

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

**ANÁLISE DA ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS
DE GENES ENVOLVIDOS NA VIA DE SINALIZAÇÃO
CELULAR EGFR/PI3K/AKT/PTEN EM CÂNCER
PENIANO**

MARTA REGINA DE CASTRO BELFORT

São Luís

2017

MARTA REGINA DE CASTRO BELFORT

**ANÁLISE DA ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS
DE GENES ENVOLVIDOS NA VIA DE SINALIZAÇÃO
CELULAR EGFR/PI3K/AKT/PTEN EM CÂNCER
PENIANO**

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

Orientadora: Profa. Dra. Silma Regina Ferreira Pereira

Coorientador: Prof. Dr. Gyl Eanes Barros Silva

São Luís

2017

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

Belfort, Marta Regina de Castro.

ANÁLISE DA ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DE GENES
ENVOLVIDOS NA VIA DE SINALIZAÇÃO CELULAR
EGFR/PI3K/AKT/PTEN EM CÂNCER PENIANO / Marta Regina de
Castro Belfort. - 2017.

73 f.

Coorientador(a): Gyl Eanes Barros Silva.

Orientador(a): Silma Regina Ferreira Pereira.

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

1. Biomarcador. 2. Carcinoma de células escamosas. 3.
Mutação. 4. Tumorigênese. I. Pereira, Silma Regina
Ferreira. II. Silva, Gyl Eanes Barros. III. Título.

MARTA REGINA DE CASTRO BELFORT

**ANÁLISE DA ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS
DE GENES ENVOLVIDOS NA VIA DE SINALIZAÇÃO
CELULAR EGFR/PI3K/AKT/PTEN EM CÂNCER
PENIANO**

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

Ciências da Saúde.

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Silma Regina Ferreira Pereira
Universidade Federal do Maranhão

Profº. Dr. André Salim Khayat
Universidade Federal do Pará

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

Profº. Dr. Paulo Vitor Soeiro Pereira
Universidade Federal do Maranhão

“E, tudo o que pedirdes em oração, crendo, o receberéis.”
Mt 21,22

Dedico

A Deus por ser meu protetor e abençoar meu caminho.

Aos meus amados pais Maria e Isaac por tamanho amor por mim.

Aos meus irmãos Marcia e Isaac Filho pelo companheirismo, carinho e ternura.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por sempre segurar a minha mão e permitir a realização de um grande sonho.

A minha fortaleza- meus amados pais: **Maria Belfort** e **Isaac Belfort**, que durante esses anos distantes nunca deixaram de me apoiar. Mãe, minha luz, obrigada por todas as orações, incentivo e por me ensinar que a fé nos fortalece. Pai amado, obrigada por acreditar em mim em todos os momentos, por todas as palavras de ternura e abraços apertados. Obrigada por todos os valores ensinados e por ter vocês em minha vida. Dedico a vocês essa dissertação.

Aos meus queridos irmãos **Marcia** e **Isaac Filho**, por todas as palavras de carinho e companheirismo. Vocês me completam como pessoa. São meus orgulhos.

Ana Carolina dias, minha irmã do coração, não tenho palavras para definir minha gratidão! Lutas, desesperos e alegrias. Carol muito obrigada pela amizade e por me ouvir incansavelmente. Minha amiga e minha psicóloga do coração. Amo-te.

Aos demais familiares, obrigada pela confiança.

A minha orientadora **Silma Regina Ferreira Pereira**, obrigada por tudo! Agradeço por me orientar nesses sete anos e por acreditar em mim. Nunca esquecerei dos seus ensinamentos em minha vida profissional.

Ao meu coorientador **Gyl Eanes Barros Silva**, muito obrigada por me receber de braços abertos no LIME e por acreditar no meu trabalho. Foi um imenso prazer trabalhar com você e toda sua equipe.

Ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular, em especial:

-**Santana Viegas**, minha mãezinha do coração, obrigada por cada abraço, conselho e por estar presente nos momentos mais difíceis e felizes dessa caminhada.

-**Juliana Melo**, margaridinha que o mestrado me deu. Obrigada pelo enorme apoio nessa caminhada, por cada gesto de afeto e doçura.

-**Vanessa Moreira**, muito obrigada por me ajudar em todos os momentos desta batalha. Agradeço também a sua mãezinha pela grande consideração que tem por mim.

-**Jaqueline Pinho**, obrigada por estar sempre ao meu lado e pelas risadas que faziam meus dias mais alegres.

-**Augusto Júnior**, obrigada imensamente por toda a ajuda prestada. Você tem um grande potencial!

Ao Laboratório de Imunoflorescência e Microscopia Eletrônica, em especial:

-**Victor Maulén**, o chileno mais brasileiro que conheci! Foi um imenso prazer conviver com você. Obrigada por todos os ensinamentos, por cada palavra de afeto, pela paciência e acima de tudo pela humildade.

-**Nadja Gaido e Rayane Pessoa**, muito obrigada por terem me acolhido e por terem tornado meus dias mais felizes. Adoro vocês!

As amigas que a Biologia me deu, em especial: **Ana Paula Cunha, Gessica Marinho e Elaine Píancó**. Obrigada pelo apoio. Vocês moram no meu coração!

A todos os **pacientes** voluntários, muito obrigada pela grande contribuição!

A equipe médica e ao **Hospital Aldenora Bello e Hospital Universitário** pelas coletas e acolhida aos pacientes.

A **Georgetown University (EUA)**, pela grande parceria. Em equipe somos mais! Muito obrigada.

A **FAPEMA** pelo financiamento do projeto.

Ao **CNPq** pela bolsa concedida durante o curso.

À **UFMA**, junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

RESUMO

Câncer de pênis (CaPe) é uma neoplasia rara em países desenvolvidos, entretanto, sua incidência é elevada em países subdesenvolvidos. No Brasil, as regiões Norte e Nordeste são as regiões com os maiores números de casos da doença. Dentre os fatores de risco, destaca-se a má higiene do órgão genital, fimose, inflamação crônica e infecção pelo papilomavírus-humano (HPV). Tem sido reportada alterações na via de sinalização celular PI3K/AKT/PTEN em diversas neoplasias malignas, entretanto, pouco se sabe sobre o envolvimento dessa via nos tumores de pênis. Assim, buscou-se neste trabalho verificar o papel da infecção por HPV e a ocorrência de alteração no número de cópias (CNAs) em genes da via de sinalização controlada por receptores dos fatores de crescimento e PI3K, em uma amostra caracterizada por tumor avançado e alta frequência de HPV de alto risco. Para isso, foram coletadas amostras de tecido tumoral (fresco e de tecido fixado com formalina e embebido em parafina - FFPE) de 34 pacientes provenientes de dois hospitais de referência, Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Belo (IMOAB) e o Hospital Universitário Presidente Dutra da Universidade Federal do Maranhão (HU-UFMA). As amostras de tumor fresco foram submetidas a detecção e genotipagem de HPV por Nested PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e sequenciamento direto. As análises de CNAs foram realizadas em amostras de FFPE, HPV positivas (91,2%), das quais 88,2% eram de alto risco oncogênico. Utilizou-se o ensaio TaqMan® Copy Number Assays (Life Technologies™) e o software CopyCaller versão 2.0 para determinação do número de cópias dos genes *EGFR*, *HER3*, *HER4*, *AKT1*, *AKT2*, *PIK3CA* e *PTEN*. Aumento de 3 e 4 cópias foi considerado ganho, enquanto aumento de 5 ou mais cópias foi considerado amplificação. A presença de uma única cópia gênica foi nomeada perda, enquanto a ausência de duas cópias foi nomeada deleção. Os parâmetros clínicos e histopatológicos foram analisados quanto a presença de HPV e também quanto a CNAs. A via de sinalização celular EGFR/PI3K/AKT/PTEN revelou-se altamente alterada nos tumores de pênis. Observou-se que 100% dos tumores apresentaram aumento de número de cópias do gene *HER3*. Destes, 93,9% apresentaram-se amplificados, sendo que 84,4% apresentavam 10 ou mais cópias. O gene *EGFR* apresentou aumento de cópias em 87,8% das amostras, das quais 65,6% eram amplificações, sendo que 48,2% apresentavam mais de 10 cópias. Além desses, os genes *HER4* e *AKT1* também apresentaram aumento de cópias gênicas, em 20,6% e 15%, respectivamente. *AKT1* apresentou maior porcentagem de tumores com número normal de cópias (78,8%). Por outro lado, os genes *PIK3CA*, *HER4*, *PTEN* e *AKT2* apresentaram maiores frequências de amostras com deleções, com 56%, 52,9%, 39% e 36%, respectivamente. As perdas também foram frequentes nos tumores, de modo que os genes *AKT2*, *PTEN* e *PIK3CA* apresentaram-se em heterozigose em 60,6%, 54,5% e 37,5%, respectivamente. Nossos dados mostram a ocorrência de alterações genéticas que podem justificar a expressão diferencial dos receptores de fatores de crescimento e de genes *downstream* da via PI3K/AKT em carcinoma peniano. No entanto, não foi encontrada associação entre CNAs e as variáveis clínicas e histopatológicas. Por outro lado, considerando-se a alta frequência de HPV nos tumores avaliados, levanta-se a possibilidade de haver uma relação entre a integração do HPV no genoma do hospedeiro e a ocorrência de CNAs em CaPe. Finalmente, destacamos a alta frequência de tumores com amplificações em *HER3* e *EGFR*, abrindo a possibilidade desses marcadores serem utilizados como alvos para terapias específicas em CaPe.

Palavras-chave: Mutação; Biomarcador; Tumorigênese; Carcinoma de células escamosas.

ABSTRACT

Penile cancer (PeCa) is a rare neoplasm in developed countries; however, its incidence is high in underdeveloped countries. In Brazil, regions North and Northeast are those with the higher number of cases for the disease. Among the factors associated with this neoplasm we highlight: poor hygiene, phimosis, chronic inflammation and infection by human papilloma virus (HPV). Changes in the PI3K/AKT/PTEN cell signaling pathway have been reported for several malign neoplasms, but little is known about the involvement of this pathway in penile tumors. Thus, the aim of this study was to verify the role of HPV infection and the occurrence of copy number alterations (CNA) in genes from the signaling pathway mediated by receptors of growth factors and PI3K in a population characterized by advanced tumors and high frequency of high risk HPV. To achieve that, we collected tumor tissue samples (both fresh and in formalin-fixed paraffin-embedded tissue-FFPE) from 34 patients from two reference hospitals: Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Belo (IMOAB) and the Hospital Universitário Presidente Dutra from the Universidade Federal do Maranhão (HU-UFMA). Fresh tumors were submitted to detection and genotyping of HPV by Nested PCR (*Polymerase Chain Reaction*) and direct sequencing. CNA analyzes were carried out in FFPE tissue from a subgroup HPV positive (91.2%), of which 88.2% were at high oncogenic risk. TaqMan® Copy Number Assays (Life Technologies™) and CopyCaller software version v2.0 were performed to determine copy number for *EGFR*, *HER3*, *HER4*, *AKT1*, *AKT2*, *PI3KCA* and *PTEN*. Increase of 3 and 4 copies was considered gains, while increase of 5 or more copies was considered amplifications. The presence of a single gene copy was referred to as loss, while the absence of two copies was named deletion. Clinical and histopathological parameters were analyzed as to the presence of HPV and to CNAs. Our data showed that EGFR/PI3K/AKT/PTEN signaling pathway is highly altered in PeCa. The results showed that 100% of the tumors presented an increase of the number of copies for *HER3*; out of those, 93.9% were amplified, with 84.4% having 10 or more copies. *EGFR* also showed an increase of copies in 87.8% of tumor samples, out of which 65.6% were amplifications, with 48.2% having more than 10 copies. Furthermore, *HER4* and *AKT1* also presented an increase in the number of copies of 20.6% and 15%, respectively. *AKT1* had a higher frequency of tumors with a regular number of copies (78.8%). On the other hand, *PI3KCA*, *HER4*, *PTEN* and *AKT2* presented a higher frequency of samples with deletions, presenting 56%, 52.9%, 39% and 36%, respectively. Loss of copies was also frequent on tumors, so that genes *AKT2*, *PTEN* and *PI3KCA* appeared in heterozygosis in 60.6%, 54.5% and 37.5%, respectively. Our data show the occurrence of genetic alterations that may justify the differential expression of growth factor receptors and the downstream genes of the PI3K/ AKT pathway in penile carcinoma. However, in this study there was no association between CNAs and clinical and histopathological variables. On the other hand, taking into consideration the high frequency of HPV in the evaluated tumors, we suggest that CNAs are related to HPV integration into genome host. Finally, we highlight the high frequency of tumors with amplifications in *HER3* and *EGFR*, reinforcing these markers as targets for specific therapies in CaPe.

Keywords: Mutation; Biomarker; Tumorigenesis; Squamous Cell Carcinoma.

LISTA DE ABREVIACOES

CaPe	Cncer de pnis
C	Graus Celsius
AKT	Proteína quinase B
BG	β -globina
CEC	Carcinoma de células escamosas
CNA	Alteraco no número de cópias
DNA	cido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotdeo fosfatado
EDTA	cido etileno diamina tetra acético
ERK	Quinase regulada pela sinalizaco extracelular
FAM	6-carboxifluoresceína
FFPE	formalina e embebido em parafina
HCL	cido clorídrico
HEX	5'-hexaclorofluorescena fosforamidita
HPV	Papiloma Vírus Humano
IMOAB	Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello
LCR	<i>Long Control Region</i>
MEK	Proteína ativada por mitógeno
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
PCR	Reaco em cadeia da polimerase
PI3K	Fosfatidilinositol-3 quinase
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PK	Proteinase K
PTEN	Fosfatase homóloga a tensina
RAF	Quinase específica para SER/Thr
RAS	Vírus do sarcoma de rato
RNA	cido ribonucleico
RPM	Rotao por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio

SLD	Sobrevida livre da doença
TAMRA	6-carboxietrametilrhodamina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TLN	Tampão de lise nuclear
Tris	Trisaminometano
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
UICC/AJCC	Union for International Cancer Control–American Joint Committee on Cancer
μL	Micro litro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Via de sinalização celular PI3K/AKT	26
Figura 2 -	Estrutura dos receptores da família ErbB.....	27
Figura 3 -	Reconhecimento do ligante pelo receptor e exposição do braço de dimerização.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Oncogenes virais e suas respectivas funções	21
Tabela 2 - Sistema de classificação TNM	24
Tabela 3 - Sondas TAQMAN®, reagentes e ciclo de amplificação utilizados nos ensaios de PCR em tempo real.....	39

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 Epidemiologia	18
2.2 Fatores de risco	19
2.3 Câncer de pênis e HPV	20
2.4 Aspectos clínicos e histopatológicos	22
2.5 Tratamento	24
2.6 Via de sinalização celular PI3K/AKT	25
2.6.1 Componentes da via de sinalização PI3K/AKT	27
2.7 Via de sinalização celular RAS/RAF/MEK/ERK	30
2.8 Estudos de Alteração no número de cópias do DNA	31
3. OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo Geral	33
3.2 Objetivos específicos	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 Caracterização da amostra	34
4.2 Critérios de inclusão	34
4.3 Critérios de não inclusão	34
4.4 Aspectos éticos	34
4.5 Amostras	34
4.6 Detecção e genotipagem de HPV	35
4.6.1 Extração de DNA de tecido fresco	35
4.6.2 Genotipagem	36
4.6.2.1 PCR Multiplex	36
4.6.2.2 PCR Nested Multiplex	36
4.6.2.3 Eletroforese capilar	36
4.6.3 Sequenciamento automático	37
5. Análises de número de cópias gênicas	37
5.1 Desparafinização das amostras	37
5.2 Extração de DNA de tecido desparafinado	38
5.3 PCR quantitativa em tempo real	38
6. RESULTADOS	40

6.1 Capítulo I- Artigo 1.....	40
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
ANEXOS	65

1. INTRODUÇÃO

O câncer de pênis (CaPe) é uma neoplasia maligna rara em países desenvolvidos. No entanto, sua incidência é mais elevada em países da Ásia, África e América do Sul, representando cerca de 10% dos tumores malignos no homem (CALMO et al, 2011; CHRISTOULIDOU et al., 2015).

Dentre os países da América do Sul, destaca-se o Brasil, com uma das maiores taxas de câncer de pênis, 2,9-6,8/ 100.000 habitantes (CURADO et al., 2007; FAVORITO et al., 2008). Os casos de CaPe no Brasil são frequentemente relatados nas regiões Norte e Nordeste, somando 53,2% dos casos registrados no país (FAVORITO et al., 2008; REIS et al., 2010; PAIVA et al., 2015).

O CaPe é considerado um grande problema de saúde pública devido à alta incidência em países subdesenvolvidos e sua associação com baixos indicadores socioeconômicos (TORBRAND et al., 2016). No Brasil, nas regiões Norte e Nordeste, o CaPe corresponde a 5,7% dos cânceres que acomete o homem (FAVORITO et al., 2008). Além disso, o diagnóstico em geral é tardio e a sobrevida é reduzida em 70% dos casos após o diagnóstico inicial (FICARRA et al., 2002).

No Maranhão, a carência de estudos epidemiológicos têm mascarado a real incidência local desta doença e a falta de serviços de referência impossibilita a triagem adequada dos pacientes. Foi realizado um levantamento em um hospital de São Luís- MA entre 2004 e 2014 e foram diagnosticados 286 novos casos de CaPe, ressaltando a alta frequência desse tumor no estado.

A gênese desta neoplasia não está totalmente esclarecida, entretanto, alguns fatores de risco tem sido fortemente associado a doença. Destacam-se a má higiene, tabagismo, baixas condições socioeconômicas, fimose e infecção pelo Papiloma Vírus Humano (HPV) (SENKOMAGO et al., 2016; POW-SANG et al., 2010). A fimose é uma condição que pode causar a retenção de esmegma e a longo prazo pode ocasionar uma inflamação crônica (MADSEN et al., 2008; BLEEKER et al., 2009). O papel do HPV na etiologia do câncer de pênis não está claro, porém parece ser uma importante variável no desenvolvimento desse carcinoma (POW-SANG et al., 2010).

Trabalhos sobre a base genética do câncer peniano ainda são poucos, comparados a outros tipos de cânceres. Isto provavelmente se dá em virtude da baixa incidência dessa neoplasia em países desenvolvidos. Nesse contexto é importante destacar que alterações nas vias de sinalização envolvidas em mecanismos de crescimento, proliferação e sobrevivência celular tem sido investigadas em vários tipos câncer, porém são raros os

trabalhos em carcinoma peniano. Alguns poucos trabalhos imunohistoquímicos investigaram a expressão de proteínas da via PI3K/AKT e de receptores epidermais em CaPe (GONZALEZ et al., 2009; MOTA et al., 2017).

Desse modo, nosso trabalho teve como objetivo central investigar a ocorrência de alterações em genes da via de sinalização celular PI3K/AKT e de genes codificantes de fatores de crescimento epidermal. Para isso, foram analisadas 34 amostras de carcinoma peniano de células escamosas, quanto a presença de HPV e de alterações no número de cópias dos genes *EGFR*, *HER2*, *HER3*, *HER4*, *PI3KCA*, *AKT1*, *AKT2* e *PTEN*. As principais alterações genéticas foram avaliadas em relação a presença de HPV e a variáveis clínico-histopatológicas.

Nossos dados revelaram uma alta frequência de alterações na via PI3K/AKT em carcinomas penianos positivos para HPV de alto risco. Esses dados reforçam a importância dessa via na carcinogênese peniana, bem como papel da infecção por HPV. Nossos resultados são inéditos quanto a frequência de ampliações detectadas nos genes *HER3* e *EGFR*, o que justifica o aumento da expressão desses receptores epidermais em CaPe, previamente relatados por outros autores (STANKIEWICZ et al., 2011; POLLOCK et al., 2015). Finalmente, os dados apresentados sugerem os marcadores EGFR e HER3 como potenciais alvos para terapia de CaPe. Para isso, futuros estudos devem ser realizados para sustentar essa hipótese.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Epidemiologia

O câncer de pênis é raro em países desenvolvidos, mas no Brasil representa, aproximadamente, 2% de todos os tipos de câncer (LYNCH et al., 2002). As regiões Norte e Nordeste (53,2%) destacam-se por apresentar os maiores números de casos da doença, as quais possuem os menores índices de desenvolvimento humano e econômico (REIS et al., 2010).

No Nordeste, o Maranhão é o estado com maior prevalência de casos (CURADO et al., 2007) e, segundo a Sociedade Brasileira de Urologia, é responsável por 10,7% dos casos de câncer de pênis no Brasil, além de ser considerado um dos cinco estados com maior prevalência (SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA, 2015). Esse número de casos deve ser ainda maior, uma vez que muitos pacientes não buscam ou não têm acesso ao serviço de saúde. Assim, faz-se necessária a realização de um estudo

epidemiológico mais detalhado para que seja conhecida a realidade sobre a ocorrência desta doença no Maranhão.

Uma análise epidemiológica dos casos de câncer de pênis demonstrou que, em relação ao perfil socioeconômico dos portadores, a neoplasia atinge principalmente homens de classe social e nível de instrução baixos, sendo as regiões carentes dos países em desenvolvimento as áreas de maior incidência (POW-SANG et al., 2010; CHAUX et al., 2011).

O risco para o desenvolvimento de CaPe parece aumentar de acordo com a idade, porém, indivíduos mais jovens também podem ser acometidos pela doença (KOIFMAN et al., 2011). No Brasil, cerca de 7% dos pacientes possuem idade inferior a 35 anos (FAVORITO et al., 2008; KOIFMAN et al., 2011).

A baixa incidência de casos de câncer de pênis em países desenvolvidos tem como consequência o pequeno número de publicações científicas sobre o assunto se comparado, por exemplo, aos dados disponíveis sobre câncer de próstata ou mama. Dessa forma, questões importantes a respeito da etiologia, terapêutica e evolução do câncer peniano continuam pouco elucidadas (POW-SANG et al., 2010).

2.2. Fatores de risco

A etiologia do câncer de pênis não está totalmente elucidada, no entanto, vários fatores de risco tem sido associado a esta neoplasia. Dentre eles destacam-se a má higiene, idade, tabagismo, etilismo, fimose, número de parceiros sexuais e infecção por HPV (BLEEKER et al., 2009; RODNEY, 2016; SENKOMAGO et al., 2016).

A doença acomete preferencialmente homens entre a faixa etária de 50 a 70 anos (FONSECA et al., 2010). Em trabalhos realizados no Brasil, as médias de idade observadas foram de 58 anos no Rio de Janeiro, 60 anos no Maranhão e 68 anos em Pernambuco (COUTO et al., 2014; DE SOUSA et al., 2015).

Diversos trabalhos têm reportado a associação da fimose com o desenvolvimento do CaPe. Esta condição anatômica impossibilita a retratação do prepúcio, sendo frequente entre os recém-nascidos. No entanto, é comum que aproximadamente 90% dos prepúcios estejam retrateis até os 3 anos de idade, e quando não é realizada a circuncisão, apenas uma pequena parcela persiste com esta condição (MORRIS et al., 2017). Episódios de inflamação como o líquen escleroso e balanites podem surgir como consequência de irritações do epitélio e na presença de fimose pode se tornar crônico (SONPAVDE et al., 2013; LEE et al., 2013).

O tabagismo também é um fator de risco que tem sido associado com o desenvolvimento de diversas neoplasias (INCA 2017). Trabalhos recentes relataram a maior incidência de CaPe em homens fumantes quando comparados com os não fumantes (DALING et al. 2005; KOIFMAN et al., 2011; COUTO et al., 2014).

Embora esteja bem estabelecido o papel da infecção por HPV em câncer de cérvix, vulva, ânus e orofaringe, a associação dessa infecção com o câncer de pênis não está clara (AKAGI et al., 2014; GAO e SMITH, 2016). STANKIEWICZ et al. (2009) e AFONSO et al. (2017) mostraram que pode existir uma forte associação entre o desenvolvimento do CaPe e a infecção viral, uma vez que, a frequência de detecção deste vírus neste carcinoma é elevado. A interação dessas oncoproteínas com a maquinaria das células hospedeira pode levar a disrupção do ciclo celular e desencadear o início da tumorigênese (PASTREZ et al., 2017).

2.3. Câncer de pênis e HPV

O Papiloma vírus humano é membro da família *Papillomaviridae*, gênero Papilomavírus. Apresenta DNA de fita dupla circular com aproximadamente 8.000 pb, não envelopado e envolvido por um capsídeo icosaédrico (NEVES et al., 2002). O vírus infecta mucosas e tecidos cutâneos, sendo classificados como mucosotrópicos e cutaneotrópicos. O genoma deste vírus tem organização simples, que pode ser dividida em duas regiões codificantes e uma não-codificante. As regiões codificantes são denominadas de precoce “E” (do inglês *early*) e tardia “L” (do inglês *later*). Enquanto a não-codificante é uma longa região de controle, denominada *Long Control Region* (LCR), e outra região onde se localizam os genes de transcrição precoce (E) e tardia (L) (DOORBAR et al., 2012).

Os genes da região E são subdivididos em E1, E2, E4, E5, E6 e E7, estes são normalmente expressos logo após a infecção e codificam as proteínas envolvidas na indução e regulação e síntese do DNA viral. Enquanto os genes da região L são expressos em estágios posteriores da infecção e codificam as proteínas do capsídeo viral (Tabela 1) (HOWIE, 2009; GHITTONI et al., 2015).

Tabela 1: Oncogenes virais e suas respectivas funções.

Expressão Gênica	Genes	Função
E (Precoce)	E1	Replicação do DNA viral
	E2	Controle da replicação e transcrição
	E4	Maturação do vírus
	E5, E6, E7	Estímulo da proliferação e transformação celular
	L (Tardio)	L1, L2

Fonte: GHITTONI et al., 2015.

De acordo com a capacidade de transformar células epiteliais em células cancerígenas, podem ser classificados em HPV de alto risco e HPV de baixo risco. Os subtipos virais 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, e 59 são considerados de alto risco e associados a lesões de alto grau e neoplasias malignas (SOUSA et al., 2015; BENEVOLO et al., 2016). Os subtipos de baixo risco, como 6 e 11 estão associados a lesão de baixo grau e verrugas genitais (LEBELO et al., 2014; SUDENGA et al., 2016).

Os HPVs de alto risco são associados a uma alta porcentagem significativa de carcinomas de cérvix (SABEENA et al., 2016) anal (BENEVOLO et al., 2016), vulva e câncer de cabeça e pescoço (DOK e NUYTZ, 2016), orofaringe (CLEARY et al., 2016) e pênis (SOUSA et al., 2015). Segundo Flaherty et al., (2014), a prevalência global é de 36-40%, com maior contribuição dos subtipos HPV-16 (60,23%), HPV-18 (13,35%) e HPV-6/11 (8,13%) e os subtipos virais 6/11 mais prevalentes em lesões verrucosas (LEBELO et al., 2014). Além disso, a prevalência do vírus pode variar de acordo com o subtipo histológico, sendo mais frequente nos subtipos basaloides (80%) e verrucosos (100%) (MC DANIEL et al, 2015).

No Brasil, poucos estudos têm relatado a prevalência do HPV em carcinoma de pênis. Em dois estudos realizados no Rio de Janeiro a prevalência variou de 60,7%-75%, sendo o subtipo 16 o mais frequente (SCHEINER et al., 2008; AFONSO et al., 2012). Recentemente, Sousa et al., (2015) identificaram uma prevalência de 63,15% de HPV sendo mais frequente os subtipos 16, 18, 45 e 69.

Os mecanismos moleculares envolvidos no processo de tumorigênese mediados pelo HPV incluem oncogenes virais chaves na multiplicação viral e desregulação celular (CAMUS et al., 2007). Após a infecção viral na região basal do epitélio estratificado, o genoma do HPV forma elementos extracromossômicos ou pode se integrar ao DNA nuclear da célula hospedeira para se estabilizar, levando a um aumento do número de cópias do vírus. O potencial oncogênico do HPV é atribuído as proteínas E5, E6 e E7,

atuando na regulação homeostática celular de forma a promover transformação e proliferação celular (ZUR et al., 2000). A oncoproteína E6 atua sobre a proteína supressora tumoral p53, por sua vez, a oncoproteína E7 atua sobre a proteína pRB levando ativação constitutiva do ciclo celular, podendo também perturbar os mecanismos de duplicação cromossômica e induzindo conseqüentemente a instabilidade genômica (LIU et al., 2015; KHATTAK et al., 2017).

As proteínas E6 e E7 são expressas geralmente na camada basal do epitélio para que o genoma viral seja replicado nas células que estão se dividindo (PYEON et al., 2009). Além disso, nas células superficiais são expressos os genes L1 e L2 que codificam o capsídeo viral que levam a formação de novos vírus (FLORIN et al., 2002). Segundo PETER et al. (2006), a integração viral em células do epitélio de útero mostrou-se ser um passo importante para a evolução das neoplasias intraepiteliais para os tumores invasivos.

Os cânceres relacionados ao HPV possuem uma biologia distinta e mostraram respostas melhores ao tratamento. As razões para o rastreamento de pacientes com câncer de pênis coinfectados com o vírus HPV incluem estratificação de risco, estabelecimento de regimes de tratamento específicos que são apropriados para a biologia do câncer e identificação de moléculas virais para terapias-alvo específicas para HPV (FLAHERTY et al., 2014).

2.4. Aspectos clínicos e histopatológicos

Os carcinomas de células escamosas (CEC) compreendem 95% dos casos de câncer de pênis, sendo o tipo histológico mais frequente, e caracteriza-se histologicamente por queratinização, formação de pérola córnea e apresentação de vários graus de atividade mitótica. O principal subtipo histológico do CEC é o usual (48-65%), seguido pelo condilomatoso (17%), verrucoso (8%), papilar (7-10%) e basaloide (5-15%) (CUBILLA et al., 2009; CHAUX et al., 2010). Os demais subtipos possuem padrões infiltrativos e de crescimento variados (CALMON et al., 2011).

O CaPe apresenta normalmente tumores bem ou moderadamente diferenciados, com perda da diferenciação das células da camada basal em direção à camada apical, apresentando núcleos hipercromáticos com tamanhos variados (CULKIN e BEER, 2003). Os subtipos histológicos têm um papel crucial no prognóstico do paciente, uma vez que eles podem ser associados com a infecção por HPV e ao risco de metástases e óbitos (GUIMARÃES et al., 2009).

O carcinoma peniano geralmente inicia-se como uma lesão na glândula que, quando não tratada estende-se para o prepúcio e evolui infiltrando-se em tecidos adjacentes como o tecido subepitelial conjuntivo, o corpo esponjoso e o corpo cavernoso até invadir órgãos adjacentes como próstata e bexiga levando à auto-amputação (POMPEO et al., 2006; KOIFMAN et al., 2011).

Metástases linfonodais nas regiões femoral e ilíaca são vias de disseminação no carcinoma de pênis, consideradas principal fator prognóstico nesse tipo de câncer. A invasão perineural também se associa a um pior prognóstico e está relacionada ao comportamento biológico do tumor (VELAZQUEZ et al., 2008; CUBILLA, 2009). Segundo COUTO et al. (2014), aproximadamente 31,9% dos casos de CaPe apresentaram metástase linfonodal unilateral ou bilateral. O comprometimento dos linfonodos é variável prognóstica importante, uma vez que, a sobrevida livre da doença (SLD) para casos com linfonodos negativos é de cinco anos e diminui com o acometimento linfonodal (SHAH et al., 2016).

Quanto ao padrão de diferenciação, o carcinoma de pênis é classificado segundo o critério de Broders em três categorias: Grau I (bem diferenciado); Grau II (moderadamente diferenciado); Grau III (indiferenciado). Em relação ao estadiamento tumoral são utilizados critérios para possibilitar a identificação das características histológicas, estruturais e anatômicas envolvidas nos tumores analisados. Para o estadiamento clínico utiliza-se o critério de Jackson que é dividido em quatro estágios: Estágio I (Circunscrito à glândula e ao prepúcio, sem envolvimento do corpo do pênis); Estágio II (Invasão do corpo cavernoso do pênis, mas sem disseminação para os linfonodos); Estágio III (Disseminação clínica dos linfonodos regionais da virilha e a possibilidade de cura depende do número e da extensão dos nodos envolvidos); Estágio IV: Invasivo, apresentando extenso envolvimento dos linfonodos, sem possibilidade de ressecção dos mesmos (PIZZOCARO et al., 2010).

O estadiamento clínico histopatológico se dá pelo sistema de classificação TNM (Tabela 2) o qual foi proposto pela *Union for International Cancer Control* juntamente com a *American Joint Committee on Cancer* (UICC/AJCC), que leva em consideração extensão do tumor (T), o comprometimento de linfonodos regionais (N) e a presença de metástase a distância (M).

Tabela 2: Sistema de classificação TNM.

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

2.5. Tratamento

Os pacientes com câncer de pênis são diagnosticados por exames clínicos e histopatológicos. O tratamento do câncer de pênis deve ser individualizado e baseia-se nas características da lesão primária e no estadiamento TNM. Em relação as modalidades terapêuticas, o tratamento cirúrgico continua sendo o mais empregado e com melhores resultados (POMPEO et al., 2010).

A penectomia ainda continua sendo o “padrão ouro” para a lesão primária do câncer de pênis e, dependendo da extensão, a penectomia pode ser parcial ou total (NAM et al., 2017). Além disso, existem as opções terapêuticas como a radioterapia ou a braquiterapia. Entretanto, o câncer de pênis costuma ser radiorresistente e os casos com boa resposta inicial tem níveis significativos de recidiva local (POMPEO et al., 2010).

A linfadenectomia tem sido realizada como medida profilática, uma vez que, 20% dos linfonodos clinicamente negativos possuem metástases ocultas, enquanto que em 50% dos cacos com linfonodos palpáveis não histologia positiva para câncer quando operados (O'BRIEN et al., 2017; CHIPOLLINI et al., 2017). Além disso, a preocupação com o comprometimento linfonodal inguinal é justificada pelo grande impacto no prognóstico. O acometimento de mais de dois linfonodos inguinais reflete um maior risco de recidiva e morte por doença. Lopes et al., (2012) encontraram taxas de sobrevida global de 76,7% para pacientes com até dois linfonodos comprometidos e de 28,1% para pacientes com mais de dois linfonodos positivos.

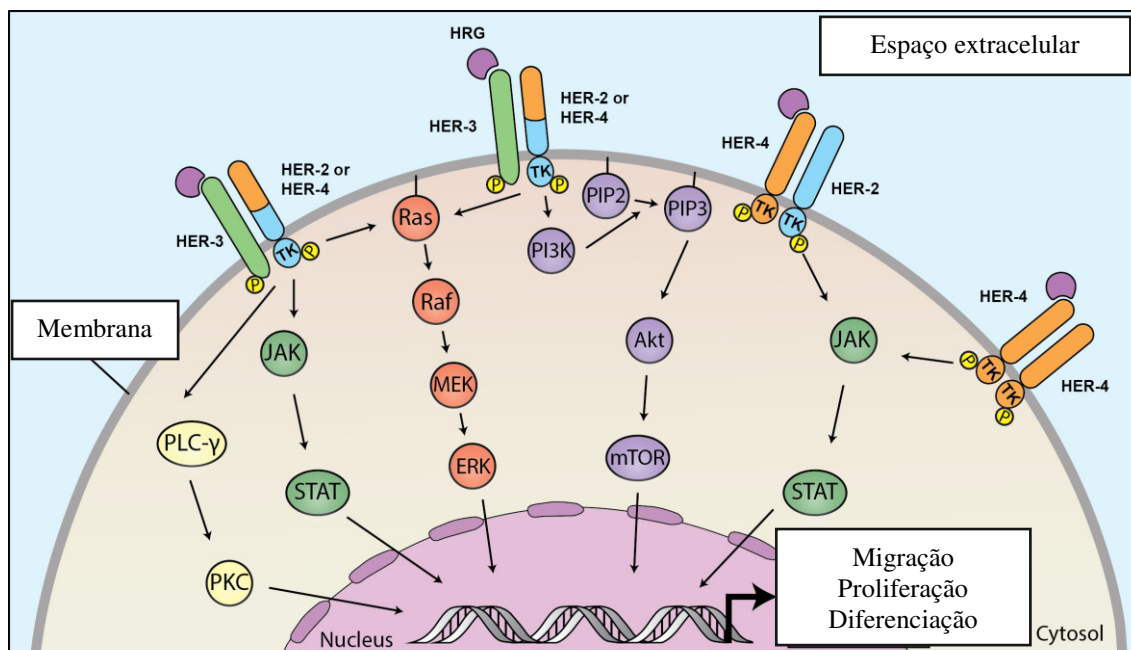
Os atuais métodos de diagnóstico por imagem apresentam baixa sensibilidade e especificidade para detectar os tumores primários e metástases linfonodais, sendo utilizado apenas na detecção de metástases à distância (POMPEO et al., 2010). Desta forma, é de extrema importância identificar marcadores moleculares afim de auxiliar no prognóstico e tratamento desse tipo de câncer.

2.6. Via de sinalização celular PI3K/AKT

Estudos têm demonstrado que a via de sinalização celular PI3K/AKT, envolvida nos mecanismos de crescimento, proliferação, sobrevivência, mortalidade celular e angiogênese está alterada em diversas neoplasias malignas, entretanto, pouco se sabe sobre o envolvimento dessa via em câncer de pênis (KRAUSS, 2008). A manutenção da regulação dessa via de sinalização é essencial para evitar a tumorigênese. Além disso, nas últimas décadas, esta via tem sido caracterizada como um importante alvo terapêutico (MILANEZI et al., 2008; POLLOCK et al., 2015). Alguns trabalhos têm relatado a sua participação na carcinogênese por superexpressão, desencadeando a ativação de genes pertencentes a via de sinalização PI3K/AKT (STANKIEWICZ et al., 2011).

As PI3Ks (fosfatidilinositol-3 quinase) são enzimas que pertencem à família das cinases lipídicas. Após ser ativada, a PI3K fosforila a PIP2 (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato) que posteriormente é convertida em PIP3 (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato). Por sua vez, a PIP3 recruta AKT (proteína quinase B) para a membrana plasmática fosforilando-a. E depois de ativada, a AKT regula diversos processos envolvidos na proliferação celular (ENGELMAN et al., 2006). Por sua vez, o gene supressor de tumor *PTEN* (Fosfatase homóloga a tensina) age regulando negativamente esta via e está frequentemente mutado em câncer de mama, câncer de cabeça e pescoço, câncer colorretal e câncer cervical (Figura 1) (STANKIEWICZ et al., 2011).

Figura 1: Via de sinalização celular PI3K/AKT.



Fonte: Adaptado de MOTA et al., 2017.

Estudos imunohistoquímicos relataram a participação dos fatores de crescimento epidermal na carcinogênese de pênis. Os resultados demonstraram que EGFR, HER3 e HER4, mas não HER2, estão associados ao câncer de pênis (STANKIEWICZ et al., 2011). Em outro trabalho, observou-se que amostras de câncer de pênis apresentavam mutações no gene *PIK3CA*, independente do subtipo histológico (SITHANANDAM et al., 2008).

O aumento da expressão de *AKT* tem sido observado em muitas neoplasias humanas (LI et al., 2015). Essa ativação pode ocorrer pela amplificação do gene ou mutações em componentes envolvidos na sua sinalização (NICHOLSON e ANDERSON, 2002; LI et al., 2015). Além disso, a proteína *AKT* regula proteínas-alvos que estão envolvidas no mecanismo de apoptose e proliferação celular (LING DENG et al., 2015).

Quanto ao gene supressor de tumor *PTEN*, este é o mais frequentemente deletado em câncer de próstata (STANKIEWICZ et al., 2011). Mutações em células germinativas são encontradas em várias síndromes raras, como a síndrome de Cowden, na qual cerca de 80% dos pacientes têm mutação no gene *PTEN* e desenvolvem câncer de mama, tireóide e endométrio, mostrando o importante papel deste gene na tumorigênese (HOLLANDER et al., 2011).

2.6.1. Componentes da via de sinalização PI3K/AKT

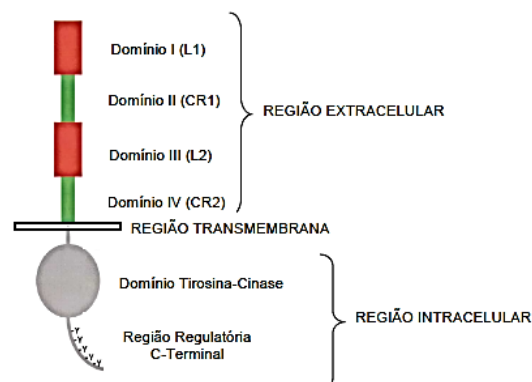
Os fatores de crescimento são proteínas solúveis e de baixo peso molecular que trabalham na regulação do ciclo celular. Apresentam um importante papel nos processos de proliferação, diferenciação e sobrevivência celular. Estas moléculas ligam-se a proteínas de membrana (receptores) para exercer seu papel biológico (NORMANNO et al., 2006).

Estas proteínas ligam-se a seus receptores (família de receptores do fator de crescimento epidermal ErBb) causando uma mudança em sua estrutura. Após essa modificação, ocorre a transdução de sinais do meio externo para o meio intracelular desencadeando a ativação da transcrição de genes alvos envolvidos nos processos de proliferação celular, apoptose, angiogênese e sobrevivência.

Os mais importantes grupos de receptores de membrana são aqueles com atividade tirosina quinase (EGFR, HER2, HER3 e HER4). Estas proteínas podem fosforilar outras quinases e como consequência transmitem e amplificam o sinal recebido (NORMANNO et al., 2006; STANKIEWICZ et al., 2011; ROSKOSKI, 2014). Estudos mostraram sua expressão amplificada em câncer de mama, próstata e ovário, sendo por estes motivos, bastante estudados como alvos terapêuticos (BURGESS et al., 2003; LI et al., 2015).

As proteínas desta família são formadas por três regiões distintas (Figura 2). A porção extracelular que se liga a um fator de crescimento, a região transmembrana que ancora a proteína na membrana plasmática, porção intracelular com capacidade de fosforilar outros alvos e a região regulatória C-terminal (BURGESS et al., 2003; ROSKOSKI, 2014).

Figura 2: Estrutura dos receptores da família ErbB.



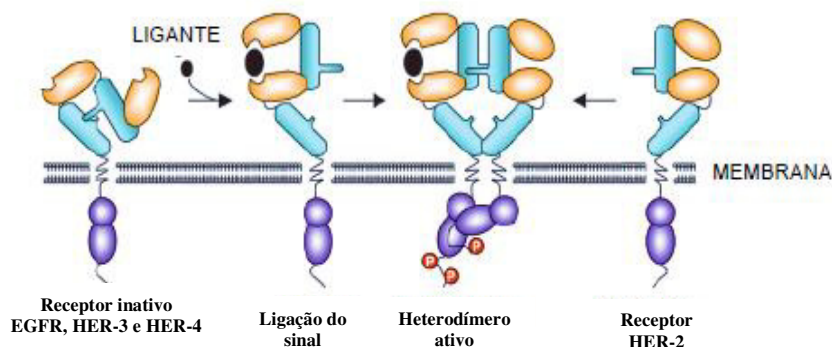
Fonte: Adaptado de BURGESS et al., 2003

A região extracelular entre os receptores da família ErbB apresenta uma grande diversidade, o que permite a ligação de um amplo número de ligantes diferentes. A região extracelular é formada por quatro domínios: dois domínios homólogos (L) e dois domínios ricos em cisteínas (CR). No domínio II está localizado o braço de dimerização, estrutura responsável pela formação dos dímeros entre os receptores (ROSKOSKI, 2014).

De acordo com o trabalho de ROSKOSKI et al., (2014) e LEMMON et al. (2010), a região intracelular é muito conservada entre os membros da família ErbB. Entretanto, HER-3 não apresenta atividade tirosina quinase devido a uma modificação em seu sítio catalítico, podendo ser ativado quando forma dímeros entre os outros receptores. Cada proteína se liga a um grupo específico de fatores de crescimento.

O fator responsável pela modificação conformacional e exposição do braço de dimerização é o reconhecimento do ligante pelo receptor (Figura 3). Os receptores em estado inativo não apresentam braço de dimerização exposto, com exceção de HER-2.

Figura 3: Reconhecimento do ligante pelo receptor e exposição do braço de dimerização.



Fonte: Adaptado de WIEDUWILT e MOASSER (2008).

Os receptores HER-2 e HER-3 não desencadeiam sinais sozinhos, porém, por meio da formação de heterodímeros podem gerar forte sinais celulares (SCALTRITI, 2006). As principais vias ativadas por estes receptores são a via Ras/Raf/MAP e a via PI3K/AKT. Ambas participam do processo de tumorigênese aumentando a proliferação e sobrevivência celular (CARMELIET e JAIN, 2000; NORMANNO et al., 2006; MOTA et al, 2017).

O receptor EGFR membro da família ErbB é codificado pelo gene localizado no 7p12. Esta proteína está superexpressa em 40 a 50% dos casos de câncer, dentre eles, mama, pâncreas, esôfago, canal anal, pulmão e cabeça e pescoço (GRUNWALD e HIDALGO,2003; CHAUX et al., 2014). Além disso, BAIOCCHI et al., (2009) mostrou

que a superexpressão de EGFR em tumores de esôfago, cabeça e pescoço, colo de útero e bexiga estão associados com a menor sobrevida e prognóstico ruim. A desregulação de EGFR, bem como, suas vias de sinalização estão fortemente associadas com a progressão de tumores sólidos, sendo considerado um importante alvo terapêutico (SCHWARTZ e MURRAY, 2011).

O receptor HER-2 é codificado pelo gene localizado 17q21. HER-2 apresenta seu braço de dimerização constantemente exposto, característica que o difere dos outros membros da família. Além disso, este receptor não apresenta ligantes conhecidos (ROSKOSKI, 2014). Em tumores de cólon e cabeça e pescoço, a superexpressão de HER-2 não está associada com prognóstico ruim ou risco de metástase (ANGIERO et al. 2008). Em câncer de mama, HER-2 é um marcador de prognóstico que indica doença mais agressiva sendo necessário terapia adjuvante. Pacientes com amplificação para este gene fazem terapia utilizando inibidores de tirosina quinase (NAGATA et al., 2004).

O receptor HER-3 é codificado pelo gene localizado em 12q13. Esta proteína ativa principalmente a via de sinalização celular PI3K/AKT (BASELGA e SWAIN 2009). Esta proteína sozinha não tem autonomia para desencadear um sinal, porém ao formar dímeros, é capaz de induzir a ativação da via MAPK (BAIOCCHI et al., 2009; MOTA et al, 2017). Além disso, em um estudo realizado em 2001, observou-se que uma isoforma de HER-3 pode inibir os outros receptores dos fatores de crescimento epidermal (LEE et al., 2001; BASELGA e SWAIN, 2009).

O receptor HER-4 é codificado pelo gene localizado no 2q33. É o menos estudado de todos os receptores e seu papel na tumorigênese não está totalmente estabelecido. Estudos sugerem que este membro possa participar da inibição do ciclo celular (BASELGA e SWAIN, 2009). Sua superexpressão em câncer de mama foi associado com prognóstico ruim (YAMAUCHI et al., 2000; STANKIEWICZ et al., 2011).

A superexpressão de EGFR, HER-2, HER-3 e HER-4 tem sido associado com prognóstico ruim em muitas neoplasias, entretanto, seu comportamento no câncer de pênis não está elucidado (LAVENS et al, 2010; STANKIEWICZ et al., 2011).

As PI3Ks (fosfatidilinositol-3 quinase) são classificadas em três classes com diversas subunidades e isoformas, cada uma específica para um substrato. No entanto, a classe I é descrita como o grupo de proteínas diretamente envolvidas no desencadeamento da tumorigênese. PI3K é um heterodímero formado pela subunidade regulatória p85 e a subunidade catalítica é p110 (ENGELMAN et al.; 2007).

A ativação de PI3K ocorre quando a subunidade p85 associa-se com resíduos de tirosina fosforilada pelo domínio SH2. Após este evento, a subunidade catalítica p110 transfere fosfatos para os fosfolipídios da membrana celular. Assim, os segundos mensageiros PIP2 e PIP3 são formados e iniciam a cascata de sinalização (STEELMAN et al., 2011). Mutações de PI3K em sua subunidade catalítica são frequentes em cânceres humanos. Essas alterações são encontradas em câncer de mama, endométrio, colorretal, gástrico, pulmão, próstata e cabeça e pescoço, porém pouco estudados em neoplasias de pênis (STEELMAN et al., 2011).

A proteína PTEN é formada por 403 aminoácidos e pertence à família das proteínas tirosina fosfatases. A proteína PTEN codificada pelo gene *PTEN* é um supressor tumoral localizado em 10q23. Atua como antagonista da via PI3K/AKT regulando a fosforilação de PIP2/PIP3 (ENGELMAN et al.; 2007). A deleção ou silenciamento do gene *PTEN* é frequente em cânceres humanos. Sua desregulação resulta na ativação constitutiva da via PI3K/AKT (PLANCHON e WAITE 2008).

A proteína AKT é um componente importante na sobrevivência celular, regulando o crescimento, funções metabólicas e apoptose. Esta proteína apresenta três isoformas (AKT1, AKT2 e AKT3) e são distribuídas de formas diferentes entre os tecidos. As proteínas AKT1 e AKT2 estão distribuídas na maioria dos tecidos e a proteína AKT3 está localizada nos tecidos do sistema nervoso central e são constitutivamente ativas em células onde PTEN está deletado ou silenciado (STEELMAN et al, 2011). Sua associação com o câncer é devido a sua interferência em mecanismos de inibição das vias pró-apoptóticas, no entanto, sua atuação em tumores de pênis é pouco conhecida (YUAN e CANTLEY, 2008).

2.7. Via de sinalização celular RAS/RAF/MEK/ERK

Tem sido reportado nos últimos 25 anos que a via de sinalização celular Ras/Raf/MEK/ERK desempenha papel fundamental na transmissão de sinais proliferativos de receptores de membrana. Mutações em seus genes ou em receptores upstream ativam constitutivamente esta via de sinalização, sendo associados com mau prognóstico em pacientes com câncer e envelhecimento precoce (MCCUBREY et al., 2008; STEELMAN et al., 2011).

Ras é a primeira etapa para a ativação da cascata MAPK, sendo uma proteína G, com atividade GTPase intrínseca e regulador da via de sinalização. Esta proteína é recrutada na membrana e é ativada por um processo que envolve fosforilação, sendo uma

das primeiras proteínas com importante papel na regulação do ciclo celular (ADJEI e FRIDAY, 2008). Esta proteína atua em moléculas que influenciam na regulação do ciclo celular como a p16 e p21, parando o ciclo celular na fase G1, induzindo a senescência dependente da via Ras/Raf/ MEK/ERK (MOR e PHILIPS, 2006).

As proteínas quinases ativadas por PI3K/AKT e RAS podem atuar nas redes de sinais que estão envolvidas na ativação de receptores como EGFR, induzindo a sobrevivência e proliferação celular (MCCUBREY et al., 2008). Além disso, estudos têm demonstrado que a sinalização mediada por HER3 e HER4 também pode ativar a via RAS/RAF/MEK/ERK, induzindo a migração, proliferação e diferenciação das células cancerígenas (MOTA et al, 2017).

RAF é uma serina/treonina quinase que quando ativada é recrutada na membrana plasmática e interage com o RAS. Uma vez ativado, todos os membros da família RAF iniciam cascatas de fosforilação, na qual, a ativação de RAF e MEK simultaneamente ativam ERK (MCCUBREY et al., 2008; STEELMAN et al., 2011).

MEK (proteína ativada por mitógeno) também é uma proteína quinase e sua atividade é regulada pela fosforilação de RAF e por sua vez ativará ERK (STEELMAN et al., 2011). A desregulação da via RAS/RAF/MEK/ERK tem um papel importante na tumorigênese como em carcinoma hepatocelular e parece está associado com a progressão de CaPe, uma vez que, mutações em RAS foi identificado em tumores mais avançados (ANDERSSON et al., 2008). No entanto, mais estudos são necessários para compreender melhor o papel desta via de sinalização no desencadeamento da tumorigênese peniana.

2.8. Estudos de Alteração no Número de Cópias do DNA

Alterações no número de cópias do DNA (CNAs) são frequentemente observadas no genoma de tumores e são consideradas responsáveis pelas modificações na expressão gênica. Essas mudanças no DNA podem ser denominadas de alterações no número de cópias (CNAs, do inglês: copy number Alteration) e podem envolver ganhos ou perdas de grandes segmentos cromossômicos (COOPER et al., 2008). As CNAs são de importante interesse para a biologia tumoral, visto que, estão associadas com a desregulação da expressão gênica de oncogenes ou supressores tumorais.

As alterações no DNA podem ser detectadas e analisadas por metodologias que podem abranger o genoma completo ou regiões específicas (LEE e JEON, 2008). A técnica de array-CGH é um método citogenético molecular que pode mapear o genoma

através de sondas específicas, atuando na identificação de alterações no número de cópias (CNAs). Devido a sua abrangência, os *arrays* permitem identificar deleções, microdeleções e ampliações gênicas que podem não ser observadas em outras metodologias. (REIS-FILHO et al., 2005). Além disso, reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR – do inglês Quantitative Polymerase Chain Reaction) também é utilizado para estudos de CNAs (D'HAENE et al., 2010).

A análise do genoma tem sido aplicada ao estudo do câncer e outras doenças. Como consequência, estes trabalhos têm contribuído para a identificação de genes e vias genéticas associados com etiologia e progressão de doenças (REIS-FILHO et al., 2005).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- Investigar a ocorrência de mutações por ganho ou perda de genes envolvidos na via de sinalização celular EGFR/PI3K/AKT/PTEN em câncer de pênis e correlacionar as alterações observadas com parâmetros clínicos e histopatológicas do tumor.

3.2. Objetivos específicos

- Traçar o perfil clínico-histopatológico dos pacientes com câncer de pênis atendidos nos Hospitais de Referência do Maranhão;
- Analisar alterações do número de cópias dos genes *EGFR*, *HER3*, *HER4*, *PIK3CA*, *AKT1*, *AKT2* e *PTEN*;
- Associar as alterações no número de cópias dos genes com a presença dos subtipos virais de HPV;
- Correlacionar as mutações gênicas com os parâmetros clínicos e histopatológicos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Caracterização da amostra

Foram analisadas 34 amostras de tumor de pênis de pacientes provenientes de dois hospitais de referência em São Luís, Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello (IMOAB) e o Hospital Universitário Presidente Dutra da Universidade Federal do Maranhão (HU-UFMA). As amostras foram coletadas mediante autorização do paciente, após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A).

4.2. Critérios de inclusão

Pacientes maiores de 18 anos com diagnóstico clínico, anatomopatológico de câncer de pênis e sem tratamento prévio.

4.3. Critérios de não inclusão

Dados incompletos do prontuário médico e ausência de material adequado disponível para a realização das técnicas moleculares ou se o paciente não concordar em assinar o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (Anexo A).

4.4. Aspectos éticos

Este projeto está vinculado ao projeto guarda-chuva “ANÁLISE DE ALTERAÇÕES GENÔMICAS E NA EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA AM CÂNCER PENIANO”, na qual foi aprovado pelo Comitê de ética em Pesquisa- CAAE: 46371515.5.0000.5087 (Anexo B).

4.5. Amostras

Durante o procedimento cirúrgico foi coletado um fragmento tumoral que foi lavado com soro fisiológico para minimizar contaminação com células sanguíneas. Logo após, os fragmentos de tecido tumoral foram embebidos em TLN - Tampão de Lise Nuclear (Tris HCl 10mM, EDTA 2mM, NaCl 400mM pH=8,0) e encaminhados ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Maranhão, em São Luís- MA, onde foram codificados e armazenados a - 20°C até serem processados para obtenção de material genético.

4.6. Detecção e genotipagem de HPV

4.6.1. Extração de DNA de tecido fresco

A extração de DNA foi realizada em amostras frescas de tumores de pênis. Os tecidos foram descongelados e picotados em uma placa de Petri estéril utilizando bisturis estéreis individuais para cada tecido. Em seguida, o tecido picotado foi ressuspensionado com 500 µL de TLN (NaCl 400mM; TRIS HCl 25mM pH=8,0; EDTA 50mM pH=8,0) e transferido para microtubos de 1,5 mL. Logo após foi adicionado 40 µL de SDS 10% (Dodecil sulfato de Sódio) e colocado em banho-maria à 37° C por 30 minutos. O material foi resfriado a temperatura ambiente por aproximadamente 10 minutos e logo em seguida adicionado 40 µL de proteinase K 20 mg/mL (PK). Posteriormente foi levado ao banho-maria à 55° C por 12 horas. No dia seguinte, se o material não estivesse bem digerido, era adicionado mais 20 µL de PK e a amostra voltava ao banho-maria por 1 hora. Decorrido esse tempo, foi retirado do banho-maria e acrescentado 20 µL de RNase, homogeneizando e deixado novamente no banho-maria a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, foram adicionados 500µL de solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1). Em seguida o material foi homogeneizado lentamente por cerca de 10 vezes. Logo depois, foi centrifugado a 14000 RPM à 4° C por 15 minutos. Após isto, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, onde foram adicionados 500 µL de clorofórmio/álcool isoamílico, homogeneizando novamente o material invertendo-se o microtubo por cerca de 10 vezes. Os tubos foram centrifugados nas mesmas condições anteriores e em seguida o sobrenadante foi removido e transferido para um outro tubo onde foram adicionados 200 µL de Acetato de sódio (AcNa 3M, pH 4,8) e o volume completado com isopropanol gelado. As amostras foram armazenadas em freezer -20° C por 12 horas. Passado o período, o material foi centrifugado à 12000 RPM à 4° C por 15 minutos, descartando-se o sobrenadante e invertendo o tubo totalmente e lentamente para não perder o *pellet*. Foi adicionado 500 µL de etanol 70% gelado para ressuspender o *pellet*. Os tubos foram novamente centrifugados à 12000 RPM à 4° C por 15 minutos. Em seguida, foi descartado o etanol 70% e o material foi deixado a temperatura ambiente para secagem. Após isso, o *pellet* foi então diluído em 25 ou 50 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 Mm) dependendo do tamanho do *pellet*. A leitura da concentração de DNA foi realizada por espectrofotômetro e somente foram consideradas para as análises moleculares as amostras que apresentarem razão A260nm/A280nm com valor entre 1,8 e 2,0. Após análise de qualidade do material, as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C.

4.6.2. Genotipagem

4.6.2.1. PCR Multiplex

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

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

4.6.2.2. PCR Nested Multiplex

Na segunda reação, 40 iniciadores específicos marcados com fluoróforos foram dispostos numa PCR multiplex para 40 subtipos virais, incluindo genótipos de baixo e alto risco oncogênico. Foi utilizado o par de primers BGA2 e BGS3 para o gene constitutivo da β -globina.

O protocolo de genotipagem foi desenvolvido pelo laboratório BioGenetics Molecular Technologies, Uberlândia, MG, Brasil, e está sob patente (número de processo BR 10 2017 004615 0) de modo que os primers não serão detalhados aqui.

Na segunda amplificação de PCR o volume final foi 15 μ L, KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), MgCl₂ 1,5 mM, potenciador (1X), 200 μ M de dNTPs, 1,0 U de Taq DNA Polymerase (Taq Platinum, Invitrogen), 0,5 pmol de cada iniciador específico de cada subtipo viral e 0,2 pmol de iniciadores de controle (BGA2 e BGS3). Foram utilizados dois microlitros dos produtos de PCR MY11/09 como alvos de amplificação. A reação foi incubada por 36 ciclos a 95 ° C 2 min, 56 ° C 1 min, 72 ° C 40 segundos e um ciclo de extensão final a 72 ° C 5 min.

4.6.2.3. Eletroforese capilar

O produto amplificado da Nested PCR foi diluído 200X e 1 μ L submetido à eletroforese capilar (*MegaBace 1000, Amersham Pharmacia Biotech, EUA*), utilizando o

peso molecular padrão ETRox550 (GE Healthcare) para análises das amostras. Para a análise dos eletroferogramas, foi construído um novo filtro de pico no *software Fragment Profiler* com três sondas marcadas com fluoresceína: FAM (6-carboxifluoresceína), HEX (5'-hexaclorofluoresceína fosforamidata) e TAMRA (6-carboxietrametilrhodamina). Os resultados foram classificados como positivos na presença de amplificação para uma (única infecção) ou mais tipos virais de HPV (infecções múltiplas), gerando tamanhos de fragmentos de 74 a 338 pb, com presença ou ausência de amplificação de controle interno (gene de β -globina - 366 pb). Os resultados negativos foram considerados apenas quando o gene da β -globina foi amplificado.

4.6.3. Sequenciamento automático

O sequenciamento automático para o HPV foi realizado utilizando o kit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. Após a montagem dos reagentes a solução final foi submetida a uma reação de PCR com um ciclo de 5 minutos a 94°C seguido a 45 ciclos de 45 segundos a 94°C, 1 minuto a 60°C e 1 minuto a 72°C finalizando com resfriamento das amostras a 15°C.

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

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

5. Análises de número de cópias gênicas

5.1. Desparafinização das amostras

A análise de CNAs foi realizada em uma amostra de 34 tumores e todas as análises estatísticas concernentes a associação com variáveis clínico-histopatológicas e presença de HPV foram realizadas nesse subgrupo amostral. Para isso, foram obtidas três secções (10 μ m) do bloco de parafina para cada amostra tumoral. Em seguida, transferiu-se as secções para um microtubo de 2 μ l. Adicionou-se 1mL de xilol e homogeneizou-se por 20 segundos. Posteriormente incubou-se à 50°C por 5 minutos. Decorrido o tempo, as

amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 2 minutos. Após isso, o sobrenadante foi descartado e repetiu-se a lavagem com xilol três vezes. Em seguida adicionou-se 1ml de etanol 100%. Homogeneizou-se por 20 segundos e centrifugou-se 14000 rpm por 2 minutos. Descartou-se o sobrenadante e repetiu-se a lavagem com xilol e etanol 100%. Após isso, deixou-se o *pellet* secando a temperatura ambiente por 1 hora. Por último as amostras foram armazenadas em freezer -20°C para a extração de DNA.

5.2. Extração de DNA de tecido desparafinado

A extração de DNA foi realizada do material desparafinado conforme o subitem 4.1. Adicionou-se ao microtubo 540 ul de TLN (Quiagen) e 60 ul proteinase K (PK) 20 mg/ml. Incubou-se a 55°C no *shaking* a 500 pm *overnight*. Em seguida, incubou-se os microtubos a 95°C por 10 minutos. Adicionou-se 2,7 ul de RNase e incubou-se os microtubos a 37°C por 1h30 minutos. Após isso, os microtubos ficaram a temperatura ambiente para o resfriamento. Em seguida, adicionou-se 542,7 ul de fenol/clorofórmio, homogeneizou-se e centrifugou-se a 14000 rpm por 5 minutos. Transferiu-se o sobrenadante para um novo microtubo e adicionou-se 0,2 volume (volume da fase aquosa x 0,2) de acetato de amônia 5mM (ou 10mM). Em seguida, adicionou-se 0,8 volume (volume da fase aquosa x 0,8) de glicogênio (total do volume resultante da etapa anterior x 0,08). Após isso, adicionou-se 2 volumes (volume da fase aquosa x 2) de Etanol 100%. Refrigerou-se as amostras por 3 horas. Em seguida, centrifugou-se 14000 rpm por 5 minutos, descartou-se o sobrenadante e o *pellet* secou por 25 minutos. Adicionou-se 100 ul de Etanol 70% e centrifugou-se 14000 rpm por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* secou por 25 minutos. Ressuspendeu-se o *pellet* com 200 ul de água ultrapura. A leitura da concentração de DNA foi realizada utilizando-se espectrofotômetro (NanoDrop® 2000).

5.3. PCR quantitativa em tempo real

A técnica de PCR quantitativa em tempo real foi realizada para a determinação de alterações do número de cópias dos genes *EGFR*, *HER3*, *HER4*, *AKT1*, *AKT2*, *PIK3CA* e *PTEN*.

As sondas utilizadas foram adquiridas da ThermoFisher™ e as reações de amplificação foram realizadas na máquina ABI 7500 Fast. Foi utilizado o ensaio TaqMan® Copy Number Assays da empresa Life Technologies™. Essa metodologia foi baseada em uma reação dupla de PCR em tempo real que detecta a sequência do gene

alvo do estudo e a sequência de um gene de referência (RNASE P) conhecido por apresentar duas cópias em um genoma diploide.

A PCR foi realizada em um volume total de 10 µl por poço em uma placa de 96 poços. Cada poço continha 5 µl TaqMan Universal MasterMix, 2 µl de DNA (5ng/µl), 0,5 µl de cada primer e sonda (Taqman® Copy Number Assays) e 2µl de água ultrapura. Todas as reações de amplificação foram feitas em triplicata e, além das amostras tumorais, foi incluído DNA controle com número diploide para todos os genes alvos. RNASE P foi utilizado como gene de referência. As condições da PCR incluíram 1 ciclo de 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 60 segundos a 60°C. Somente foram consideradas para análise as amostras que apresentaram valor de CT > 33 ciclos e valor de z-score ≥ 2.65 , conforme especificado pelo fabricante. O número de cópias foi calculado pelo método da quantificação relativa: $2^{-\Delta\Delta CT}$ multiplicado por 2 (indivíduos diploides). As análises dos dados foram realizadas utilizando-se o software CopyCaller (Life Technologies™). Os reagentes utilizados nestas reações e suas especificações do ciclo de PCR encontram-se descritos na Tabela 3. Neste trabalho, aumento de 3 e 4 cópias foram considerados ganhos, aumentos de 5 ou mais cópias, amplificações. Deleções e perdas são aquelas com zero e uma cópia gênica, respectivamente.

Tabela 3: Sondas TAQMAN®, reagentes e ciclo de amplificação utilizados nos ensaios de PCR em tempo real

		SONDA TAQMAN®
		Marcação
Genes Alvo	<i>EGFR</i>	
	<i>HER3</i>	
	<i>HER4</i>	
	<i>AKT1</i>	
	<i>AKT2</i>	
	<i>PIK3CA</i>	
	<i>PTEN</i>	
Gene de Referência	<i>RNASE P</i>	5'= Repórter - VIC 3'= Quentcher - TAMRA
Master Mix	Taq Gold DNA polymerase (Hot start), dNTPs	
Ciclos de PCR	Hold: 95°C - 10 minutos 40 Ciclos: 95°C - 15 segundos/ 60°C - 60 segundos	

6. RESULTADOS

6.1. Capítulo I- Artigo I: Copy number analyzes of the PI3K/AKT reveal *HER3/EGFR* amplification and *PTEN* deletion in hrHPV penile carcinoma

Artigo submetido na revista: The Journal of Urology

Qualis Medicina I: A1

Fator de impacto: 5.157

Copy number analyzes of the PI3K/AKT reveal *HER3/EGFR* amplification and *PTEN* deletion in hrHPV penile carcinoma.

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

From the Department of Biology (SRFP, JMM, MRCEB, AALTJ), Pathology (GEBS) and Medicine II (EVLS, JC), Universidade Federal do Maranhão and Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Belo (LRN, RWPC) São Luis, MA, Brazil and Department of Genetics and Molecular Biology (JDP), Universidade Federal do Pará, Brazil and Department of Oncology, Georgetown Lombardi Comprehensive Cancer Center Washington, DC.

* Correspondence: Department of Biology, Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses, 1966 Bacanga, São Luis, Brazil, CEP:65080-540 (email: silma.pereira@ufma.br)

Purpose: Penile cancer is a rare neoplasm in developed countries; however, its incidence is high in developing countries. The etiology for this disease is heterogeneous and environmental factors such as phimosis, precarious sanitation and HPV infection, are considered risk factors. The knowledge of genetic alterations that are involved in the onset and progression of penile cancer is limited; Alterations on the PI3K/AKT cell signaling pathway are present in several types of cancers, however, it is not well known the role of this pathway in penile cancer.

Material and Methods: Thirty four formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) samples of squamous cell carcinoma (SCC) from patients with penile cancer were analyzed for copy number alterations in the *EGFR*, *HER-3*, *HER-4*, *PTEN*, *AKT-1*, *AKT2* and *PIK3CA* genes. The analysis was conducted by Taqman Copy Number Assays, and the data correlated with clinical-histopathological parameters and HPV-infection status.

Results: A high frequency of the cases analyzed presented copy number increase for the *HER3* (100%) and *EGFR* (90.6%) genes, followed by the *HER4* (20.6%) and *AKT1* (15.1%). Deletions were observed for the *PIK3CA*, *HER4*, *PTEN* and *AKT2* in 56.2%, 52.9%, 39.4% and 36.4% of the cases, respectively. No significant association was observed between copy number alterations and any of the clinical-histopathological variables analyzed. However, most of the patients with CNAs presented with HPV infection (91.2%), out of which 87% were of high oncogenic risk.

Conclusions: In this study, we observed copy number alterations in the PI3K/AKT pathway in a high frequency of penile cancer patients, most of which presenting with hrHPV infection. This data indicate the relevance of this pathway for penile carcinogenesis and warrants further studies to determine their impact in gene and/or protein expression levels, most notably in hrHPV + patients.

Keywords: mutation, tumorigenesis, squamous cell carcinoma, biomarker, EGFR

INTRODUCTION

Penile cancer is a rare malign neoplasm in developed countries, however presents a major social impact in developing countries, where its incidence can be as high as 10% in some countries of Asia, Africa and South America (CALMO et al., 2011; CHRISTOULIDOU et al., 2015). Among South American countries, Brazil stands out with one of the world's highest occurrence rates, 2.9-6.8/100.000 inhabitants, with rising incidences after the fourth decade of life (FAVORITO et al., 2008; POW-SANGET al., 2010). Strong risk factors associated with the disease include poor socioeconomic conditions, lack of hygiene, phimosis and infection by Human Papilloma Virus (HPV) (KAYES et al., 2007; SOUSA et al, 2015).

Epidemiological and molecular studies on penile cancer are scarce and the biology of this tumor is still poorly understood (DI LORENZO et al, 2013). Patients are usually diagnosed in advanced stages of the disease, when therapeutic options are less efficient (BLAIS et al, 2014). In fact, the treatment for PeCa, based mostly in the tumor stage and location, is limited to partial or total penectomy. Although distant metastasis is rare in patients with PeCa, the presence on lymph node metastasis is considered a significant poor prognostic factor, which can reduce the 5 year survival rate to below 40% (GUIMARÃES et al, 2009; CUBILLA et al, 2009). High histological grade and presence of vascular and perineural invasion are also associated to a unfavorable prognosis. (AITA et al., 2015).

HPV's role on the etiology of penile cancer is also unclear, but it is known that the medium global prevalence is of 46.9% (AFONSO et al., 2012), mainly for viral subtypes HPV16 and HPV18 (BRADY et al., 2013). Genomic instability is a common characteristic for HPV-induced cancers (AKAGI et al., 2014), in such a way that when interacting with the host's genome, different molecular pathways are disrupted. One of the most notorious mechanisms related to HPV-mediated carcinogenesis is the ability of viral oncogenes to interfere with the activity of TP53 and Rb proteins, mediating cell transformation and proliferation, as it has been described already for cervix cancer (GIULIANO et al, 2011; BURT et al, 2014). However, other possible molecular pathways involved in penile carcinogenesis are still poorly known, be them associated or not to HPV infection.

The tyrosine kinase receptor family ErbB or HER (Human epidermal growth factor receptor) regulates a series of biological processes that control cell cycle. Members of that family include *HER1* (*EGFR*), *HER2*, *HER3* and *HER4*, which are frequently found overexpressed in many types of cancers (EARP et al, 2003; HSIEH e MOASSER, 2007; FREDERICK et al, 2008). Literature reports that overexpression of these receptors activates downstream genes from the *PI3K/ATK* pathway involved in the control of cell growth, progression and survival, angiogenesis and apoptosis (WEIGELT et al, 2012; PROTZEL e SPIESS, 2013). Some works have reported the interaction of HPV with genes from the ErbB family on the development of cervix cancer, where overexpression of EGFR and decrease of *HER3* took place after viral integration (PAOLINI et al., 2016).

On the other hand, genes from the *PI3K/ATK* pathway have been reported as altered in many solid tumors (YADAV et al., 2016). Recently, KONGAR et al. (2017) described that *PI3KCA* is the most frequently mutated gene in anal squamous cell cancers, cervix cancers, as well as oropharyngeal and vulvar cancers, followed by the loss of *PTEN*. In the same way, genetic signature has been a target for studies in squamous cell carcinoma in the head and in the neck, with or without HPV infection. These studies have showed a different mutational profile according to the HPV status, including genetic alterations in the receptor pathways linked to growth factors and PI3K (SEIWERT et al., 2015).

Among the genomic alterations found on cancers, copy number alterations (CNAs) have a critical role in activating oncogenes and deactivating suppressor genes of tumors, taking part in signaling cascades that control cell cycle. Taking into consideration that HPV is an induction factor for squamous cell cancer, integrating itself in the human genome (CHU-YI LIU et al, 2015), and knowing that the rise of copy numbers is one of the genetic mechanisms involved in epithelial cell carcinoma (LIDA et al, 2011; JIÃO et al, 2015), we have attempted to verify the role of the virus in the disruption of the pathway mediated by epidermal growth factors and *PI3K*. We have tried to shed a light on the role of HPV in the establishment and progression of penile cancer in a sample characterized by advanced tumors and high frequency of high risk HPV.

MATERIAL AND METHODS

PATIENTS AND TUMOR SAMPLES

Fifty-five patients diagnosed with penile cancer (PeCa), not submitted to neoadjuvant treatment, went under surgical procedures at the Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello (IMOAB) and at the Hospital Universitário Presidente Dutra at the Universidade Federal do Maranhão (HU-UFMA), in São Luís, Maranhão, Brazil. All patients signed a consent form approved by the Research Ethics Committee from the Universidade Federal do Maranhão, Brazil, under protocol number CAAE: 46371515.5.0000.5087, which authorizes sampling of tumors for this study. These patients were characterized according to their socioeconomic conditions, smoking habits, alcoholism and tumor clinical and histopathological parameters. All tumors were classified as squamous cell carcinoma (SCC).

Analyses for copy number alterations (CNAs) were performed in a subset of 34 formalin-fixed paraffin-embedded tissue (FFPE), containing more than 70% of tumor cells. Previously, MACEDO et al. (2017) detected HPV DNA in these tumor samples, in which 91.2% (31/34) had HPV infection, and of these, 87.1% had high oncogenic risk.

COPY NUMBER ALTERATIONS (CNAS) ANALYSIS

Prior to DNA isolation, 10 µm FFPE tissue sections containing more than 70% of tumor epithelial cell populations were selected by an expert pathologist at Presidente Dutra Hospital from the Universidade Federal do Maranhão. Samples were dewaxed with 3 bath cycles of 1ml xylene for 5 minutes at 50°C, followed by centrifugation for 2 minutes at 14,000 rpm. Then, the material was dehydrated in 3 baths with absolute alcohol. For DNA extraction we added 540 µl of ATL (Qiagen) and 60 µl of Proteinase K at 55°C (overnight). We then added 2.7 µl of RNase at 37°C for 1h 30min. DNA was extracted using phenol-chloroform and precipitated with ammonia acetate 5 mM, glycogen and cold ethanol 100%; afterwards, it was washed using ethanol 70%. DNA pellet was diluted with 50 µl ultrapure water. DNA concentration level was read using a spectrophotometer (NanoDrop® 2000).

TaqMan® Copy Number Assays (Life Technologies™) was used to determine CNA for genes *EGFR*, *HER3*, *HER4*, *AKT1*, *AKT2*, *PIK3CA*, *PTEN*. Probes were acquired from ThermoFisher™ and amplification reactions were run in an ABI 7500 Fast machine. PCR was performed in a total volume of 10 µl per well in a 96-well plate. Each well contained: 5 µl TaqMan Universal MasterMix, 2 µl DNA (5 ng/µl), 0.5 µl of each primer and probes (Taqman® Copy Number Assays) and 2µl ultrapure water. All amplification reactions were performed in triplicates and, in addition to tumor samples, control DNA with diploid number was included for all target genes. RNASE P was used as a reference gene. Conditions for PCR run included: 1 cycle of 10 minutes at 95°C, 40 cycles of 15 seconds at 95°C and 60 seconds at 60°C. Only samples with a CT

value > 33 cycles and z-score value ≥ 2.65 were considered for analysis, as specified by the manufacturer. The number of copies was calculated by the relative quantification method: $2^{-\Delta\Delta CT}$ multiplied by 2 (diploid individuals). Data analysis was carried out using CopyCaller software (Life Technologies™). For this study, an increase of 3 and 4 copies was considered as gain; an increase of 5 or more copies, amplifications. Deletions and losses are those with zero and one copy, respectively.

STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analysis was conducted on the STATA® ver. 14 program. Chi-square test, or Fisher's exact test, was used to compare clinic-histopathological, variables with copy number alterations. We considered as statistically significant values with $p < 0.05$.

RESULTS

CHARACTERIZATION OF PATIENTS AND TUMORS

The patients (N=55) were diagnosed with penile cancer with an average age of 62 ± 17.9 , ranging from 23 to 103 years old. Most of them (78%) were married; had low levels of studying, with only 7.5% having a high school degree; 51% were smokers; 30% have declared to regularly drink alcohol; 67% presented phimosis; and 94% were infected by HPV. The most common occupations were farmer (39%), fisherman (8.9%) and security person (3.6%). As for the tumors, 100% were classified as SCC, 37.5% being restricted to the glans; most belonged to the usual histological subtype (43.6%) and presented high type II histological grade (63%) (table 1). Regarding surgical treatments, patients were submitted to partial (71%) or total (23%) penectomy.

We did not observe any association between HPV infection and the presence of phimosis, alcoholism, smoking, staging or lymphatic invasion. However, we did notice higher infection rates by HPV in condylomatous and usual tumor subtypes ($p = 0.037$), with 70% of tumors belonging to the usual subtype being positive for HPV, out of which 50% were of high oncogenic risk. We also observed an association between differentiation degree and tumor size ($p = 0.026$), so that smaller tumors were presented as more differentiated (grade I), contrasting with larger tumors, which were little or moderately differentiated (grade II and III).

Table 1: Clinical and histopathological characteristics of 55 penile tumors.

Tumor parameters	Total (%)
Topography	
Glans	21 (37.5)
Glans + foreskin	11 (19.6)
Glans and other areas	24 (42.8)
Histological Type	
Squamous Cell Carcinoma	55 (100)
Histological Subtype	
Usual	24 (43.6)
Condylomatous	17 (31)
Mixed	9 (16)
Basaloid	4 (7.2)
<i>In situ</i>	1 (2)
Differentiation Grade:	
I	8 (15)
II	34 (63)
III	12 (22)
Primary tumor (T):	
pT1	11 (21)
pT2	19 (37)
pT3	22 (42)

HER3 AND EGFR ARE HIGHLY AMPLIFIED IN hrHPV+ PENILE CANCER

Tables 2 and 3 reveal the copy number alterations (CNAs) for genes related to the signaling pathway PI3K/AKT (*EGFR*, *HER-3*, *HER-4*, *AKT1*, *AKT2*, *PIK3CA*, *PTEN*) detected in penile tumors (n=34). We observe that 100% of the tumors presented an increase in *HER3* copies number, with an increase rate average of 13.5 ± 5.3 . Out of those, 93.9% presented as amplified, with 84.4% having 10 or more copies (Figure 1). *EGFR* also showed an increase in copies for 87.8% of tumor samples, out of which 65.6% were amplifications, with 48.2% having more than 10 copies. Besides, genes *HER4* and *AKT1* also presented an increase in the number of copies of 20.6% and 15%, respectively, but with a smaller increase rate average (5.8 ± 2.2 and 3.6 ± 0.9 , respectively). *AKT1* had a higher percentage of tumors with a regular number of copies (78.8%). On the other hand, genes *PI3KCA*, *HER4*, *PTEN* and *AKT2* presented a higher percentage of samples with deletions, with 56%, 52.9%, 39% and 36%, respectively. Loss of copies was also frequent on tumors, so that genes *AKT2*, *PTEN* and *PI3KCA* appeared in heterozygosis in 60.6%, 54.5% and 37.5%, respectively. Thus, these three genes displayed a loss of at least one copy in more than 90% of penile tumors.

We could not find a significant association between copy number alterations and clinical-histopathological variables. However, we highlight the fact that the sampling subgroup for which CNAs were analyzed (N=34) presented a high HPV infection rate (91.2%), out of which 87% were of high oncogenic risk.

Table 2 Molecular profile of genes from the *PIK3/AKT* signaling pathway in 34 PeCa.

Case number	HPV Genotyping	Histological Subtype	Tumor grade	Tumor size	DNA Copy Number Alteration						
					<i>HER3</i>	<i>EGFR</i>	<i>HER4</i>	<i>PTEN</i>	<i>AKT1</i>	<i>AKT2</i>	<i>PIK3CA</i>
01	11,06	Usual	II	2,1-5	Amp	Amp	Del	Loss	Loss	Loss	Del
02	11	Usual	II	2,1-5	Amp	Normal	Del	Loss	Normal	Loss	Loss
03	negative	Usual	II	2,1-5	Gain	Normal	Del	Del	Loss	-	Del
04	16	Usual	II	2,1-5	Amp	Amp	Del	Loss	Gain	Normal	Loss
05	16	Condy	II	5,1-10	Amp	Gain	Del	Del	Normal	Del	-
06	negative	Usual	II	2,1-5	Amp	Gain	Normal	Del	Normal	Del	Del
07	18,53	Condy	II	2,1-5	Amp	Amp	Del	Loss	Normal	Del	Del
08	30	Usual	II	5,1-10	Amp	Gain	Del	Del	Normal	Del	Loss
09	30	Condy	I	2,1-5	Amp	Amp	Normal	Loss	Normal	Loss	Loss
10	73,74	Mixed	I	0,6-2	Amp	Amp	Amp	Normal	Normal	Loss	Loss
11	35,59	Usual	II	2,1-5	Amp	Amp	Gain	Loss	Normal	Loss	Loss
12	59	Mixed	II	2,1-5	Amp	Amp	Del	Del	Normal	Del	Del
13	16,74	Mixed	I	0,6-2	Amp	Normal	Del	Del	Normal	Del	Del
14	16,06	Mixed	III	2,1-5	Amp	Amp	Amp	Loss	Normal	Loss	Normal
15	58	Mixed	III	2,1-5	-	-	Normal	Del	Normal	Loss	Del
16	51,58	Mixed	II	2,1-5	Amp	Amp	Amp	Loss	Normal	Loss	Loss
17	16	Condy	III	2,1-5	Amp	Amp	Gain	Loss	Normal	Loss	Loss
18	16	Usual	III	2,1-5	Amp	Amp	Normal	-	Gain	Del	Del
19	59,66	Condy	II	2,1-5	Amp	Amp	Normal	Loss	Normal	Loss	Del
20	16	Usual	III	5,1-10	Amp	Amp	Normal	Loss	Normal	Loss	Loss
21	16,66	Condy	I	5,1-10	Amp	Amp	Del	Loss	Normal	Del	Del
22	negative	Usual	II	2,1-5	Amp	Amp	Del	Del	Normal	Del	Del
23	52	Condy	II	2,1-5	Amp	Gain	Del	Del	Normal	Del	Del
24	16	Usual	II	5,1-10	Gain	-	Del	Del	-	Loss	Del
25	56	Basal	II	5,1-10	Amp	Amp	Amp	Loss	Normal	Loss	Loss
26	11,35,59	Condy	II	5,1-10	Amp	Amp	Normal	Loss	Normal	Loss	Del
027	16,74	Condy	II	2,1-5	Amp	Amp	Loss	Del	Normal	Del	Del
28	16,35,59	Usual	II	2,1-5	Amp	Amp	Del	Normal	Normal	Loss	Normal
29	16	Condy	I	5,1-10	Amp	Amp	Del	Del	Normal	Del	Del
30	16,44,74	Mixed	II	2,1-5	Amp	Amp	Normal	Loss	Normal	Loss	Loss
31	16	Basal	III	2,1-5	Amp	Amp	Amp	Del	Normal	Loss	Del
32	16,3	Condy	I	2,1-5	Amp	Normal	Del	Loss	Gain	Loss	Del
33	16	Condy	II	5,1-10	Amp	Gain	Del	Loss	Amp	Loss	Loss
34	16	Usual	III	2,1-5	Amp	Gain	Del	Loss	Gain	Loss	-

Abbreviations: Condy, condylomatous; Basal, basaloid; Amp, amplification; Del, deletion.

Table 3: Summary of copy number alterations detected in penile tumors for seven genes of the PI3K/AKT signaling pathway.

Genes	Copy Number alterations				
	Normal	Loss	Deletion	Gain	Amplification
<i>HER3</i> (n= 33)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (6,1)	31 (93,9)
<i>EGFR</i> (n = 32)	4 (12,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	7 (21,9)	21 (65,6)
<i>HER4</i> (n= 34)	8 (23,5)	1 (2,9)	18 (52,9)	2 (5,9)	5 (14,7)
<i>AKT1</i> (n=33)	26 (78,8)	2 (6,06)	0 (0,0)	4 (12,1)	1 (3,03)
<i>AKT2</i> (n=33)	1 (3,03)	20 (60,6)	12 (36,4)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>PIK3CA</i> (n=32)	2 (6,25)	12 (37,5)	18 (56,25)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>PTEN</i> (n=33)	2 (6,06)	18 (54,5)	13 (39,4)	0 (0,0)	0 (0,0)

Figure 1: Gene *HER3*. Increase in copy number for 33 PeCa. CN: Normal penile tissue.

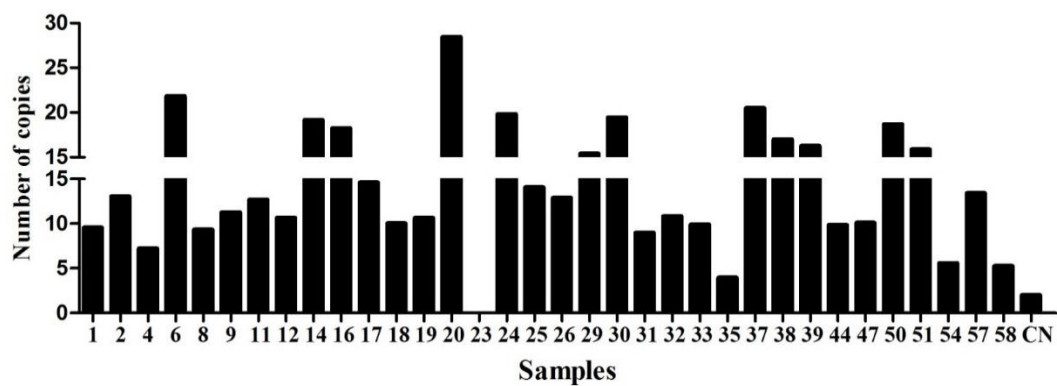
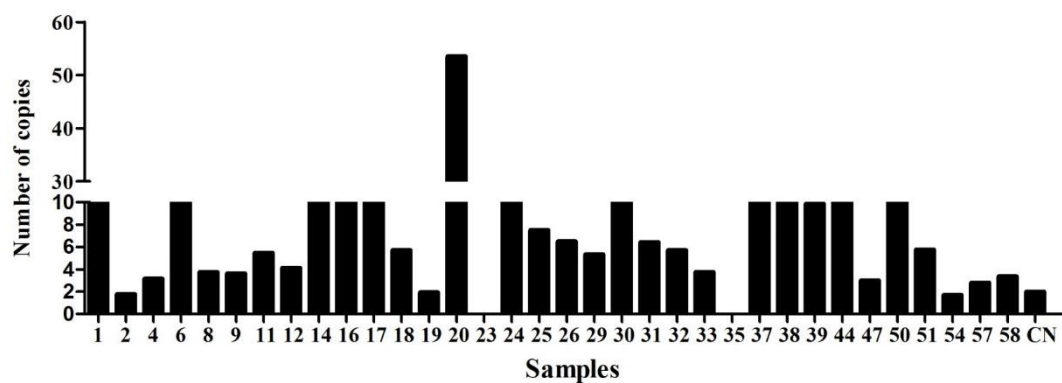


Figure 2: Gene *EGFR*. Increase in copy number for 32 penile tumor samples. CN: Normal penile tissue. Source: author.



DISCUSSION

In this study we investigated copy number alterations in the EGFR/PI3K/AKT signaling pathway in penile tumors of an economically disadvantaged population, poorly schooled and socially vulnerable. Individuals had an average age of 62 years when diagnosed, corroborating with studies that mention that the high incidence of the disease occurs from the sixth decade of life (FAVORITO et al, 2008; COUTO et al, 2014; TORBRAND et al, 2016). However, we emphasize that 12.7% of the patients were diagnosed when younger than 40 years old, showing that several risk factors may impact this population and that lack of information on prevention methods for this illness is still a reality.

All tumors were classified as squamous cell carcinoma (SCC), agreeing with previous studies conducted by CALMON et al. (2011) and CHAUX et al. (2012). Most tumors were in an advanced stage and patients were surgically submitted to partial or total penectomy. This treatment compromises sexual function, what is considered an aggravation of this tumor, since studies show that 50% of the patients suffer from psychiatric disorders post-surgery, compromising significantly patient social life (MADDINENI et al, 2008; NAM et al, 2017).

Presence of phimosis and infection by HPV were the main risk factors observed for the studied population. The high percentage of men with phimosis in this study contrasts with the low incidence of penile cancer where neonatal circumcision is frequent, what reinforces that phimosis is one of the development factors of PeCa (BUSSO-LOPES et al, 2015). Even though recent studies have not found a specific carcinogen for smegma, it has been suggested that absence of circumcision makes proper hygiene of the glans difficult, what associated to the presence of *Mycobacterium smegmatis* could cause chronic inflammation in the tissue, ultimately contributing to the etiology of the disease (CHRISTOULIDOU et al, 2015).

The majority of patients were infected by hrHPV, presenting an association between condylomatous and usual subtypes. Besides, we highlight that 50% of tumors belonging to the usual subtype presented high risk HPV, contrasting with other studies that established that the highest incidence of infection happens on basaloid and condylomatous subtypes (FERRÁNDIZ-PULIDO et al, 2012; ALEMANY et al, 2016). Genotyping of the virus in the investigated sampling subgroup for CNAs (n=34) revealed that 91.2% were positive for high risk virus. This high frequency of hrHPV reinforces the importance of the role of the virus in penile tumorigenesis. In anogenital carcinomas, especially in cervix carcinoma, degradation of P53 and Rb proteins is mediated by the viral oncogenes E6 and E7, respectively, due virus integration into genome host (AKAGI et al, 2014). However, these mechanisms are still unclear in penile cancer.

Concerning CNAs, we detected gains, amplifications, losses and deletions in all tumor samples. Genomic gains constitute one of the mechanisms through which proto-oncogenes can be activated (BUSSO et al., 2014). Furthermore, genomic losses can induce deletion of tumor suppressor genes (SAAL et al., 2007). Among the CNAs detected in this study, we highlight *HER3* and *EGFR* alterations, observed in 93.9% and 87.8% of tumors, respectively.

Our data corroborate STANKIEWICZ et al. (2011), who reported increased HER3 protein expression in 86% penis HPV+ squamous cell carcinoma. Furthermore, POLLOCK et al. (2015) also reported increased protein expression of HER2 and HER3 in head and neck HPV+ squamous cell carcinoma. Other studies have been demonstrating changes in the expression of these receptors in breast, ovarian and prostate tumors. HER3 and HER4 expression, as well as phosphorylation of these receptors, has been associated to the worst prognostic and to resistance to treatment with EGFR inhibitors (MOTA et al., 2017). We emphasize that amongst members of the epidermal receptors family, *HER3* has been identified as the most critical activator of the PI3K/AKT pathway, so that a monoclonal antibody, seribantumab (MM-121), was designed to

bind itself to this receptor and block the signaling pathway induced by extracellular growth factors heregulin and betacellulin (SHOEBERL et al, 2017).

In the present study, *EGFR* presented high frequency of tumors with an increase in copy number (90.7%) and increased mRNA expression in the same tumor samples (MACEDO et al, 2017). *EGFR* amplification and its overexpression have been associated to the worst prognostic for squamous cell carcinoma of head and neck, breast and lung cancer (CHUNG et al, 2006; REIS-FILHO et al, 2005; LEE et al, 2013; Li et al, 2015). Our data has shown too that all tumor specimens for which *EGFR* amplified also amplified *HER3*, all being positive for HPV (two in regular tissue adjacent to the tumor), reinforcing the role of the PI3K/AKT pathway in penile tumorigenesis. These findings contrast with STANKIEWICZ et al. (2011), who correlated increased expression of *HER3* to viral infection, while increased *EGFR* expression was related to virus absence. Despite these immunohistochemical studies suggest that EGFR expression is a common event in penile carcinoma (STANKIEWICZ et al, 2011; CHAUX et al, 2013), studies did not demonstrate the genetic mechanism that would lead to this increased protein expression.

Our data also show a loss of *PTEN* in 54.5% of tumor tissue, and deletion in homozygosis in 39.4%. These data corroborate with CHAUX et al. (2014) when they related that for 75% of penile tumors there has been a reduction of PTEN protein expression, besides loss of expression in 13% cases. Similar immunohistochemical data were obtained by STANKIEWICZ et al. (2011) who found a reduction of PTEN expression in 62% of the tumors; however, these authors did not find alterations in copy numbers through fluorescent in situ hybridization (FISH) that could justify low protein expression. Thus, our study reports the genetic mechanism involved in the deregulation of the *EGFR/HER/PTEN* pathway in penile cancer, reinforcing the usefulness of these markers to select candidate patients for specific therapies.

Most tumors require PI3K/Akt signaling for their survival, and this is often achieved by upstream receptor tyrosine over activity, by mutational activation of PI3K, or inactivation of PTEN (CAMPBELL et al, 2010). Our results reveal that most tumors presented regular or heterozygous copy numbers for *AKT1* and *AKT2*. In these cases, we believe that amplification of epidermal factors receptors activate constitutive signaling of the PI3K/AKT pathway. However, the occurrence of deletions in genes *PI3KCA* and *AKT2* by 56.2% and 37.5% of tumors, respectively, suggests that for penile tumors with such molecular profile constitutive signaling of the HER receptor family may lead to tumorigenesis through other signaling pathways. MOTA et al. (2017) emphasizes that heregulin activates several intracellular pathways when linked to HER3 or HER4. Pathways activated by HER3 include: MAPK/ERK, JAK/STAT and PKC, besides PI3K/AKT/MTOR, while HER4 activates pathways JAK/STAT and PI3K/AKT. Furthermore, SHOEBERL et al (2017) defined ErbB3 as the most sensitive node with respect to AKT inhibition, opening up the possibility to use anti-HER therapy to treat penile cancer.

Viral integration seems to be favored in fragile sites of the host genome. The regions have great genomic instability, generated by the formation of secondary structures stable in DNA and by the presence of AT and CGG repetitions, which interfere on molecule replication (GAO and SMITH, 2016), what could lead to variation in copy number of genes located in these same regions or next to them (AKAGI et al., 2014). Therefore, we propose that there is a relationship between hrHPV integration and the occurrence of CNAs in penile carcinoma. This hypothesis is sustained by some studies that have already identified genes located in sites of viral integration (WENTENSEN et al., 2004). Although these sites seem to be distributed randomly in all chromosomes, GAO and SMITH (2016) cited that 50% of HPV16 and 60% of HPV18 have been integrated to fragile sites, such as *FRA10A*, in which gene *PTEN* is located.

Finally, considering the high frequency of HPV in evaluated tumors, we believe that copy number alterations in penile cancer are related to virus integration. The EGFR/PI3K/AKT/PTEN

pathway has been displayed highly altered in penile tumors infected by hrHPV. Herein, we describe the genetic mechanisms that lead to differential expression of epidermal receptors and their downstream targets. Genes *EGFR*, *HER3* and *HER4* are being upregulated while *PTEN* is downregulated in penile carcinoma. Our data point out to genes *HER3* e *EGFR* as relevant biomarkers in penile carcinogenesis, and potential targets for future studies on specific therapies.

Finally, considering the high frequency of HPV in evaluated tumors, we believe that copy number alterations in penile cancer are related to virus integration. The EGFR/PI3K/AKT/PTEN pathway has been displayed highly altered in penile tumors infected by hrHPV. Herein, we describe the genetic mechanisms that lead to differential expression of epidermal receptors and their downstream targets. Genes *EGFR*, *HER3* and *HER4* are being upregulated while *PTEN* is downregulated in penile carcinoma. Our data point out to genes *HER3* e *EGFR* as relevant biomarkers in penile carcinogenesis, and potential targets for future studies on specific therapies.

REFERENCES

- [1] Calmon, M.F.; Mota, M.T.; Vssalo, J.; Rahal, P. Penile carcinoma: risk factors and molecular alterations. *The Scien Wor Jour*. 2011; 11: 269–282.
- [2] Christoulidou, M.; sahdev, V.; houssein, S.; Muneer, A. Epidemiology of penile cancer. *Curr Probl Cancer*. 2015; 39(3):129-136.
- [3] favorito, L.A.; Nardi, A.C.; et al. Epidemiologic Study on Penile Cancer in Brazil. *Brazilian Society of Urology*, 2008; v. 34 (5), p. 587-593.
- [4] Pow-Sang, M. R. et al. Epidemiology and natural history of penile cancer. *Urology*, 2010;. 76, n. 2, p. S2-S6.
- [5] Kayes, O.; Ahmed, H.U.; Arya, M.; Minha, S. Molecular and genetic pathways in penile cancer. *Lancet Oncology*, 2007; v.8(5), p. 420-429.
- [6] DE SOUSA, I. D. B. et al. Prevalence of human papillomavirus in penile malignant tumors: viral genotyping and clinical aspects. *BMC urology*, 2015; v. 15, n. 1, p. 13.
- [7] Di Lorenzo, G. et al. EGFR mutational status in penile cancer. *Expert opinion on therapeutic targets*, 2013; v. 17, n. 5, p. 501-505.
- [8] Normand Blais and Elie Kassouf. Managing advanced penile cancer in 2014. *.supportiveandpalliativecare*, 2014; 8:241–249.
- [9] Guimarães, G. C. et al. Penile squamous cell carcinoma clinicopathological features, nodal metastasis and outcome in 333 cases. *The Journal of urology*, 2009; v. 182, n. 2, p. 528-534
- [10] Cubilla, A.L. The role of pathologic prognostic factors in squamous cell carcinoma of the penis. *Wor Jour Urol*, 2009;27:169-77.
- [11] Aita, G. A. et al. Tumor histologic grade is the most important prognostic factor in patients with penile cancer and clinically negative lymph nodes not submitted to regional lymphadenectomy. *International braz j urol*, 2016; v. 42, n. 6, p. 1136-1143.
- [12] Peter Kirrander; Aleksandra Kolaric; Gisela Helenius; Torgny Windahl; Ove Andrén; Jennifer Rider Stark; Gabriella Lillsunde-Larsson; Fredrik Elgh; Mats Karlsson. Human

papillomavirus prevalence, distribution and correlation to histopathological parameters in a large Swedish cohort of men with penile carcinoma. *Bju International*, 2010; v 108: 355-359.

[13] Afonso, L. A. et al. Prevalence of human papillomavirus and Epstein-Barr virus DNA in penile cancer cases from Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2012; v. 107, n. 1, p. 18-23.

[14] KIMBERLY L. BRADY, MD, MARY GAIL MERCURIO, MD, AND MARC D. BROWN, MD. Malignant Tumors of the Penis. *Dermatol Surg*, 2013;39:527–547.

[15] Akagi, K. et al. Genome-wide analysis of HPV integration in human cancers reveals recurrent, focal genomic instability. *Genome research*, 2014; v. 24, n. 2, p. 185-199.

[16] Anna R Giuliano, Ji-Hyun Lee, William Fulp, Luisa L Villa, Eduardo Lazcano, Mary R Papenfuss, et al. Incidence and clearance of genital human papillomavirus infection in men (HIM): a cohort study. *Lancet*, 2011; 377: 932–40.

[17] Lindsay M. Burt, MD, Dennis C. Shrieve, MD, PhD, and Jonathan D. Tward, MD, PhD. Stage Presentation, Care Patterns, and Treatment Outcomes for Squamous Cell Carcinoma of the Penis. *Int J Radiation Oncol Biol Phys*, 2014; V 88, No. 1, p. 94e100.

[18] H. Shelton Earp III, M.D.; Benjamin F. Calvo, M.D., Carolyn I. Sartor, M.D. The egf receptor family-multiple roles invproliferation, differentiation, and neoplasia with an emphasis on HER4. 2003;v 114, p. 315-334.

[19] Achsieh; MM Moasser. Targeting HER proteins in cancer therapy and the role of the non-target HER3. 2007, *British Journal of Cancer*; v 97, 453 – 457.

[20] BrittaWeigelt; Julian Downward. Genomic determinants of PI3K pathway inhibitor response in cancer. 2012; v 2, 1-16.

[21] Chris Protzel; Philippe E. Spiess. Molecular Research in Penile Cancer—Lessons Learned from the Past and Bright Horizons of the Future? *Int. J. Mol. Sci.* 2013; v 14, p. 19494-19505.

[22] Francesca Paolini; Gianfranca Curzio; Elisa Melucci; Irene Terrenato; Barbara Antoniani; Mariantonia Carosi; Marcella Mottolese; Patrizia Vici; Luciano Mariani; Aldo Venuti. Human papillomavirus 16 E2 interacts with neuregulin receptor degradation protein 1 affecting ErbB-3 expression in vitro and in clinical samples of cervical lesions. *European Journal of Cancer* 2016; v. 58, p. 52- 61.

[23] Shalini Singh Yadav; Jinyi Li; Jennifer A. Stockert; James O'Connor; Bryan Herzog; Cordelia Elaiho; Matthew D. Galsky; Ashutosh Kumar Tewari; Kamlesh Kumar Yadav. *Oncotarget*. 2016; v. 7. P. 76181- 76196.

[24] Robert F. Koncar; Rebecca Feldman; El Mustapha Bahassi; Nooshin Hashemi Sadraei. Comparative molecular profiling of HPV-induce Squamous cell carcinomas. *Cancer Medicin*, 2017; 6(7):1673–1685.

[25] Tanguy Y. Seiwert¹; Zhixiang Zuo; Michaela K. Keck; Arun Khattri; Chandra S. Pedamall; Thomas Stricker; Christopher Brown; Trevor J. Pugh; Petar Stojanov, Juok Cho, Michael S. Lawrence, Gad Getz, Johannes Brägelmann, Rebecca DeBoer, Ralph R. Weichselbaum. *Clin Cancer Res*, 2015; 21(3): p. 632- 641.

- [26] Chu-Yi Liu; Fan Li; Yi Zeng; Min-zhong Tang; Yulu Huang; Jin-Tao Li; Ru-Gang Zhong. Infection and integration of high-risk human papillomavirus in HPV-associated cancer cells. *Med Oncol*, 2015; 32: v. 109: 5-8.
- [27] K Iida, K Nakayama; MT Rahman¹, M Rahman; M Ishikawa; A Katagiri¹, S Yeasmin¹ Y Otsuki. Et al. EGFR gene amplification is related to adverse clinical outcomes in cervical squamous cell carcinoma, making the EGFR pathway a novel therapeutic target. *British Journal of Cancer*, 2011; v. 105, 420 – 427.
- [28] Jiao Li,; Wei Su; Sheng Zhang,¹ Yunhui Hu; Jingjing Liu,¹ Xiaobei Zhang; Jingchao Bai; Weiping Yuan. et al. Epidermal growth factor receptor and AKT1 gene copy numbers by multi-gene fluorescence in situ hybridization impact on prognosis in breast cancer. *Cancer Sci*, 2015; v. 106; p. 642–649.
- [29] Couto, T. C. et al. Epidemiological study of penile cancer in Pernambuco: experience of two reference centers. *International braz j urol*, 2014; v. 40, n. 6, p. 738-744.
- [30] Torbrand, C. et al. Socioeconomic factors and penile cancer risk and mortality: a population-based study. *BJUI Internatinal*, 2016; p. 2-7.
- [31] Marilia F. Calmon; Mânlio Tasso Mota; José Vassallo; and Paula Rahal. Penile Carcinoma: Risk Factors and Molecular Alterations. *The Scientific World Journal*, 2011; v. 11, p. 9–282.
- [32] Chaux, A.; CUBILLA, A. L. Advances in the pathology of penile carcinomas. *Human pathology*, 2012; v. 43, n. 6, p. 771-789.
- [33] Satish B Maddineni; Maurice M Lau; Vijay K Sangar. Identifying the needs of penile cancer sufferers: A systematic review of the quality of life, psychosexual and psychosocial literature in penile cancer. *BMC Urology*, 2009; v. 9:8, p. 1-6.
- [34] Nam, Jong Kil et al. Clinicopathologic Characteristics and Treatment Outcomes of Penile Cancer. *The world journal of men's health*, 2017; v. 35, n. 1, p. 28-33.
- [35] Ariane F. Busso-Lopes; Fabio A. Marchi; Hellen Kuasne; Cristovam Scapulatempo-Neto; Jos_e Carlos S. Trindade-Filho; Carlos M_arcio N. de Jesus; Ademar Lopes; Gustavo C. Guimarães; Silvia R. Rogatto. Genomic Profiling of Human Penile Carcinoma Predicts Worse Prognosis and Survival. *American Association for Cancer Research*, 2014; v. 8:p. 149-156.
- [36] C. Ferrándiz-Pulido; I. de Torres; V. García-Patos. Penile Squamous Cell Carcinoma. *Actas Dermosifiliogr*, 2012; 103(6):478-487.
- [37] Alemany L; Cubilla A; Halec G; Kasamatsu E; Quirós B; Masferrer E; Tous S; Lloveras B; Hernández-Suarez G; Lonsdale R; Tinoco L; Alejo M; Alvarado-Cabrero I et al. Role of Human Papillomavirus in Penile Carcinomas Worldwide. *Eur Urol*, 2016; 69(5):953-61.
- [38] Lao H. Saal; Peter Johansson; Karolina Holm; Sofia K. Gruvberger-Saal; Qing-Bai She. Et al. Poor prognosis in carcinoma is associated with a gene expression signature of aberrant PTEN tumor suppressor pathway activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007; v. 104: p. 7564–7569.
- [39] Elzbieta Stankiewicz; David M. Prowse; Mansum Ng; Jack Cuzick; David Mesher; Frances Hiscock; Yong-Jie Lu; Nicholas Watkin; Catherine Corbishley; Wayne Lam; Daniel M. Berney. Alternative HER/PTEN/Akt Pathway Activation in HPV Positive and Negative Penile Carcinomas. *Ploas One*, 2011, 6(3); 10.1371/journal.pone.0017517.

- [40] Netanya I. Pollock; Lin Wang; Gerald Wallweber; William E. Gooding; Weidong Huang; Ahmed Chenna; John Winslow; Malabika Sen; Kara A. DeGrave; Hua Li, Yan Zeng; Jennifer R. Grandis. Increased Expression of HER2, HER3, and HER2:HER3 Heterodimers in HPV-Positive HNSCC Using a Novel Proximity-Based Assay: Implications for Targeted Therapies. *Clin Cancer Res*, 2015; 21:4597-4606.
- [41] Jose Mauricio Mota; Katharine Ann Collier; Ricardo Lima Barros Costa; Timothy Taxter; Aparna Kalyan; Caio A. Leite; Young Kwang Chae; Francis J. Giles; Benedito A. Carneiro. A comprehensive review of heregulins, HER3, and HER4 as potential therapeutic targets in cancer. *On cotarget*, 2017; p. 1-24. doi: 10.18632/oncotarget.18467.
- [42] Birgit Schoeberl; Art Kudla; Kristina Masson; Ashish Kalra; Michael Curley; Gregory Finn; Emily Pace; Brian Harms; Jaeyeon Kim; Jeff Kearns; Aaron Fulgham; Olga Burenkova; Viara Grantcharova. Systems biology driving drug development: from design to the clinical testing of the anti-ErbB3 antibody seribantumab (MM-121). *Nature*, 2017; 3, 16034; doi:10.1038/npjbsa.2016.34.
- [43] Chung CH; Ely K, McGavran L; Varella-Garcia M; Parker J, Parker N; Jarrett C, Carter J; Murphy BA. Increased epidermal growth factor receptor gene copy number is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Oncol*. 2006; 1;24(25):4170-6.
- [44] Jorge S Reis-Filho; Fernanda Milanezi; Silvia Carvalho; Pete T Simpson; Dawn Steele; Kay Savage; Maryou BK Lambros; Emilio M Pereira; Jahn M Nesland; Sunil R Lakhani; Fernando C Schmitt. Metaplastic breast carcinomas exhibit EGFR, but not HER2, gene amplification and overexpression: immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization analysis. *Breast Cancer Research*, 2005; v. 7: R1028-R1035.
- [45] LeE, HA-NA; NA, Hye-KyunG; Surh, Young-Joon. Resolution of inflammation as a novel chemopreventive strategy. In: *Seminars in immunopathology*. Springer-Verlag, 2013; . p. 151-161.
- [46] Alcides Chaux MD; Enrico Munari MD; Betina Katz MD; Rajni Sharma PhDa, Kristen Lecksel. 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. *Human Pathology*, 2013; 44, 2690–2695.
- [47] Alcides Chaux; Enrico Munari; Antonio L Cubilla; Jessica Hicks; Kristen Lecksell; Arthur L Burnett; George J Netto. Immunohistochemical expression of the mammalian target of rapamycin pathway in penile squamous cell carcinomas: a tissue microarray study of 112 cases. *Histopathology*, 2014; 64, 863–871. DOI: 10.1111/his.12338.
- [48] Marcia R. Campbell; Dhara Amin; Mark M. Moasser. HER3 Comes of Age: New Insights into Its Functions and Role in Signaling, Tumor Biology, and Cancer Therapy. *Clin Cancer Res*, 2010; 16(5): DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1218.
- [49] gao, G.; Smith, D. I. Human Papillomavirus and the Development of Different Cancers. *Cytogenetic and Genome Research*, 2016; v. 150, n. 3-4, p. 185-193.
- [50] Nicolas Wentzensen; Svetlana Vinokurova; Magnus von Knebel Doeberitz. Systematic Review of Genomic Integration Sites of Human Papillomavirus Genomes in Epithelial Dysplasia and Invasive Cancer of the Female Lower Genital Tract. *Cancer Research*, 2004; 64, 3878–3884.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados obtidos neste trabalho mostraram alta frequência alterações no número de cópias dos genes da via de sinalização EGFR/PI3K/AKT/PTEN associados a alta prevalência de HPV em tumores de pênis. Assim, sugerimos que estas alterações estão relacionadas com a integração viral. Foi descrito pela primeira vez os mecanismos genéticos que levam a alteração na expressão dos membros da família ErBb e de seus alvos downstream em carcinoma peniano. Além disso, nossos resultados apontam os genes *EGFR* e *HER3* como candidatos importantes para terapias alvo-específicas no CaPe.

Nesse sentido, ressaltamos também a necessidade de avaliar a expressão gênica e proteica desses genes no tecido tumoral para avaliar seu comportamento, uma vez que, a etiologia do CaPe é heterogênea e estudos sobre sua base genética é pouco conhecida. Nessa perspectiva, seria importante estabelecer linhagens tumorais a partir das amostras alterados, afim de, estudar melhor as consequências dessas alterações para a tumorigênese peniana. Além disso, reforçamos a necessidade de testar drogas anti-EGFR e HER3 nessas linhagens celulares para avaliar sua influência na modulação da atividade desses receptores e seus alvos em tumores de pênis.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AFONSO, L.A.; MOYSÉS, N.; ALVES, G. Prevalence of human papillomavirus and Epstein-Barr virus DNA in penile cancer cases from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 107(1), p.18-23, 2012.

AKAGI, K. et al. Genome-wide analysis of HPV integration in human cancers reveals recurrent, focal genomic instability. **Genome research**; v. 24, n. 2, p. 185-199, 2014.

ALCIDES CHAUX; ENRICO MUNARI; ANTONIO L CUBILLA; JESSICA HICKS; KRISTEN LECKSELL; ARTHUR L BURNETT; GEORGE J NETTO. Immunohistochemical expression of the mammalian target of rapamycin pathway in penile squamous cell carcinomas: a tissue microarray study of 112 cases. **Histopathology**; 64, 863–871, 2014.

ANGIERO F, SORDO RD, DESSY E, et al. Comparative analysis of c-erbB-2 (HER-2/neu) in squamous cell carcinoma of the tongue: does overexpression exist? And what is its correlation with traditional diagnostic parameters? **J Oral Pathol Med**, 37:145-50, 2008.

ANIDO J, SCALTRITI M, BECH SERRA JJ, et al. Biosynthesis of tumorigenic HER2 C-terminal fragments by alternative initiation of translation. **EMBO J.** ; 25:3234-44, 2006.

BAIOCCHI G, LOPES A, COUDRY RA, ROSSI BM, SOARES FA, AGUIAR S, GUIMARÃES GC, FERREIRA FO, NAKAGAWA WT. ErbB family immunohistochemical expression in colorectal cancer patients with higher risk of recurrence after radical surgery. **Int J Colorectal Dis**; 24:1059-68, 2009.

BASELGA J, SWAIN SM. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. **Nat Rev Cancer**, 9:463-75, 2009.

BENEVOLO, M.; DONA, M.G.; RAVENDA, O.S.; CHIOCCA, S. Anal human papillomavirus infection: prevalence, diagnosis and treatment of related lesions. **Expert Ver Anti Infect**. Article in press, 2016.

BLEEKER, M.C.G.; HEIDEMAN, D.A.M.; SNIJDERS, P.J.F.; HOREMBLAS, S.; DILLNER, J.; MEIJER, C.J.L.M. Penile cancer: epidemiology, pathogenesis and prevention. **World J Urol**. 27:141-50, 2009.

BURGESS AW, CHO HS, EIGENBROT C, et al. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. **Mol Cell**; 12:541-52, 2003.

CALMON, M.F.; MOTA, M.T.; VASSALO, J.; RAHAL, P. Penile carcinoma: risk factors and molecular alterations. **The Scien Wor Jour**, 11: 269–282, 2011.

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

CARMELIET, P.; JAIN, R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature**; 407:249–257, 2000.

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

CHAUX, A.; TAMBOLI, P.; AYALA, A.; SOARES, F.; RODRÍGUEZ, I.; BARRETO, J.; CUBILLA, A.L. Warty basaloid carcinoma: clinic pathological features of a distinctive penile neoplasm: report of 45 cases. **Mod Pathol** 23:896-904, 2010.

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

CHRISTOULIDOU, M.; SAHDEV, V.; HOUSSEIN, S.; MUNEER, A. Epidemiology of penile cancer. **Curr Probl Cancer** 39(3):129-136, 2015.

CHU-YI LIU; FAN LI; YI ZENG; MIN-ZHONG TANG; YULU HUANG; JIN-TAO LI; RU-GANG ZHONG. Infection and integration of high-risk human papillomavirus in HPV-associated cancer cells. **Med Oncol**, 2015; 32: v. 109: 5-8.

CLEARY, C.; LEEMAN, J.E.; HIGGINSON, D.S.; KATABI, N.; SHERMAN, E.; MORRIS, L.; MCBRIDE, S.; LEE, N.; RIAZ, N. Biological Features of Human Papillomavirus-related Head and Neck Cancers Contributing to Improved Response. **Clin Oncol** in press, 2016.

COOPER, G. M. M., ZERR, T., KIDD, J. M. M., EICHLER, E. E. E. & NICKERSON, D. A. A. Systematic assessment of copy number variant detection via genome-wide snp COUTO, T. C. et al. Epidemiological study of penile cancer in Pernambuco: experience of two reference centers. **International braz j urol**, v. 40, n. 6, p. 738-744, 2014.

CUBILLA, A.L. The role of pathologic prognostic factors in squamous cell carcinoma of the penis. **Wor Jour Urol** 27:169-77, 2009.

CULKIN, D.J.; BEER, T.M. Advanced penile carcinoma. **Journal of Urology**, v.170(2), p. 359-65, 2003.

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

D'HAENE, B.; VANDESOMPELE, J.; HELLEMANS, J. Accurate and objective copy number profiling using real-time quantitative PCR. **Methods**, v. 50, n. 4, p. 262-70, 2010.

DALING, J.R.; MADELEINE, M.M.; JOHNSON, L.G.; et al. Penile cancer: importance of circumcision, human papillomavirus and smoking in in situ and invasive disease. **Int J Cancer**; 116:606-16, 2005.

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

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

DOK R, NUYTS S. HPV Positive Head and Neck Cancers: Molecular Pathogenesis and Evolving Treatment Strategies. **Cancers** 29;8(4), 2016.

DOORBAR, J.; QUINT, W.; BANK, L.; BRAVO, IG.; STOLER, M.; BROKER, TR.; STANLEY, MA. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. **Vaccine** 30S:F55-F70, 2012.

ELZBIETA STANKIEWICZ; DAVID M. PROWSE; MANSUM NG; JACK CUZICK; DAVID MESHER; FRANCES HISCOCK; YONG-JIE LU; NICHOLAS WATKIN; CATHERINE CORBISHLEY; WAYNE LAM; DANIEL M. BERNEY. Alternative HER/PTEN/Akt Pathway Activation in HPV Positive and Negative Penile Carcinomas. **Plos One**, 6(3); 10.1371/journal.pone.0017517, 2011.

ENGELMAN, J.A.; et al. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. **Nature Reviews Genetics**, 7, pp. 606–619, 2006.

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

FICARRA, V.; MARTIGNONI, G.; MAFFEI, N.; et al. Predictive pathological factors of lymphnodes involvement in the squamous cell carcinoma of the penis. **Int Urol Nephrol**; 34:245-50, 2002.

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

FLAHERTY, A.; KIM, T.; GIULIANO, A.; MAGLIOCCO, A. Implications for human Papillomavirus in penile cancer. **Urol Oncology: seminars and original investigations** 32(1):53-58, 2014.

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

FONSECA, G. A.; PINTO, J.A.S.A. et al. Estudo epidemiológico do câncer de pênis no Estado do Pará, Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saude*, v.1(2), p. 85-90, 2010.

FRIDAY B,B.; ADJEI, A.A. Advances in targeting the Ras/Ras/Mek/Erk mitogen-activated protein kinase cascade with MEK inhibitors for cancer therapy. **Clin Cancer Res**. 15: 14 (2): 342-6, 2008.

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

GHITTONI, R.; ACCARDI, R.; CHIOCCA, S.; TOMMASINO, M. Role of human papillomaviruses in carcinogenesis. **E Canc Medic Scienc** 9: 526, 2015.

GONZALEZ. E.; MCGRAW, T.E. The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. **Cell Cycle** 8: 2502–2508, 2009.

GRÜNWARD V, HIDALGO M. Developing inhibitors of the epidermal growth factor receptor for cancer treatment. **J Natl Cancer Inst**, ; 95:851-67, 2003.

GUIMARÃES, G.C.; CUNHA, I.W.; SOARES, F.A. et al. Penile squamous cell carcinoma clinicopathological features, nodal metastasis and outcome in 333 cases. **Jounal Urology**,v. 182, p.528-534, 2009.

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

HOLLANDER MC, BLUMENTHAL GM, DENNIS PA. PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models. **Nat Rev Cancer**, 1(4):289-301, 2011.

HOWIE, HL.; KATZENELLENBOGEN, R.; GALLOWAY, DA. Papillomavirus E6 proteins. **Virol** 384 (2): 324–334, 2009.

INCA. HPV e câncer - Perguntas mais frequentes. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_uterio/hpv-cancer-perguntas-mais-frequentes. Acesso em: 3 março de 2017.

JIAO LI,; WEI SU; SHENG ZHANG,1 YUNHUI HU; JINGJING LIU,1 XIAOBEI ZHANG; JINGCHAO BAI; WEIPING YUAN. et al. Epidermal growth factor receptor and AKT1 gene copy numbers by multi-gene fluorescence in situ hybridization impact on prognosis in breast câncer. **Cancer Sci**; v. 106; p. 642–649, 2015.

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

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

KRAUSS, G. Biochemistry of Signal Transduction and Regulation, 4ª edição, Alemanha: Wiley-VCH, 2008.

LAVENS N, GUPTA R, WOOD LA. EGFR overexpression in squamous Cell carcinoma of the penis. **Curr Oncol**; 17:4-6, 2010.

LAZQUEZ, E.F.; AYALA ,G.; LIU, H. Histologic grade and perineural invasion are more importante than tumor thickness as predictor of nodal metastasis in penile squamous cell carcinoma invading 5 to 10 mm. **American Journal Surgical Pathology** 32: 974-980, 2008.

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

LEE H, AKITA RW, SLIWKOWSKI MX, MAIHLE NJ. A naturally occurring secreted human ErbB3 receptor isoform inhibits heregulin-stimulated activation of ErbB2, ErbB3, and ErbB4. **Cancer Res**; 61:4467-73, 2001.

LEE, C.; SCHERER, S. W. The clinical context of copy number variation in the human genome. **Expert Rev Mol Med**, v. 12, p. e8, 2010.

LEE, HA-NA; NA, HYE-KYUNG; SURH, YOUNG-JOON. Resolution of inflammation as a novel chemopreventive strategy. In: **Seminars in immunopathology**. Springer-Verlag,. p. 151-161, 2013.

LEMMON MA, SCHLESSINGER J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell**;141:1117–34, 2010.

LING DENG, JIE, C.; XIAO, RONG Z., TING, L, YAN, P. W. A.; HUI, F.H.; LI-JUAN, Y.; YAN, Q.; HONG, B.; QING, L.; HONG, Z. Correlation between Activation of PI3K/AKT/mTOR Pathway and Prognosis of Breast Cancer in Chinese Women. **Plos One**. P. 1:14, 2015.

LOPES, A.; BEZERRA, A.L.R.; PINTO, C.A.L.; SERRANO, S.V.; MELL,O. C.A.; VILLA, L.L. p53 as a new prognostic factor for lymph node metastasis in penile carcinoma: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy. **J Urol**. 168:81-6, 2012.

LYNCH, D.F.J.; PETTAWAY, C.A. Tumors of the penis. In: Walsh PC, editor. *Campbell's Urology*. 8th ed. Philadelphia: **Elsevier Company**; p. 2945-81, 2002.

MADSEN, B.S.; VAN DEN BRULE,A.J.; JENSEN, H.L.; WOHLFAHRT,J.; FRISCH M. Risk factors for squamous cell carcinoma of the penis—Population-based case-control study in Denmark. **Cancer Epidemiology Biomarker Prevention**, v.17, p. 2683–2691, 2008.

MARILIA F. CALMON; MÂNLIO TASSO MOTA; JOSÉ VASSALLO; AND PAULA RAHAL. Penile Carcinoma: Risk Factors and Molecular Alterations. **The Scientific World Journal**; v. 11, p. 9–282, 2011.

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

MCCUBREY J.A.; STEELMAN, L.S.; CHAPPELL, W.H. et al. Roles of the Raf/Mek/Erk pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. **Biochim Biophys Acta. 1773 (8): 1263-84, 2008.**

MILANEZI ,F.; CARVALHO, S.; SCHMITT, F.C. EGFR/HER2 in breast cancer: a biological approach for molecular diagnosis and therapy. **Expert Rev Mol Diagn.**, v. 8, p. 417– 434, 2008.

MOR, A.; PHILIPS, M.R. Compartmentalized Ras/Mapk signaling. **Annu Rev Immunol.** 24: 771-800, 2006.

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

MOTA, J.M.; COLLIER, K.A.; COSTA, R. L. B.; TAXTERA, T. et al. A comprehensive review of heregulins, HER3, and HER4 as potential therapeutic targets in câncer. **Oncotarget** : 1-24, 2017.

NAGATA Y, LAN KH, ZHOU X, TAN M, ESTEVA FJ, SAHIN AA, et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. **Cancer Cell**, v. 6, p. 117-27. 2004.

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

NETANYA I. POLLOCK; LIN WANG; GERALD WALLWEBER; WILLIAM E. GOODING; WEIDONG HUANG; AHMED CHENNA; JOHN WINSLOW; MALABIKA SEN; KARA A. DEGRAVE; HUA LI, YAN ZENG; JENNIFER R. GRANDIS. Increased Expression of HER2, HER3, and HER2:HER3 Heterodimers in HPV-Positive HNSCC Using a Novel Proximity-Based Assay: Implications for Targeted Therapies. **Clin Cancer Res**, 21:4597-4606, 2015.

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

NICHOLSON, K.M.; ANDERSON, N.G. The protein Kinase B/AKT signaling pathway in human malignancy. **Cellular Signalling**, v.14, p. 381-65, 2002.

NORMANNO N, D. L., et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. **Gene**, v.16, p. 366:2-16, 2006.

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

PAIVA, G.R. et al. Penile cancer: impact of age at diagnosis on morphology and prognosis. **World J Urol**, v. 47, p. 295-299, 2015.

PATYAN ANDERSSON; ALEKSANDRA KOLARIC; TORGNY WINDAHL; PETER KIRRANDER; PETER SÖDERKVIST; MATS G. KARLSSON. *PIK3CA*, *HRAS* and *KRAS* Gene Mutations in Human Penile Cancer. **The Journal of Urology**. V. Vol. 179, 2030-2034, 2008.

PAULA ROBERTA AGUIAR PASTREZ; VÂNIA SAMMARTINO MARIANO; ALLINI MAFRA DA COSTA; ESTELA MARIA SILVA; CRISTOVAM SCAPULATEMPO-NETO; DENISE PEIXOTO GUIMARÃES¹. et al. The Relation of HPV Infection and Expression of p53 and p16 Proteins in Esophageal Squamous Cells Carcinoma. **Journal of Cancer**, v. 8(6): 1062 -1070, 2017.

PETER, M. et al. MYC activation associated with the integration of HPV DNA at the MYC locus in genital tumors. **Oncogene**, v. 25, n. 44, p. 5985-5993, 2006.

PIZZOCARO GE, ALGABA F, SOLSONA E, HORENBLAS S, WINDAHL T. Guidelines on penile cancer. **Eur Urol** 47(1):1-28, 2010.

PLANCHON, S.M.; WAITE, KA.; ENG, C. The nuclear affairs of PTEN. **J Cell Sci** 121: 249–253, 2008.

POMPEO, A.C.; HEYNS, C.F., MENDONZA-VALDES, A. Diagnosis and Staging of Penile Cancer. **Urology**, v.76(2), p. S15-S23, 2010.

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

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

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

REIS-FILHO, J. S. et al. The molecular genetics of breast cancer: the contribution of comparative genomic hybridization. **Pathol Res Pract**, v. 201, n. 11, p. 713-725, 2005.
ROBERT ROSKOSKI J. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. **Pharmacological Research**, 79; 34– 74, 2014.

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

ROSKOSKI, Jr. R. MEK1/2 dual-specificity protein kinases: structure and regulation. **Biochem Biophys Res Commun**;417:5–10, 2012.

SABEENA, S.; BHAT, P.; KAMATH, V.; MATHEW, M.; ASWATHYRAI, S.; DEVADIGA, S.; PRABHU, S.; HINDOL, M.; CHAMEETACHAL, A.; KRISHNAN, A.; ARUNKUMAR, G. Detection of Genital HPV Infection Using Urine Samples: a Population Based Study in India. **Asian Pac J Cancer Prev** 17(3):1083-1088, 2016.

SCHEINER, M. A.; CAMPOS, M. M.; ORNELLAS, A. A. et al. Human Papillomavirus and Penile Cancers in Rio de Janeiro, Brazil: HPV Typing and Clinical Features. **International Brazillian Journal of the Urology**, v. 34 (4), p. 467-476., 2008.

SCHWARTZ, P.A.; MURRAY, B.W. Protein kinase biochemistry and drug discovery. **Bioorg Chem** ;39:192–210, 2011.

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

SHAH, A. A. et al. Prognostic factors and 5-year survival of patients with carcinoma penis: Tertiary health center study. **Indian Journal of Cancer**, v. 53, n. 2, p. 309, 2016.
SITHANANDAM, G.; ANDERSON, L.M. The ERBB3 receptor in cancer and cancer gene therapy. **Cancer Gene Ther** 15: 413–448, 2008.

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

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

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

STANKIEWICZ, E.; PROWSE, D.M.; MANSUM, N.G.; CUZICK, M.J. et al. Alternative HER/PTEN/Akt Pathway Activation in HPV Positive and Negative Penile Carcinomas. **PLOS ONE**, v. 6 (3), 2011.

STEELMAN LS, CHAPPELL WH, ABRAMS SL, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK/ and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy implications for cancer and aging. **Aging (Albany NY)**; 3:192-222, 2011.

SUDENGA, S.L.; INGLES, D.J.; CAMPBELL, C.M.P.; LIN, H.Y.; FULP, W.J.; MESSINA, J.L.; STOLER, M.H.; ABRAHAMSEN, M.; VILLA, L.L.; LAZCANO-PONCE, E.; GIULIANO, A.R. Genital Human Papillomavirus Infection Progression to External Genital Lesions: The HIM Study. **Europ Urol** 69:166-173, 2016.

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

WIEDUWILT, M.J.; MOASSER, M.M. The epidermal growth factor receptor family: biology driving targeted therapeutics. **Cell Mol Life Sci**; 65:1566-84, 2008.

YAMAUCHI T, YAMAUCHI N, UEKI K, SUGIYAMA T, WAKI H, MIKI H, TOBE K, MATSUDA S, TSUSHIMA T, YAMAMOTO T, FUJITA T, TAKETANI Y, FUKAYAMA M, KIMURA S, YAZAKI Y, NAGAI R, KADOWAKI T. Constitutive tyrosine phosphorylation of ErbB-2 via Jak2 by autocrine secretion of prolactin in human breast cancer. **J. Biol. Chem**; 275:33937–33944, 2000.

YUAN, T.L.; CANTLEY, L.C. PI3K pathway alterations in câncer: Variation on a theme. **Oncogene**;27(41):5497-510, 2008.

ANEXOS

Anexo A: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



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

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

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

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

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DO ESTUDO

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

De que forma posso auxiliar neste estudo?

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

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

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

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

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

Como será feita esta pesquisa?

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

Quais os benefícios e malefícios deste estudo?

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

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

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

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

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

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

São Luís, _____ de _____ de 20 ____

NOME POR EXTENSO/RG

Assinatura

Anexo B: PARECER CONSUBSTANCIADO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MARANHÃO/MA

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

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

Pesquisador: SILMA REGINA FERREIRA PEREIRA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 46371515.5.0000.5087

Instituição Proponente: FUNDACAO UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHAO

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

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.308.275

Apresentação do Projeto:

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

condições socioeconômicas e de instrução, à má higiene íntima e a homens que não se submeteram à circuncisão. Apesar da alta prevalência de câncer peniano no Brasil, dados epidemiológicos, análise do background genético, parâmetros clínicos, evolução da doença e resposta aos tratamentos, ainda são incipientes, o que dificulta o diagnóstico, prognóstico e tratamento da doença e, conseqüentemente, resulta nos altos índices

de diagnóstico em estágios avançados e mortalidade. A caracterização de alterações genômicas e

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho

Bairro: Bloco C, Sala 7, Comitê de Ética

CEP: 65.080-040

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)3272-8708

Fax: (98)3272-8708

E-mail: cepufma@ufma.br

Continuação do Parecer: 1.308.275

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

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

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

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

Objetivo Secundário:

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

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

Continuação do Parecer: 1.308.275

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

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

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

Benefícios:

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

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

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho

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

UF: MA Município: SAO LUIS

Telefone: (98)3272-8708 Fax: (98)3272-8708

E-mail: cepufma@ufma.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MARANHÃO/MA**



Continuação do Parecer: 1.308.275

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

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

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

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

Recomendações:

Todas as recomendações foram acatadas e corrigidas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

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

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

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

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MARANHÃO/MA



Continuação do Parecer: 1.308.275

Infraestrutura	Anuenciainstituicao.pdf	28/10/2015 18:56:25	SILMA REGINA FERREIRA	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	28/10/2015 18:53:22	SILMA REGINA FERREIRA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CARTARONALD.pdf	28/10/2015 18:48:31	SILMA REGINA FERREIRA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CARTAJAQUELINE.pdf	28/10/2015 18:41:54	SILMA REGINA FERREIRA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CARTAJuliana.pdf	28/10/2015 18:38:21	SILMA REGINA FERREIRA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CARTAcaxito.pdf	28/10/2015 18:38:00	SILMA REGINA FERREIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	28/10/2015 18:33:36	SILMA REGINA FERREIRA PEREIRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCancerPenianoPlataformaBrasil2015FINAL.pdf	28/10/2015 18:33:19	SILMA REGINA FERREIRA PEREIRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCancerPenianoPlataformaBrasil2015FINAL.docx	28/10/2015 18:33:05	SILMA REGINA FERREIRA PEREIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	28/10/2015 18:19:46	SILMA REGINA FERREIRA PEREIRA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO LUIS, 04 de Novembro de 2015

Assinado por:
Richard Diego Leite
(Coordenador)

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1968 CEB Velho
Bairro: Bloco C, Sala 7, Comitê de Ética CEP: 65.080-040
UF: MA Município: SAO LUIS
Telefone: (98)3272-8708 Fax: (98)3272-8708 E-mail: cepufma@ufma.br

Anexo C: COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE ARTIGO

Date: Jul 31, 2017
To: "Marta Belfort" marta.belfort@yahoo.com
From: "Journal of Urology" publications@auanet.org
Subject: Submission Confirmation for Copy number analyzes of the PI3K/AKT reveal HER3/EGFR amplification and PTEN deletion in hrHPV penile carcinoma

Dear Dr. Belfort:

Your manuscript entitled Copy number analyzes of the PI3K/AKT reveal HER3/EGFR amplification and PTEN deletion in hrHPV penile carcinoma has been received by *The Journal of Urology*.

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

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

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

Sincerely yours,

Publications Administrator
The Journal of Urology
