in oral squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(4):3613-23.
158. Wei R, Rodriguez RA, Mullor MDMR, Tan Z, Gui Y, Hu J, et al. Analyzing the prognostic value of DKK1 expression in human cancers based on bioinformatics. *Annals of Translational Medicine.* 2020;8(8):552-.
159. Vijayakumar G, Narwal A, Kamboj M, Sen R. Association of SOX2, OCT4 and WNT5A Expression in Oral Epithelial Dysplasia and Oral Squamous Cell Carcinoma: An Immunohistochemical Study. *Head and Neck Pathology.* 2020;14(3):749-57.
160. Li Y, Cui X, Li Y, Zhang T, Li S. Upregulated expression of miR-421 is associated with poor prognosis in non-small-cell lung cancer. *Cancer Manag Res.* 2018;10:2627-33.
161. Yang P, Zhang M, Liu X, Pu H. MicroRNA-421 promotes the proliferation and metastasis of gastric cancer cells by targeting claudin-11. *Exp Ther Med.* 2017;14(3):2625-32.
162. Pan Y, Jiao G, Wang C, Yang J, Yang W. MicroRNA-421 inhibits breast cancer metastasis by targeting metastasis associated 1. *Biomed Pharmacother.* 2016;83:1398-406.
163. Kleemann M, Schneider H, Unger K, Sander P, Schneider EM, Fischer-Posovszky P, et al. MiR-744-5p inducing cell death by directly targeting HNRNPC and NFIX in ovarian cancer cells. *Sci Rep.* 2018;8(1):9020.

164. Chen S, Shi F, Zhang W, Zhou Y, Huang J. miR-744-5p Inhibits Non-Small Cell Lung Cancer Proliferation and Invasion by Directly Targeting PAX2. *Technology in Cancer Research & Treatment*. 2019;18:153303381987691.
165. Zhang W, Liao K, Liu D. MicroRNA-744-5p is downregulated in colorectal cancer and targets SEPT2 to suppress the malignant phenotype. *Molecular Medicine Reports*. 2020;23(1).
166. Miyamae M, Komatsu S, Ichikawa D, Kawaguchi T, Hirajima S, Okajima W, et al. Plasma microRNA profiles: identification of miR-744 as a novel diagnostic and prognostic biomarker in pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2015;113(10):1467-76.
167. Svoronos AA, Engelman DM, Slack FJ. OncomiR or Tumor Suppressor? The Duplicity of MicroRNAs in Cancer. *Cancer Research*. 2016;76(13):3666-70.
168. Gunia S, Kakies C, Erbersdobler A, Hakenberg OW, Koch S, May M. Expression of p53, p21 and cyclin D1 in penile cancer: p53 predicts poor prognosis. *J Clin Pathol*. 2012;65(3):232-6.
169. Timofeev O, Stiewe T. p53 gain-of-function mutations promote metastasis via ENTPD5 upregulation and enhanced N-glycoprotein folding. *Mol Cell Oncol*. 2017;4(2):e1288678.
170. Yamatoji M, Kasamatsu A, Yamano Y, Sakuma K, Ogoshi K, Iyoda M, et al. State of homeobox A10 expression as a putative prognostic marker for oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2010;23(1):61-7.
171. Ball MW, Bezerra SM, Chaux A, Faraj SF, Gonzalez-Roibon N, Munari E, et al. Overexpression of Insulin-like Growth Factor-1 Receptor Is Associated With Penile Cancer Progression. *Urology*. 2016;92:51-6.
172. Masferrer E, Ferrandiz-Pulido C, Lloveras B, Masferrer-Niubo M, Espinet B, Salido M, et al. MYC copy number gains are associated with poor outcome in penile squamous cell carcinoma. *J Urol*. 2012;188(5):1965-71.
173. Wang C, Liu X, Huang H, Ma H, Cai W, Hou J, et al. Deregulation of Snai2 is associated with metastasis and poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2012;130(10):2249-58.
174. Zeljic K, Jovanovic I, Jovanovic J, Magic Z, Stankovic A, Supjc G. MicroRNA meta-signature of oral cancer: evidence from a meta-analysis. *Ups J Med Sci*. 2018;123(1):43-9.
175. Wang CJ, Zhou ZG, Wang L, Yang L, Zhou B, Gu J, et al. Clinicopathological significance of microRNA-31, -143 and -145 expression in colorectal cancer. *Dis Markers*. 2009;26(1):27-34.
176. Siow MY, Ng LP, Vincent-Chong VK, Jamaludin M, Abraham MT, Abdul Rahman ZA, et al. Dysregulation of miR-31 and miR-375 expression is associated with clinical outcomes in oral carcinoma. *Oral Dis*. 2014;20(4):345-51.
177. Roy R, Yang J, Moses MA. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(31):5287-97.
178. Liu M, Hu Y, Zhang MF, Luo KJ, Xie XY, Wen J, et al. MMP1 promotes tumor growth and metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Lett*. 2016;377(1):97-104.
179. Ye Y, Xiao Y, Wang W, Yearsley K, Gao JX, Shetuni B, et al. ERalpha signaling through slug regulates E-cadherin and EMT. *Oncogene*. 2010;29(10):1451-62.
180. Hollander MC, Sheikh MS, Bulavin DV, Lundgren K, Augeri-Henmueller L, Shehee R, et al. Genomic instability in Gadd45a-deficient mice. *Nature Genetics*. 1999;23(2):176-84.
181. Tront JS, Huang Y, Fornace AA, Hoffman B, Liebermann DA. Gadd45a Functions as a Promoter or Suppressor of Breast Cancer Dependent on the Oncogenic Stress. *Cancer Research*. 2010;70(23):9671-81.
182. Wang BX, Yin BL, He B, Chen C, Zhao M, Zhang WX, et al. Overexpression of DNA damage-induced 45 alpha gene contributes to esophageal squamous cell cancer by promoter hypomethylation. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2012;31(1):11.
183. Guo W, Zhu T, Dong Z, Cui L, Zhang M, Kuang G. Decreased expression and aberrant methylation of Gadd45G is associated with tumor progression and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Clinical & Experimental Metastasis*. 2013;30(8):977-92.

184. Cai J, Wang D, Zhang G, Guo X. <p>The Role Of PD-1/PD-L1 Axis In Treg Development And Function: Implications For Cancer Immunotherapy</p>. *OncoTargets and Therapy*. 2019;Volume 12:8437-45.
185. Davidsson S, Carlsson J, Giunchi F, Harlow A, Kirrander P, Rider J, et al. PD-L1 Expression in Men with Penile Cancer and its Association with Clinical Outcomes. *Eur Urol Oncol*. 2019;2(2):214-21.
186. Deguine J, Barton GM. MyD88: a central player in innate immune signaling. *F1000Prime Reports*. 2014;6.
187. Lont AP, Kroon BK, Horenblas S, Gallee MP, Berkhof J, Meijer CJ, et al. Presence of high-risk human papillomavirus DNA in penile carcinoma predicts favorable outcome in survival. *Int J Cancer*. 2006;119(5):1078-81.
188. Attalla K, Paulucci DJ, Blum K, Anastos H, Moses KA, Badani KK, et al. Demographic and socioeconomic predictors of treatment delays, pathologic stage, and survival among patients with penile cancer: A report from the National Cancer Database. *Urol Oncol*. 2018;36(1):14 e7-e24.
189. Velazquez EF, Ayala G, Liu H, Chau A, Zanotti M, Torres J, et al. Histologic grade and perineural invasion are more important than tumor thickness as predictor of nodal metastasis in penile squamous cell carcinoma invading 5 to 10 mm. *Am J Surg Pathol*. 2008;32(7):974-9.
190. da Cunha IW, Souza MJ, da Costa WH, Amancio AM, Fonseca FP, Zequi Sde C, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenotype at invasion front of squamous cell carcinoma of the penis influences oncological outcomes. *Urol Oncol*. 2016;34(10):433 e19-26.
191. Sansalone S, Silvani M, Leonardi R, Vespasiani G, Iacovelli V. Sexual outcomes after partial penectomy for penile cancer: results from a multi-institutional study. *Asian J Androl*. 2017;19(1):57-61.
192. Wan X, Zheng D, Liu C, Xu H, Xie M, Zhou J, et al. A Comparative study of two types of organ-sparing surgeries for early stage penile cancer: Wide local excision vs partial penectomy. *Eur J Surg Oncol*. 2018;44(9):1425-31.
193. Ravi R. Morbidity following groin dissection for penile carcinoma. *Br J Urol*. 1993;72(6):941-5.
194. Lopes A, Hidalgo GS, Kowalski LP, Torloni H, Rossi BM, Fonseca FP. Prognostic factors in carcinoma of the penis: multivariate analysis of 145 patients treated with amputation and lymphadenectomy. *J Urol*. 1996;156(5):1637-42.

8 ANEXOS: PÔSTERES, APRESENTAÇÕES EM CONGRESSOS E PUBLICAÇÕES

8.1 Pôster apresentado no Annual Meeting of American Association of Cancer Research em Chicago, Il, 2018.



APRIL 14-18, 2018
MCCORMICK PLACE NORTH/SOUTH
CHICAGO, ILLINOIS

Session PO.MCB10.05 - MicroRNAs as Biomarkers Add To My Itinerary

5399 / 11 - Correlation of a microRNA expression profile and the prognosis of penile cancer: A prospective study using microarray data analysis

April 18, 2018, 8:00 AM - 12:00 PM
 Section 18

Presenter/Authors
T. K. Furuya¹, C. B. Murta², J. Pontes Jr², M. Uno¹, A. Carrasco¹, L. C. Sichero¹, L. L. Villa¹, R. F. Coelho², G. B. Guglielmetti², M. D. Cordeiro², K. R. Leite³, M. Srougi³, R. Chammas¹, W. C. Nahas¹; ¹Faculdade de Med. da Univ.e de São Paulo (FMUSP) / Inst. do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), São Paulo, Brazil, ²Inst. do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), São Paulo, Brazil, ³Faculdade de Med. da Univ.e de São Paulo (FMUSP), São Paulo, Brazil

Disclosures
T.K. Furuya: None. **C.B. Murta:** None. **J. Pontes Jr:** None. **M. Uno:** None. **A. Carrasco:** None. **L.C. Sichero:** None. **L.L. Villa:** None. **R.F. Coelho:** None. **G.B. Guglielmetti:** None. **M.D. Cordeiro:** None. **K.R. Leite:** None. **M. Srougi:** None. **R. Chammas:** None. **W.C. Nahas:** None.

Abstract
Introduction and objective: Penile cancer is a rare disease that has high morbidity and mortality rates. While a few biomarkers related to prognosis have been previously described to date none of them was adopted in clinical practice. Our aim was to identify a molecular signature based on miRNA expression levels that could identify those patients with high risk of metastatic penile carcinoma.
Methods: We prospectively collected fresh samples of primary tumors from 11 patients with squamous cell penile carcinoma who underwent surgical treatment between July/2015 and June/2017. Five patients had localized disease (non-metastatic group) and 6 had inguinal lymph node metastases (metastatic group). RNA was purified and microarray analysis was performed using miRNA 4.0 Genechip (Affymetrix). We identified differentially expressed miRNAs (DEmiRs) comparing metastatic in relation to non-metastatic groups using TAC Software (Affymetrix), fold change (FC) > 1.5 and p<0.05. Their validated/predicted targets were investigated using miRTarBase 7.0, mirWalk 2.0 and/or MetaCore 6.32 softwares. Enrichment Pathways analysis was performed using Enrichr. Up/downstream interaction networks were identified by MetaCore v6.32 software.
Results: Twenty two DEmiRs (17 up- and 5 downregulated) were identified when comparing metastatic in relation to non-metastatic patients. Hierarchical clustering analysis showed a set of 7 DEmiRs (miR-181c-5p, 744-5p, 196b-5p, 200a-5p, 152-3p, 421, 149-5p) which clustered samples according to prognosis. Network interaction analyses identified transcriptional factors (NANOG, Oct-3/4, SOX2 and c-Jun) that commonly regulate those DEmiRs. Moreover, *TGFB*, *CMYC*, *RICTOR*, *ADAM-17* and *PTEN* are some of the common targets of those DEmiRs and are more likely to be deregulated. Validated and predicted targets of these 7 DEmiRs were found enriched in relevant pathways such as "Proteoglycans in cancer", "Pathways in cancer", "miRNAs in cancer" and "Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells". Among their targets, *CMYC*, *SP1*, *ESR1* and AR are examples of hubs which presented the highest number of network interactions.
Conclusions: We found 7 DEmiRs correlated with prognosis and capable of discriminating metastatic from non-metastatic tumors. In addition, their targets are enriched in cancer-related pathways and could be potential biomarkers for prognosis in penile cancer.

8.2 Resumo publicado nos anais do *Annual Meeting of American Society of Clinical Oncology* em Chicago, Il, 2018.

ASCO Meeting Library
Sign In

Correlation of microRNA expression profile and prognosis of penile cancer: A prospective study using microarray data analysis. Add to Collection

Abstract

Authors:
 Claudio Bovolenta Murta, Jose Pontes Jr, Tatiane Katsue Furuya, Miyuki Uno, Alexis Carrasco, Laura Sichero, Luisa Lina Villa, Mauricio Cordeiro, Giuliano Guglielmetti, Rafael Coelho, Katia Ramos Moreira Leite, Miguel Srougi, Roger Chammas, William Carlos Nahas; University of São Paulo, São Paulo, Brazil; Laboratory of Medical Research, Urology Department, University of São Paulo...

[View More +](#)

Abstract Disclosures

Background:
 Penile cancer (PeC) is a rare disease that has high morbidity and mortality rates. Although a few biomarkers related to prognosis have been previously described, to date none of them was adopted in clinical practice. Our aim was to identify a molecular signature based on miRNA expression that could identify those patients with high risk for metastatic PeC.

Methods:
 We prospectively collected fresh samples of primary tumors from 11 patients with squamous cell PeC who were treated between July/15 and June/17. Five patients had localized disease (non-metastatic group) and 6 had lymph node metastases (metastatic group). RNA microarray analysis was performed using miRNA 4.0 Genechip (Affymetrix). We identified differentially expressed miRNAs (DEmiRs) comparing metastatic to non-metastatic groups using TAC Software (Affymetrix), fold change (FC) > 1.5 and p < 0.05. RT-qPCR were used to validate the findings. Their validated/predicted targets were investigated using miRTarBase 7.0, miWalk 2.0 and MetaCore 6.32 softwares.

Results:
 Twenty two DEmiRs (17 up- and 5 downregulated) were identified. Hierarchical clustering analysis showed a set of 5 DEmiRs (miR-181c-5p, 744-5p, 196b-5p, 421, 149-5p) which clustered samples according to prognosis. Results of technical validations using RT-qPCR were presented in Table 1. Network interaction analyses identified the transcriptional factors (NANOG, Oct-3/4, SOX2 and c-Jun) that commonly regulate those DEmiRs. Moreover, TGF β , CMYC, RICTOR, ADAM-17 and PTEN are common targets of those DEmiRs and are more likely to be deregulated.

Conclusions:
 We found 5 DEmiRs correlated with prognosis and capable of discriminate metastatic from non-metastatic tumors. In addition, their targets are enriched in cancer pathways and could be potential biomarkers in prognosis in PeC. Table 1.

First Author:	Claudio Bovolenta Murta, MD
Meeting:	2018 ASCO Annual Meeting
Session Title:	Publication Only: Genitourinary (Nonprostate) Cancer
Track:	Genitourinary (Nonprostate) Cancer
Subtrack:	Other GU Cancer
Abstract #:	e16590
Citation:	J Clin Oncol 36, 2018 (suppl; abstr e16590)

Penile cancers
Prospective studies

Data analysis

2018 Annual Meeting Proceedings Notices

DEmiRs able to cluster accordingly with metastatic status and their fold changes (FC) in the microarray assay and after validation with qRT-PCR.

DEmiR	Microarray		qRT-PCR	
	FC	p value	FC	p value
miR-421	2.89	0.0005	2.03	0.068
miR-149-5p	6.30	0.0022	4.37	0.068
miR-744-5p	1.65	0.0010	1.85	0.028
miR-196b-5p	1.66	0.0245	1.72	0.082
miR-181c-5p	0.63	0.0314	0.70	0.018

8.3 Pôster apresentado no "Second AACR International Conference" em São Paulo, Brasil, Setembro de 2018.

microRNA and mRNA expression profiles and their potential clinical implications in penile carcinoma

Tatiane K. Furuya¹; Claudio B. Murta²; Miyuki Uno¹; Alexis Carrasco¹; Sheila F. Faraj⁴; Laura C. Sichero¹; Luisa L. Villa¹; Rafael F. Coelho²; Giuliano B. Guglielmetti²; Mauricio D. Cordeiro²; Kátia R. Leite²; Miguel Srougi³; Roger Chammas³; William C. Nahas³; José Pontes Jr.²

¹Centro de Investigação Translacional em Oncologia (LIM24), Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (COT/ICESP) / Departamento de Radiologia e Oncologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), São Paulo, Brazil; ²Departamento de Urologia, ICESP, São Paulo, Brazil; ³Departamento de Urologia (LIM55), FMUSP, São Paulo, Brazil; ⁴Departamento de Patologia, ICESP, São Paulo, Brazil



Email: tutyfuruya@gmail.com

INTRODUCTION

- Penile cancer is a relatively rare disease but with high morbidity and mortality rates;
- Few reports have described microRNAs (miRNAs) profiles in penile cancer and they have mainly focused in their regulatory role in the tumorigenesis processes;
- Prognostic molecular markers could better stratify patients with higher chance of recurrence, avoid invasive and high risk inguinal lymphadenectomy, select patients to adjuvant treatment or lead to the development of target therapy for advanced cases.

AIM

- To identify a molecular signature based on miRNA and gene expression profiling as biomarkers for carcinogenesis, disease progression and prognosis.

METHODS

Casualty: Fresh frozen tissues (tumoral and matched adjacent non-neoplastic tissues) from 24 patients with squamous cell penile carcinoma who underwent partial or total penectomy from ICESP (2015-2018).

- **miRNAs expression profiles (N=11)** → microarray analysis using Geneschip[®] miRNA 4.0 (Affymetrix platform);
- **Validation of the DEMiRs (N=24)** → qRT-PCR using TaqMan[®] Advanced miRNA assays (Thermo Fisher Scientific);
- **mRNA expression profiles (N=24)** → qRT-PCR using 96 Delta Gene assays (Biomark HD system - Fluidigm).

Statistical and Bioinformatic analyses:

- Transcriptome Analysis Console (TAC) software (Affymetrix); TM4 MultiExperiment Viewer (MeV) 4.9 software and SPSS[®] 20.0;
- Validated and in silico predicted targets: miRTargetBase 7.0 and miWalk 2.0 softwares;
- Enrichment Pathways analysis: Enrichr software.

RESULTS AND DISCUSSION

TUMORIGENESIS MARKERS

Tumoral tissues (N=11) vs matched adjacent non-neoplastic tissues (N=11)
48 DEMiRs were identified when comparing tumoral in relation to non-neoplastic tissues:

Upregulated DEMiRs: miR-432-5p, miR-138-3p, miR-431-3p, miR-99a-5p, miR-199a-5p, miR-26a-5p, miR-181-5p, miR-382-5p, miR-145-5p, miR-143-3p, miR-199b-3p, miR-361-5p, miR-204e-5p, miR-149-5p, miR-125b-5p, miR-149-5p, miR-574-3p, miR-34a-5p, miR-183-5p, miR-495-5p, miR-379-5p, miR-30a-5p, miR-125b-2-3p, miR-30a-5p, miR-126-3p, miR-182-5p, miR-30a-5p, miR-190a-5p, miR-148-3p, let-7c-5p, miR-31-3p, miR-127-5p, miR-195-5p, miR-106-5p, miR-494-3p, miR-578a-3p, miR-31-3p, miR-145-5p, miR-181-5p, miR-221-5p, miR-182-5p, miR-31-3p, miR-145-5p

Downregulated DEMiRs: miR-181-5p, miR-204e-5p, miR-221-5p, miR-182-5p, miR-31-3p, miR-145-5p

Figure 1: Hierarchical clustering analysis showing that the 8 DEMiRs chosen for validation were able to cluster samples according to group. N: number of patients. TAC software.

Figure 2: Hierarchical clustering analysis showing that the 7 DEMiRs chosen for validation were able to differentiate penile carcinoma samples according to lymph node metastasis. N: number of patients. TAC software.

Figure 3: The box-plots represent the comparison of the expression levels of the 8 selected DEMiRs in the tumor tissues (T) in relation to their matched adjacent non-neoplastic tissues (N), in the validation set of samples. miR-125b-5p and miR-432-5p were used as endogenous controls. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

Figure 4: The box-plots represent the comparison of the expression levels of the 7 selected DEMiRs in the metastatic in relation to the non-metastatic groups, in the validation set of samples. miR-125b-5p and miR-432-5p were used as endogenous controls. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

PROGNOSTIC MARKERS

Lymph node metastatic (N=6) vs non-metastatic groups (N=6)
22 DEMiRs were identified when comparing metastatic in relation to non-metastatic groups:

Upregulated DEMiRs: miR-7641, miR-196b-5p, miR-4750-5p, miR-1293, miR-877-5p, miR-4428, miR-200a-5p, miR-4443, miR-1296-5p, miR-1911-5p, miR-151-5p, miR-181c-5p, miR-4446-5p, miR-2110, miR-1911-5p, miR-4769-5p, miR-146-5p, miR-5100, miR-744-5p, miR-7152-3p

Downregulated DEMiRs: miR-3648, miR-196b-5p, miR-4750-5p, miR-877-5p, miR-4428, miR-200a-5p, miR-151-5p, miR-2110, miR-1911-5p, miR-4769-5p, miR-146-5p, miR-744-5p, miR-7152-3p

Table 1: Clinicopathological features of the penile carcinoma cases.

Variables	Categories	Samples used in microarray (N%)	Validation set of samples (N%)
N patients		11	24
		61 (52.848)	61 (25.848)
Age (years)	≤ 5 cm	6 (55.0)	16 (66.7)
	> 5 cm	5 (45.0)	8 (33.3)
Tumor Size (cm)	No	8 (73.0)	16 (66.7)
	Yes	3 (27.0)	8 (33.3)
HPV infection	I	2 (18.0)	3 (12.5)
	II	6 (55.0)	13 (54.2)
	III	3 (27.0)	8 (33.3)
pT Stage	T1	3 (27.0)	4 (16.7)
	T2	4 (36.0)	13 (54.2)
	T3	4 (36.0)	7 (29.2)
Lymphovascular Invasion	No	8 (73.0)	18 (75.0)
	Yes	3 (27.0)	6 (25.0)
Perineural Invasion	No	7 (64.0)	14 (58.3)
	Yes	4 (36.0)	10 (41.7)
Risk for lymph node metastasis	Low	1 (9.0)	1 (4.2)
	Intermediate/High	2 (18.0)	3 (12.5)
		8 (73.0)	20 (83.3)

Table 2: Comparison of the Fold Change values of the 8 DEMiRs between the microarray and qRT-PCR techniques.

DEMiR	Microarray	FC	qRT-PCR	p
miR-432-5p	0.074	0.0048*	0.337	<0.001**
miR-138-3p	0.117	0.0079*	0.344	<0.001**
miR-145-5p	0.213	0.0067*	0.802	<0.001**
miR-149-5p	0.289	0.0508*	0.671	0.0022*
miR-204e-5p	2.928	0.0048*	3.384	<0.001**
miR-125b-5p	6.589	0.0031*	5.832	<0.001**
miR-31-3p	12.38	0.0002*	59.76	<0.001**
miR-145-5p	38.32	0.0048*	116.88	<0.001**

Table 3: Comparison of the Fold Change values of the 7 DEMiRs between the microarray and qRT-PCR techniques.

DEMiR	Microarray	FC	p	FC	p
miR-181c-5p	0.63	0.0314*	1.12	0.021*	
miR-744-5p	1.65	0.0018*	1.61	0.003*	
miR-196b-5p	1.60	0.0248*	1.83	0.030*	
miR-200a-5p	2.10	0.0478*	1.88	0.086*	
miR-152-3p	2.60	0.0325*	1.48	0.243	
miR-41	2.89	<0.001**	2.21	0.065*	
miR-146-5p	6.30	0.0022*	1.92	0.175	

Validation of the DEMiRs by qRT-PCR

Association of miRNAs and mRNAs expression profiles with clinicopathological features and survival curves

- Significant associations were identified when comparing the 13 miRNAs and the 96 transcripts expression levels with the studied clinicopathological variables:
- For survival analysis, the considered endpoint was the event date by cancer or last follow-up date; None of the miRNA expression levels was associated with the survival curves.
- High expression of *CCND1*, *EGFR*, *MYC* and *SNAI2* genes were associated to a shorter survival time. Cox Regression analysis showed that *SNAI2* was able to predict prognosis (Hazard Ratio (HR) = 9.93; 95% Confidence Interval (95% CI) = 1.15-85.54).

mRNA expression profiles (96 genes) by qRT-PCR

The 96 genes were selected based on their prediction as potential targets for the identified DEMiRs (both for tumorigenesis and prognosis) using the appropriate computational tools and/or genes previously described as deregulated in penile cancer.

Table 3: List of the 37 DEMiRs identified in tumoral tissues when compared to their matched adjacent non-neoplastic tissues.

DEMiR	FC	FC	FC	FC	FC	FC	FC	FC	FC
miR-432-5p	0.074	0.0048*	0.337	0.001**					
miR-138-3p	0.117	0.0079*	0.344	0.001**					
miR-145-5p	0.213	0.0067*	0.802	0.001**					
miR-149-5p	0.289	0.0508*	0.671	0.0022*					
miR-204e-5p	2.928	0.0048*	3.384	0.001**					
miR-125b-5p	6.589	0.0031*	5.832	0.001**					
miR-31-3p	12.38	0.0002*	59.76	0.001**					
miR-145-5p	38.32	0.0048*	116.88	0.001**					

37 genes were identified as deregulated in tumoral tissues compared to non-neoplastic tissues (N=24):

Upregulated genes: *CCND1*, *EGFR*, *MYC*, *SNAI2*, *CDKN1A*, *CDKN1B*, *CDKN1C*, *CDKN1D*, *CDKN1E*, *CDKN1F*, *CDKN1G*, *CDKN1H*, *CDKN1I*, *CDKN1J*, *CDKN1K*, *CDKN1L*, *CDKN1M*, *CDKN1N*, *CDKN1O*, *CDKN1P*, *CDKN1Q*, *CDKN1R*, *CDKN1S*, *CDKN1T*, *CDKN1U*, *CDKN1V*, *CDKN1W*, *CDKN1X*, *CDKN1Y*, *CDKN1Z*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *CDKN2C*, *CDKN2D*, *CDKN2E*, *CDKN2F*, *CDKN2G*, *CDKN2H*, *CDKN2I*, *CDKN2J*, *CDKN2K*, *CDKN2L*, *CDKN2M*, *CDKN2N*, *CDKN2O*, *CDKN2P*, *CDKN2Q*, *CDKN2R*, *CDKN2S*, *CDKN2T*, *CDKN2U*, *CDKN2V*, *CDKN2W*, *CDKN2X*, *CDKN2Y*, *CDKN2Z*, *CDKN3A*, *CDKN3B*, *CDKN3C*, *CDKN3D*, *CDKN3E*, *CDKN3F*, *CDKN3G*, *CDKN3H*, *CDKN3I*, *CDKN3J*, *CDKN3K*, *CDKN3L*, *CDKN3M*, *CDKN3N*, *CDKN3O*, *CDKN3P*, *CDKN3Q*, *CDKN3R*, *CDKN3S*, *CDKN3T*, *CDKN3U*, *CDKN3V*, *CDKN3W*, *CDKN3X*, *CDKN3Y*, *CDKN3Z*, *CDKN4A*, *CDKN4B*, *CDKN4C*, *CDKN4D*, *CDKN4E*, *CDKN4F*, *CDKN4G*, *CDKN4H*, *CDKN4I*, *CDKN4J*, *CDKN4K*, *CDKN4L*, *CDKN4M*, *CDKN4N*, *CDKN4O*, *CDKN4P*, *CDKN4Q*, *CDKN4R*, *CDKN4S*, *CDKN4T*, *CDKN4U*, *CDKN4V*, *CDKN4W*, *CDKN4X*, *CDKN4Y*, *CDKN4Z*, *CDKN5A*, *CDKN5B*, *CDKN5C*, *CDKN5D*, *CDKN5E*, *CDKN5F*, *CDKN5G*, *CDKN5H*, *CDKN5I*, *CDKN5J*, *CDKN5K*, *CDKN5L*, *CDKN5M*, *CDKN5N*, *CDKN5O*, *CDKN5P*, *CDKN5Q*, *CDKN5R*, *CDKN5S*, *CDKN5T*, *CDKN5U*, *CDKN5V*, *CDKN5W*, *CDKN5X*, *CDKN5Y*, *CDKN5Z*, *CDKN6A*, *CDKN6B*, *CDKN6C*, *CDKN6D*, *CDKN6E*, *CDKN6F*, *CDKN6G*, *CDKN6H*, *CDKN6I*, *CDKN6J*, *CDKN6K*, *CDKN6L*, *CDKN6M*, *CDKN6N*, *CDKN6O*, *CDKN6P*, *CDKN6Q*, *CDKN6R*, *CDKN6S*, *CDKN6T*, *CDKN6U*, *CDKN6V*, *CDKN6W*, *CDKN6X*, *CDKN6Y*, *CDKN6Z*, *CDKN7A*, *CDKN7B*, *CDKN7C*, *CDKN7D*, *CDKN7E*, *CDKN7F*, *CDKN7G*, *CDKN7H*, *CDKN7I*, *CDKN7J*, *CDKN7K*, *CDKN7L*, *CDKN7M*, *CDKN7N*, *CDKN7O*, *CDKN7P*, *CDKN7Q*, *CDKN7R*, *CDKN7S*, *CDKN7T*, *CDKN7U*, *CDKN7V*, *CDKN7W*, *CDKN7X*, *CDKN7Y*, *CDKN7Z*, *CDKN8A*, *CDKN8B*, *CDKN8C*, *CDKN8D*, *CDKN8E*, *CDKN8F*, *CDKN8G*, *CDKN8H*, *CDKN8I*, *CDKN8J*, *CDKN8K*, *CDKN8L*, *CDKN8M*, *CDKN8N*, *CDKN8O*, *CDKN8P*, *CDKN8Q*, *CDKN8R*, *CDKN8S*, *CDKN8T*, *CDKN8U*, *CDKN8V*, *CDKN8W*, *CDKN8X*, *CDKN8Y*, *CDKN8Z*, *CDKN9A*, *CDKN9B*, *CDKN9C*, *CDKN9D*, *CDKN9E*, *CDKN9F*, *CDKN9G*, *CDKN9H*, *CDKN9I*, *CDKN9J*, *CDKN9K*, *CDKN9L*, *CDKN9M*, *CDKN9N*, *CDKN9O*, *CDKN9P*, *CDKN9Q*, *CDKN9R*, *CDKN9S*, *CDKN9T*, *CDKN9U*, *CDKN9V*, *CDKN9W*, *CDKN9X*, *CDKN9Y*, *CDKN9Z*, *CDKN10A*, *CDKN10B*, *CDKN10C*, *CDKN10D*, *CDKN10E*, *CDKN10F*, *CDKN10G*, *CDKN10H*, *CDKN10I*, *CDKN10J*, *CDKN10K*, *CDKN10L*, *CDKN10M*, *CDKN10N*, *CDKN10O*, *CDKN10P*, *CDKN10Q*, *CDKN10R*, *CDKN10S*, *CDKN10T*, *CDKN10U*, *CDKN10V*, *CDKN10W*, *CDKN10X*, *CDKN10Y*, *CDKN10Z*, *CDKN11A*, *CDKN11B*, *CDKN11C*, *CDKN11D*, *CDKN11E*, *CDKN11F*, *CDKN11G*, *CDKN11H*, *CDKN11I*, *CDKN11J*, *CDKN11K*, *CDKN11L*, *CDKN11M*, *CDKN11N*, *CDKN11O*, *CDKN11P*, *CDKN11Q*, *CDKN11R*, *CDKN11S*, *CDKN11T*, *CDKN11U*, *CDKN11V*, *CDKN11W*, *CDKN11X*, *CDKN11Y*, *CDKN11Z*, *CDKN12A*, *CDKN12B*, *CDKN12C*, *CDKN12D*, *CDKN12E*, *CDKN12F*, *CDKN12G*, *CDKN12H*, *CDKN12I*, *CDKN12J*, *CDKN12K*, *CDKN12L*, *CDKN12M*, *CDKN12N*, *CDKN12O*, *CDKN12P*, *CDKN12Q*, *CDKN12R*, *CDKN12S*, *CDKN12T*, *CDKN12U*, *CDKN12V*, *CDKN12W*, *CDKN12X*, *CDKN12Y*, *CDKN12Z*, *CDKN13A*, *CDKN13B*, *CDKN13C*, *CDKN13D*, *CDKN13E*, *CDKN13F*, *CDKN13G*, *CDKN13H*, *CDKN13I*, *CDKN13J*, *CDKN13K*, *CDKN13L*, *CDKN13M*, *CDKN13N*, *CDKN13O*, *CDKN13P*, *CDKN13Q*, *CDKN13R*, *CDKN13S*, *CDKN13T*, *CDKN13U*, *CDKN13V*, *CDKN13W*, *CDKN13X*, *CDKN13Y*, *CDKN13Z*, *CDKN14A*, *CDKN14B*, *CDKN14C*, *CDKN14D*, *CDKN14E*, *CDKN14F*, *CDKN14G*, *CDKN14H*, *CDKN14I*, *CDKN14J*, *CDKN14K*, *CDKN14L*, *CDKN14M*, *CDKN14N*, *CDKN14O*, *CDKN14P*, *CDKN14Q*, *CDKN14R*, *CDKN14S*, *CDKN14T*, *CDKN14U*, *CDKN14V*, *CDKN14W*, *CDKN14X*, *CDKN14Y*, *CDKN14Z*, *CDKN15A*, *CDKN15B*, *CDKN15C*, *CDKN15D*, *CDKN15E*, *CDKN15F*, *CDKN15G*, *CDKN15H*, *CDKN15I*, *CDKN15J*, *CDKN15K*, *CDKN15L*, *CDKN15M*, *CDKN15N*, *CDKN15O*, *CDKN15P*, *CDKN15Q*, *CDKN15R*, *CDKN15S*, *CDKN15T*, *CDKN15U*, *CDKN15V*, *CDKN15W*, *CDKN15X*, *CDKN15Y*, *CDKN15Z*, *CDKN16A*, *CDKN16B*, *CDKN16C*, *CDKN16D*, *CDKN16E*, *CDKN16F*, *CDKN16G*, *CDKN16H*, *CDKN16I*, *CDKN16J*, *CDKN16K*, *CDKN16L*, *CDKN16M*, *CDKN16N*, *CDKN16O*, *CDKN16P*, *CDKN16Q*, *CDKN16R*, *CDKN16S*, *CDKN16T*, *CDKN16U*, *CDKN16V*, *CDKN16W*, *CDKN16X*, *CDKN16Y*, *CDKN16Z*, *CDKN17A*, *CDKN17B*, *CDKN17C*, *CDKN17D*, *CDKN17E*, *CDKN17F*, *CDKN17G*, *CDKN17H*, *CDKN17I*, *CDKN17J*, *CDKN17K*, *CDKN17L*, *CDKN17M*, *CDKN17N*, *CDKN17O*, *CDKN17P*, *CDKN17Q*, *CDKN17R*, *CDKN17S*, *CDKN17T*, *CDKN17U*, *CDKN17V*, *CDKN17W*, *CDKN17X*, *CDKN17Y*, *CDKN17Z*, *CDKN18A*, *CDKN18B*, *CDKN18C*, *CDKN18D*, *CDKN18E*, *CDKN18F*, *CDKN18G*, *CDKN18H*, *CDKN18I*, *CDKN18J*, *CDKN18K*, *CDKN18L*, *CDKN18M*, *CDKN18N*, *CDKN18O*, *CDKN18P*, *CDKN18Q*, *CDKN18R*, *CDKN18S*, *CDKN18T*, *CDKN18U*, *CDKN18V*, *CDKN18W*, *CDKN18X*, *CDKN18Y*, *CDKN18Z*, *CDKN19A*, *CDKN19B*, *CDKN19C*, *CDKN19D*, *CDKN19E*, *CDKN19F*, *CDKN19G*, *CDKN19H*, *CDKN19I*, *CDKN19J*, *CDKN19K*, *CDKN19L*, *CDKN19M*, *CDKN19N*, *CDKN19O*, *CDKN19P*, *CDKN19Q*, *CDKN19R*, *CDKN19S*, *CDKN19T*, *CDKN19U*, *CDKN19V*, *CDKN19W*, *CDKN19X*, *CDKN19Y*, *CDKN19Z*, *CDKN20A*, *CDKN20B*, *CDKN20C*, *CDKN20D*, *CDKN20E*, *CDKN20F*, *CDKN20G*, *CDKN20H*, *CDKN20I*, *CDKN20J*, *CDKN20K*, *CDKN20L*, *CDKN20M*, *CDKN20N*, *CDKN20O*, *CDKN20P*, *CDKN20Q*, *CDKN20R*, *CDKN20S*, *CDKN20T*, *CDKN20U*, *CDKN20V*, *CDKN20W*, *CDKN20X*, *CDKN20Y*, *CDKN20Z*, *CDKN21A*, *CDKN21B*, *CDKN21C*, *CDKN21D*, *CDKN21E*, *CDKN21F*, *CDKN21G*, *CDKN21H*, *CDKN21I*, *CDKN21J*, *CDKN21K*, *CDKN21L*, *CDKN21M*, *CDKN21N*, *CDKN21O*, *CDKN21P*, *CDKN21Q*, *CDKN21R*, *CDKN21S*, *CDKN21T*, *CDKN21U*, *CDKN21V*, *CDKN21W*, *CDKN21X*, *CDKN21Y*, *CDKN21Z*, *CDKN22A*, *CDKN22B*, *CDKN22C*, *CDKN22D*, *CDKN22E*, *CDKN22F*, *CDKN22G*, *CDKN22H*, *CDKN22I*, *CDKN22J*, *CDKN22K*, *CDKN22L*, *CDKN22M*, *CDKN22N*, *CDKN22O*, *CDKN22P*, *CDKN22Q*, *CDKN22R*, *CDKN22S*, *CDKN22T*, *CDKN22U*, *CDKN22V*, *CDKN22W*, *CDKN22X*, *CDKN22Y*, *CDKN22Z*, *CDKN23A*, *CDKN23B*, *CDKN23C*, *CDKN23D*, *CDKN23E*, *CDKN23F*, *CDKN23G*, *CDKN23H*, *CDKN23I*, *CDKN23J*, *CDKN23K*, *CDKN23L*, *CDKN23M*, *CDKN23N*, *CDKN23O*, *CDKN23P*, *CDKN23Q*, *CDKN23*

8.4 Pôster apresentado no *American Urological Association Annual Meeting* em Chicago, IL, Maio de 2019.

19-4635

Correlation between microRNAs and mRNA expression profiles with the prognosis of clinically localized penile cancer.

Claudio Murta*, Sao Paulo, Brazil, José Pontes Jr, Tatiane Furuya, Miyuki Uno, Alexis Carrasco, Rafael Coelho, Giuliano Guglielmetti, Maurício Cordeiro, Sheila Faraj, Katia Leite, Laura Sichero, Luisa Villa, Miguel Srougi, Roger Chammass, William Nahas, São Paulo, Brazil

INTRODUCTION AND OBJECTIVES: Penile cancer (PeC) is a rare disease with high morbidity and mortality. Few studies have investigated miRNAs and their role in regulating gene networks and signaling pathways in PeC. Therefore, we aimed to identify a molecular signature based on miRNA and gene expression profiling related to carcinogenesis and prognosis in order to describe new biomarkers in PeC.

METHODS: We prospectively collected fresh samples of primary tumors (TT) and adjacent non-neoplastic tissue (NT) from 11 patients who underwent surgical treatment. 5 patients had localized disease (non-metastatic group) and 6 had inguinal lymph node metastases (metastatic group). RNA was purified and microarray analysis was performed using miRNA 4.0 Genechip (Affymetrix). We identified the differentially expressed miRNAs (DEmiRs) comparing TT of metastatic to non-metastatic patients and the DEmiRs comparing TT to NT of the 11 patients using TAC Software. The DEmiRs expression were validated in an expanded sample of 24 patients by qRT-PCR using TaqMan assays. The DEmiRs predicted targets of both comparisons were investigated using miRTarBase, mirWalk and MetaCore softwares. We evaluated these target transcripts expression using a high-throughput nanofluidic qRT-PCR platform. We correlated the DEmiR and mRNA expression to the classic prognostic factors and cancer specific survival.

RESULTS: The mean follow-up time was 16.3 months. Half of patients developed metastasis to inguinal nodes and 7 have died of the disease. We identified and validated 8 DEmiRs (miR31-5p, miR31-3p, miR224-5p, miR200a-5p, miR432-5p, miR487b-3p, miR30a-5p, miR149-5p) and 35 differentially expressed genes (DEGs) when comparing TT vs NT. We validated the DEmiRs miR421 and miR744-5p and 7 DEGs (CCND1, EGFR, ENTPD5, HOXA10, IGF1R, MYC, SNAI2) at the metastatic vs non-metastatic comparison. The miR31-3p down expression was associated with metastasis ($p=0.043$). No miRNA was able to predict mortality, although miR421 showed a marginal association ($p=0.07$). Overexpression of MMP1 was associated with higher size ($p=0.042$), grade ($p=0.045$), T stage ($p=0.018$), perineural invasion ($p=0.007$), and metastasis ($p=0.018$). MMP1 is regulated by miR145-5p which is down-regulated in TT (FC=28). The overexpression of CCND1 ($p=0.006$) and EGFR ($p=0.001$) was related to higher grade; and MMP9 overexpression with microvascular invasion ($p=0.044$). The CCND1, EGFR, MYC and SNAI2 expressions were significantly associated with worst results at specific survival curves. We also observed that SNAI2 expression was associated with cancer-specific survival HR 9.93; 95% CI, 1.153-85.542; $p=0.037$.

CONCLUSIONS: We described a miRNA and mRNA expression profile associated to carcinogenesis and worst prognosis of penile cancer. We postulated that miR31-5p, MMP1, CCND1, EGFR, MYC, MMP9 and SNAI2 expressions are potential biomarkers for prognosis in PeC.

Source of Funding: FAPESP 2015/17097-2

8.5 Manuscrito publicado na revista *Cancers* em setembro de 2021

Article

Disruption of miRNA-mRNA Networks Defines Novel Molecular Signatures for Penile Carcinogenesis

Tatiane Katsue Furuya ^{1,*}, Claudio Bovolenta Murta ^{2,*}, Alexis Germán Murillo Carrasco ¹, Miyuki Uno ¹, Laura Sichero ¹, Luisa Lina Villa ¹, Leonardo Cardilli ³, Rafael Ferreira Coelho ², Giuliano Betoni Guglielmetti ², Mauricio Dener Cordeiro ², Katia Ramos Moreira Leite ², William Carlos Nahas ², Roger Chammas ¹ and José Pontes, Jr. ²

¹ Center for Translational Research in Oncology (LIM24), Instituto do Cancer do Estado de Sao Paulo (ICESP), Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo (HCFMUSP), Sao Paulo CEP 01246-000, SP, Brazil; agmurillo@usp.br (A.G.M.C.); miyuki.uno@hc.fm.usp.br (M.U.); laura.sichero@hc.fm.usp.br (L.S.); lvilla@hc.fm.usp.br (L.L.V.); rchammas@usp.br (R.C.); rafael.coelho@hc.fm.usp.br (R.F.C.); giuliano.betoni@hc.fm.usp.br (G.B.G.); mauricio.cordeiro@hc.fm.usp.br (M.D.C.); katiaramos@usp.br (K.R.M.L.); wnahas@uol.com.br (W.C.N.); dojppjr@uol.com.br (J.P.J.)

² Departamento de Urologia, ICESP, HCFMUSP, Sao Paulo CEP 01246-000, SP, Brazil; rafael.coelho@hc.fm.usp.br (R.F.C.); giuliano.betoni@hc.fm.usp.br (G.B.G.); mauricio.cordeiro@hc.fm.usp.br (M.D.C.); katiaramos@usp.br (K.R.M.L.); wnahas@uol.com.br (W.C.N.); dojppjr@uol.com.br (J.P.J.)

³ Departamento de Patologia, ICESP, HCFMUSP, Sao Paulo CEP 01246-000, SP, Brazil; leonardo.cardilli@hc.fm.usp.br

* Correspondence: tatiane_furuya@usp.br (T.K.F.); cbmurta@uol.com.br (C.B.M.)

† Shared first co-authorship.



Citation: Furuya, T.K.; Murta, C.B.; Murillo Carrasco, A.G.; Uno, M.; Sichero, L.; Villa, L.L.; Cardilli, L.; Coelho, R.F.; Guglielmetti, G.B.; Cordeiro, M.D.; et al. Disruption of miRNA-mRNA Networks Defines Novel Molecular Signatures for Penile Carcinogenesis. *Cancers* 2021, 13, 4745. <https://doi.org/10.3390/cancers13194745>

Academic Editors: Kerstin Junker and David Wong

Received: 1 September 2021

Accepted: 18 September 2021

Published: 23 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: As there are still no biomarkers reported in clinical practice in penile cancer (PeC), we aimed to investigate and validate molecular signatures based on miRNA and mRNA profiles to identify molecular drivers and pathways involved in PeC tumorigenesis. We found eight DEmiRs and 37 DEGs comparing tumoral tissues (TT) paired with non-neoplastic tissues (NNT) of PeC patients. Four downregulated DEmiRs (miR-30a-5p, miR-432-5p, miR-487b-3p, and miR-145-5p) and six upregulated DEGs (*IL1A*, *MCM2*, *MMP1*, *MMP12*, *SFN* and *VEGFA*) were identified as potential biomarkers in PeC by their capacity of discriminating TT and NNT with accuracy. Furthermore, we performed an analysis of miRNA-mRNA interaction and found disruption in the dynamics of the regulation of eight pairs during tumor development that have never been described in PeC. Taken together, our findings contribute to a better understanding of the regulatory roles of miRNAs and altered transcripts levels in penile carcinogenesis.

Abstract: Penile cancer (PeC) carcinogenesis is not fully understood, and no biomarkers are reported in clinical practice. We aimed to investigate molecular signatures based on miRNA and mRNA and perform an integrative analysis to identify molecular drivers and pathways for PeC development. Affymetrix miRNA microarray was used to identify differentially expressed miRNAs (DEmiRs) comparing 11 tumoral tissues (TT) paired with non-neoplastic tissues (NNT) with further validation in an independent cohort ($n = 13$). We also investigated the mRNA expression of 83 genes in the total sample. Experimentally validated targets of DEmiRs, miRNA-mRNA networks, and enriched pathways were evaluated in silico. Eight out of 69 DEmiRs identified by microarray analysis were validated by qRT-PCR (miR-145-5p, miR-432-5p, miR-487b-3p, miR-30a-5p, miR-200a-5p, miR-224-5p, miR-31-3p and miR-31-5p). Furthermore, 37 differentially expressed genes (DEGs) were identified when comparing TT and NNT. We identified four downregulated DEmiRs (miR-30a-5p, miR-432-5p, miR-487b-3p, and miR-145-5p) and six upregulated DEGs (*IL1A*, *MCM2*, *MMP1*, *MMP12*, *SFN* and *VEGFA*) as potential biomarkers in PeC by their capacity of discriminating TT and NNT with accuracy. The integration analysis showed eight dysregulated miRNA-mRNA pairs in penile carcinogenesis. Taken together, our findings contribute to a better understanding of the regulatory roles of miRNAs and altered transcripts levels in penile carcinogenesis.