



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



**INTERAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO ROBO/SLIT NA
CO-INFECÇÃO COM HPV EM TUMORES PENIANOS E SUA
CORRELAÇÃO COM A CARCINOGENESE**

MARIA DE LOURDES FIGUEIREDO DOS SANTOS

**São Luís
2022**

MARIA DE LOURDES FIGUEIREDO DOS SANTOS

**INTERAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO ROBO/SLIT NA
CO-INFECÇÃO COM HPV EM TUMORES PENIANOS E SUA
CORRELAÇÃO COM A CARCINOGENESE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão, para obtenção do Título de Mestre em Saúde do Adulto.

Área de Concentração: Processos Biológicos em Saúde / HPV e Câncer

Orientador:

Prof. Dr. Rui Miguel Gil da Costa Oliveira

Coorientadora:

Prof.^a Dra. Haissa Oliveira Brito

Coordenador:

Prof. Dr. Marcelo Souza de Andrade

São Luís

2022

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

Santos, Maria de Lourdes Figueiredo.

Interação da via de sinalização Robo/Slit na co-infecção com HPV em tumores penianos e sua correlação com a Carcinogênese / Maria de Lourdes Figueiredo Santos. - 2022. 119 p.

Coorientador(a): Haissa Oliveira Brito.

Orientador(a): Rui Miguel Gil da Costa Oliveira.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Saúde do Adulto/CCBS, Universidade Federal do Maranhão, Universidade Federal do Maranhão-UFMA, 2022.

1. Câncer de Pênis. 2. HPV. 3. ROBO. 4. SLIT. 5. Via de Sinalização. I. Brito, Haissa Oliveira. II. Oliveira, Rui Miguel Gil da Costa. III. Título.

MARIA DE LOURDES FIGUEIREDO DOS SANTOS

**INTERAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO ROBO/SLIT NA
CO-INFEÇÃO COM HPV EM TUMORES PENIANOS E SUA
CORRELAÇÃO COM A CARCINOGENESE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão, para obtenção do Título de Mestre em Saúde do Adulto

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

Prof. Dr. Rui Miguel Gil da Costa Oliveira
(Orientador) Universidade Federal do Maranhão

Prof.^a Dra. Haissa Oliveira Brito
(Coorientadora) Universidade Federal do Maranhão

Prof.^a Dra. Elda Pereira Noronha
(Examinador Externo) Instituto Nacional de Câncer

Prof.^a Dra. Flávia Castello Branco Vidal Cabral
(Examinador) Universidade Federal do Maranhão

Prof.^a Dra. Maria do Socorro Sousa Cartagenes
(Examinador) Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Natalino Salgado Filho
(Suplente) Universidade Federal do Maranhão

A Deus, por abençoar e iluminar meu caminho.

Aos meus pais: Francisca Lopes de Figueiredo,
Floriano dos Santos e Luciane Brito (*in
memorian*), pelo dom da vida e pelo amor
incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, aquele que rege o universo, que dá vida e que a sustenta; aquele que dá amor, esperança e fé a cada um de nós, que constrói caminhos seguros e certos e nos dá luz e sabedoria para seguirmos em frente; aquele que, em sua forma mais simples e perfeita, dá o significado da palavra amor; aquele que lapida a nossa essência para que alcancemos a verdadeira evolução espiritual. A ele todo meu amor, louvor e gratidão!

Aos meus pais: Francisca Lopes de Figueiredo, Floriano dos Santos e Luciane Brito (*in memorian*), a quem dedico esse momento tão especial e único, porque aonde quer que estejam, sei que velam por mim.

À minha família: Maria Bethânia, Haissa Brito, Lucilene dos Santos, Ricardo Henrique, Luiz Gustavo, Daniela Anderson, por terem, ao longo dessa jornada, me dado força, coragem e incentivo durante todo o processo; a eles todo meu amor.

Aos meus queridos sobrinhos: Maria Clara, David, Daniele, Luiz Henrique e Anna Clara, pelos agradáveis momentos de muita alegria.

Ao meu querido orientador, Prof. Dr. Rui Miguel Gil da Costa Oliveira, por sua orientação e por todo apoio e incentivo durante o processo deste trabalho; por não medir esforços para o desenvolvimento de uma excelente pesquisa e por estar sempre disposto a incrementar com seus conhecimentos; a ele toda minha admiração e gratidão!

À minha coorientadora Prof.^a Dra. Haissa Oliveira Brito, muito obrigada por abrir as portas para que eu chegasse até aqui, agradeço todos os dias a Deus pela sua vida e da sua família. Você e sua filha moram eternamente em meu coração. Minha eterna gratidão por tudo que fazes por mim.

Ao Prof. Dr. Antônio L. Cubilla, pelo apoio, incentivo e colaboração na análise de subtipos histológicos.

Ao Instituto Português de Oncologia do Porto, nas pessoas do Prof. Doutor Rui Medeiros e do Doutor Hugo Sousa, pelo apoio na determinação dos tipos de HPV presentes em amostras penianas.

À querida Prof.^a Dra. Elda Pereira Noronha por incrementar com seus conhecimentos nas análises estatísticas do nosso trabalho. A ela minha gratidão.

À Prof.^a Dra. Flávia Vidal, obrigada por todo conhecimento e pela disponibilidade em contribuir para o desenvolvimento de um excelente estudo.

À Prof.^a Sally Monteiro e à Prof.^a Fernanda Lopes, pelo incentivo nas disciplinas durante todo o percurso deste estudo.

A Jhessica Gomes, uma amiga especial que a vida me deu. Obrigada por estar comigo em todos os momentos nessa caminhada e de tantas outras.

Aos queridos colegas de turma e a todos que contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa: Amanda Teles, Fabrício Viana, Flávia Mendonça, Katherine e Elaine Piancó, que contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa, porque cada momento com eles foi único e verdadeiro, sempre dando forças e ajudando um ao outro nas situações em que as vezes pensávamos que não iríamos conseguir.

Aos funcionários do SAME dos Hospitais Aldenora Bello, Presidente Vargas e Tarquínio Lopes Filho, em especial à enfermeira Cleide, pela ajuda, disponibilidade e colaboração intensa na coleta das amostras e no levantamento dos prontuários dos pacientes.

À Prof.^a Dra. Maria do Desterro, Sr. José, Sr. Emanuel e toda a coordenação do Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto, pelo apoio e ajuda ao solucionarmos dificuldades ao longo desta jornada.

Ao Banco de Tumores e DNA do Maranhão (BTMA), onde foi possível realizar algumas etapas da pesquisa.

À UFMA, junto ao programa PPGSAD.

A todos os pacientes que, mesmo debilitados, se dispuseram a fazer parte desta pesquisa, porque sem eles não haveria a realização do estudo. A todos, minha eterna gratidão!

Ao meu filho José Otávio, ainda no ventre, que me deu o incentivo final para que eu pudesse concluir mais uma etapa da minha jornada acadêmica.

O saber humano se espalha para todos os
lados, a perder de vista, de modo que nenhum
indivíduo pode saber a milésima parte daquilo
que que é digno de ser sabido.

Arthur Schopenhauer

RESUMO

Introdução: O câncer de pênis (CP) é uma neoplasia rara em países desenvolvidos, que acomete, sobretudo, homens a partir da sexta década de vida. Dentre os diversos fatores para o aparecimento do CP, podemos destacar a presença do papilomavírus humano (HPV, do inglês *human papillomavirus*). Nos últimos anos, tem-se procurado compreender quais as vias de sinalização celular desreguladas no CP. Dentre as vias relacionadas com a diferenciação celular e o câncer, podemos destacar o sistema das glicoproteínas antagonista ligante (SLIT) e do seu receptor transmembrana, Rondabout (ROBO; SLIT/ROBO), com vários estudos sugerindo que o silenciamento dessa via pode estar relacionado com a agressividade de vários tipos de tumores.

Objetivo: analisar a expressão de componentes da via de sinalização SLIT/ROBO em tumores penianos e a sua associação com o HPV e variáveis clínico-patológicas.

Métodos: Trata-se de um estudo quantitativo, de recorte transversal, com 75 amostras de tumores penianos e amostras de tecido adjacente, armazenadas no Banco de Tumores e DNA do Maranhão (BTMA). Os dados sociodemográficos, clínicos e patológicos foram obtidos dos prontuários dos pacientes. Os subtipos histológicos foram determinados em preparações coradas por hematoxilina e eosina. O DNA genômico das amostras foi extraído e foi realizada PCR Nested para detecção do HPV. Os tipos de HPV foram determinados usando o kit Anyplex II. O RNA das amostras foi extraído, convertido em DNA complementar (cDNA) e os níveis de expressão gênica dos genes SLIT2, SLIT3, ROBO1, ROBO2 e ROBO4 foram estudados por PCR quantitativo em tempo real.

Resultados: A maioria dos pacientes ganhava menos que 1 salário mínimo (52%); a maior parcela dos pacientes tinham o ensino fundamental incompleto (30,59%); mais da metade dos pacientes referiam-se como casada (43,53%), e residia no interior do Maranhão (61,76%). O subtipo histológico que mais prevaleceu foi o condilomatoso (50%) e o usual (25%). Todos os pacientes apresentaram carcinoma escamoso, majoritariamente nos estádios T2 e T3. 61,84% foram positivos para DNA de HPV, sendo os tipos 11 e 16 mais frequentes. 60% apresentaram infecções por múltiplos tipos de HPV. A presença de HPV esteve positivamente correlacionada com a realização de higiene cotidiana e com a ausência de invasão angiolímfática. As amostras de câncer de pênis não mostraram expressão alterada de nenhum gene em comparação com as amostras adjacentes. Igualmente, a presença ou ausência de HPV não modificou a expressão de nenhum gene estudado. Foi observada uma associação entre níveis mais baixos de SLIT2 e a presença de invasão perineural ($p = 0,028$) e entre níveis mais elevados de ROBO4 e a presença de invasão angiolímfática ($p = 0,0303$).

Conclusão: O CP permanece uma doença fortemente associada ao HPV, sendo necessário esclarecer o papel dos tipos de baixo risco como o HPV11. A via do SLIT/ROBO não parece ser fortemente modificada pela carcinogênese peniana relacionada com o HPV ou independente do HPV. No entanto, os níveis de expressão de SLIT2 e ROBO4 apresentam correlação com o comportamento biológico do tumor, sugerindo o seu uso como marcadores de prognóstico.

Palavras-chave: Câncer de Pênis; HPV; Via de Sinalização; ROBO; SLIT.

ABSTRACT

Introduction: Penile cancer (CP) is a rare malignancy in developed countries occurring most frequently in men aged over 60. Among other risk factors, infection with human papillomavirus (HPV) should be highlighted. Recently, efforts have been undertaken to understand which signaling pathways are deregulated in CP. Among signaling pathways involved in cell differentiation and cancer there is the one mediated by the transmembrane Roundabout (ROBO) receptor and its cognate ligands, the SLIT proteins, suggested to correlate with tumor aggressiveness in multiple types of cancer. **Objective:** to analyze the expression of SLIT/ROBO genes in CP and their association with HPV DNA status and clinico-pathological variables. **Methods:** The study adopted a transversal, quantitative approach with 75 CP samples and matched adjacent tissue samples from the Maranhão Tumor and DNA Biobank (BTMA). Sociodemographic, clinical and pathological data were retrieved from medical records. Histological subtypes were determined on hematoxylin and eosin-stained slides. Genomic DNA was isolated and used for nested PCR for HPV DNA detection. HPV types were determined using the Anyplex II kit. Total RNA was isolated, converted into complementary DNA (cDNA) and the expression levels of SLIT2, SLIT3, ROBO1, ROBO2 and ROBO4 were studied using real-time quantitative PCR. **Results:** A majority of patients (52%) earned less than the minimum wage, had incomplete fundamental education (30,59%) self-identified as married (43,53%), and lived in inner Maranhão state locations (61,76%). The condylomatous (50%) and usual (25%) histological subtypes were most prevalent. All patients presented with squamous cell carcinoma, mostly on T2 and T3 stages. 61,84% were positive for HPV DNA and HPV types 11 and 16 were most frequently identified. 60% of patients showed infections with multiple HPV types. The presence of HPV was positively correlated with daily hygiene practice and absence of lymphovascular invasion. CP samples and matched adjacent samples showed identical expression levels of all genes. HPV DNA status was not associated with differential gene expression among tumor samples. There was a significant association between reduced SLIT2 expression levels and the presence of perineural invasion ($p = 0,028$) as well as between higher ROBO4 levels and the presence of lymphovascular invasion ($p = 0,0303$). **Conclusion:** CP remains strongly associated with HPV infection and it is necessary to clarify the role of "low-risk" viral types such as HPV11. The SLIT/ROBO pathway does not seem to be significantly modified by penile carcinogenesis, either via HPV-related or HPV-independent pathways. SLIT2 and ROBO4 expression levels were correlated with the tumor's biological behavior, suggesting their potential use as prognostic biomarkers.

Keywords: Penile Cancer; HPV; Signaling Pathway; ROBO; SLIT.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	O que é o câncer?.....	22
Figura 2	Distribuição das internações no Sistema Único de Saúde por diagnóstico de câncer de pênis, nas regiões geográficas do Brasil, de 1992 a 2017.....	26
Figura 3	Representação esquemática do genoma do Papilomavírus Humano.....	29
Figura 4	As etapas da carcinogênese.....	34
Figura 5	Genes envolvidos no processo da carcinogênese.....	35
Figura 6	Os <i>hallmarks</i> do câncer.....	36
Figura 7	Relação HPV/Câncer.....	37
Figura 8	Sistema de estadiamento TNM.....	40
Figura 9	Estrutura do ROBO/SLIT.....	43
Figura 10	Ilustração do modelo proposto do ROBO/SLIT.....	46
Figura 11	Histologia de amostras de pênis demonstrando diversos subtipos de carcinoma escamoso	58

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Distribuição de idade dos pacientes com câncer de pênis.....	57
Gráfico 2	Distribuição de genótipos de HPV em amostras de câncer de pênis HPV-positivas.....	61
Gráfico 3	Frequências absolutas e relativas de pacientes com infecções por HPV simples e múltiplas.....	62
Gráfico 4	Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) do SLIT2 em amostras de CP e de tecido adjacente.....	63
Gráfico 5	Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) do SLIT3 em amostras de CP e de tecido adjacente.....	63
Gráfico 6	Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) do ROBO1 em amostras de CP e de tecido adjacente.....	64
Gráfico 7	Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) do ROBO2 em amostras de CP e de tecido adjacente.....	64
Gráfico 8	Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) do ROBO4 em amostras de CP e de tecido adjacente.....	65
Gráfico 9	Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) do SLIT2 em amostras de CP com DNA de HPV positivo e negativo.....	66
Gráfico 10	Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) do SLIT2 em amostras de CP com DNA de HPV de alto e baixo risco.....	67
Gráfico 11	Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) do SLIT2 em amostras de CP com e sem invasão perineural.....	67
Gráfico 12	Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) do SLIT2 em amostras de CP com Grau de Broders I e II/III.....	68
Gráfico 13	Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) do SLIT2 em amostras de CP com TNM alto e baixo.....	68
Gráfico 14	Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) do SLIT2 em amostras de CP com e sem invasão angiolinfática.....	69
Gráfico 15	Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) do SLIT2 em amostras de CP relacionadas ou não com os subtipos de HPV.....	69
Gráfico 16	Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) do SLIT3 em amostras de CP com DNA de HPV positivo e negativo.....	70
Gráfico 17	Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) do SLIT3 em amostras de CP com DNA de HPV de alto e baixo risco.....	71
Gráfico 18	Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) do SLIT3 em amostras de CP com e sem invasão perineural.....	71

Gráfico 19	Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) do SLIT3 em amostras de CP com Grau de Broders I e II/III.....	72
Gráfico 20	Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) do SLIT3 em amostras de CP com TNM alto e baixo.....	72
Gráfico 21	Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) do SLIT3 em amostras de CP relacionadas ou não com os subtipos de HPV.....	73
Gráfico 22	Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) do ROBO1 em amostras de CP com DNA de HPV positivo e negativo.....	74
Gráfico 23	Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) do ROBO1 em amostras de CP com DNA de HPV de alto e baixo risco.....	74
Gráfico 24	Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) do ROBO1 em amostras de CP com e sem invasão perineural.....	75
Gráfico 25	Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) do ROBO1 em amostras de CP com Grau de Broders I e II/III.....	75
Gráfico 26	Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) do ROBO1 em amostras de CP com TNM alto e baixo.....	76
Gráfico 27	Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) do ROBO1 em amostras de CP com e sem invasão angiolinfática.....	76
Gráfico 28	Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) do ROBO1 em amostras de CP relacionadas ou não com os subtipos de HPV.....	77
Gráfico 29	Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) do ROBO2 em amostras de CP com DNA de HPV positivo e negativo.....	78
Gráfico 30	Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) do ROBO2 em amostras de CP com DNA de HPV de alto e baixo risco.....	78
Gráfico 31	Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) do ROBO2 em amostras de CP com e sem invasão perineural.....	79
Gráfico 32	Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) do ROBO2 em amostras de CP com Grau de Broders I e II/III.....	79
Gráfico 33	Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) do ROBO2 em amostras de CP com TNM alto e baixo.....	80
Gráfico 34	Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) do ROBO2 em amostras de CP com e sem invasão angiolinfática.....	80
Gráfico 35	Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) do ROBO2 em amostras de CP relacionadas ou não com os subtipos de HPV.....	81
Gráfico 36	Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) do ROBO4 em amostras de CP com DNA de HPV positivo e negativo.....	82
Gráfico 37	Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) do ROBO4 em amostras de CP com DNA de HPV de alto e baixo risco.....	82

Gráfico 38	Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) do ROBO4 em amostras de CP com e sem invasão perineural.....	83
Gráfico 39	Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) do ROBO4 em amostras de CP com Grau de Broders I e II/III.....	83
Gráfico 40	Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) do ROBO4 em amostras de CP com TNM alto e baixo.....	84
Gráfico 41	Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) do ROBO4 em amostras de CP com e sem invasão angiolinfática.....	84
Gráfico 42	Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) do ROBO4 em amostras de CP relacionadas ou não com os subtipos de HPV.....	85

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Sistema TNM – proposto pela UICC/AJCC para estadiamento do câncer de pênis.....	41
----------	---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados sociodemográficos de pacientes diagnosticados com câncer de pênis.....	55
Tabela 2	Características relacionados ao hábito de vida e sexualidade dos pacientes diagnosticados com câncer de pênis.....	56
Tabela 3	Classificação das amostras de HPV pelo subtipo histológico.....	58
Tabela 4	Sistema de classificação TNM.....	59
Tabela 5	Classificação de Broders.....	60
Tabela 6	Invasão perineural.....	60
Tabela 7	Associação das variáveis com diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao HPV de pacientes diagnosticados com câncer de pênis.....	60
Tabela 8	Classificação das amostras quanto à presença de DNA de HPV.....	61

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AJCC	Comitê Americano sobre o Câncer
CA	Câncer
CCE	Carcinoma de célula escamosa
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CP	Câncer de pênis
DNA	Ácido desoxirribonucleico
H&E	Hematoxilina e eosina
HPV	Papilomavírus humano
IDH	Índice de desenvolvimento humano
INCA	Instituto Nacional de Câncer
L	<i>Late</i>
LCR	<i>Long Control Region</i>
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PDCA	Adenocarcinoma ductal pancreático
peIN	Neoplasia intraepitelial peniana
pRB	Proteína do retinoblastoma
qTPCR	Reação em cadeia de polimerase em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
ROBO	Receptor Rondabout
SAME	Serviço de Arquivo Médico
SLIT	Ligante do receptor Rondabout
SUS	Sistema Único de Saúde
TNM	Classificação de Tumores Malignos
UICC	União Internacional Contra o Câncer

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	22
2.1	Câncer.....	22
2.2	Câncer de pênis e aspectos epidemiológicos.....	23
2.3	Câncer de pênis: etiologia e fatores associados.....	26
2.3.1	HPV.....	28
2.3.2	Características do Papiloma Vírus Humanos (HPV).....	29
2.4	Carcinogênese relacionada ao HPV.....	33
2.5	Patologia do câncer de pênis.....	38
2.5.1	Classificação do câncer de pênis quanto ao estadiamento tumoral – TNM.....	40
2.5.2	Tratamento do câncer de pênis.....	42
2.6	Sinalização SLIT/ROBO.....	42
2.6.1	Via do SLIT/ROBO no câncer.....	44
3	OBJETIVOS.....	47
3.1	Geral.....	47
3.2	Específicos.....	47
4	METODOLOGIA.....	48
4.1	Tipo e local do estudo.....	48
4.2	Critérios de inclusão na amostra.....	48
4.3	Critério de exclusão da amostra.....	48
4.4	Coleta de dados.....	48
4.4.1	Coleta das amostras.....	49
4.5	Extração e quantificação do DNA.....	49
4.5.1	Procedimentos iniciais.....	49
4.5.2	Extração.....	50
4.6	PCR Nested.....	51
4.6.1	PCR.....	51
4.6.2	Visualizações dos produtos amplificados.....	51
4.6.3	Identificação dos tipos de HPV presentes.....	52

4.6.4	Extração de RNA / Conversão cDNA.....	52
4.6.5	qRT/PCR.....	52
4.7	Análise histológica para coloração de hematoxilina e eosina (H&E).....	53
4.8	Aspectos éticos.....	54
4.9	Análise estatística.....	54
5	RESULTADOS.....	55
5.1	Variáveis sociodemográficas.....	55
5.2	Variáveis clínico-patológicas.....	58
5.3	Estudo do eixo SLIT/ROBO.....	62
5.3.1	Níveis de expressão de genes do eixo SLIT/ROBO e variáveis clínico-patológicas.....	65
5.3.2	Níveis de expressão do gene SLIT2 e variáveis clínico-patológicas.....	66
5.3.3	Níveis de expressão do gene SLIT3 e variáveis clínico-patológicas.....	70
5.3.4	Níveis de expressão do gene ROBO1 e variáveis clínico-patológicas...	73
5.3.5	Níveis de expressão do gene ROBO2 e variáveis clínico-patológicas...	77
5.3.6	Níveis de expressão do gene ROBO4 e variáveis clínico-patológicas...	81
6	DISCUSSÃO.....	86
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	95
	REFERÊNCIAS.....	97
	ANEXOS.....	103
	Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Banco de Tumores e DNA do Maranhão.....	103
	Anexo B – Questionário Sociodemográfico.....	106
	Anexo C – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP.....	108
	Anexo D – Financiamento.....	109
	ARTIGO.....	110

1 INTRODUÇÃO

Entre as diversas doenças que afligem a população humana, o câncer destaca-se pela sua elevada incidência, pela mortalidade associada a muitos tipos de tumores e pelos pesados custos que impõem aos serviços de saúde (INCA, 2021). O câncer peniano ocorre principalmente em homens após a sexta década de vida e está associado a um alto risco de metástase e morbidades.

O câncer de pênis representa cerca de 0,3% a 0,5% dos tumores malignos do homem em países desenvolvidos. Por outro lado, em países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos, como os da Ásia, África e América do Sul, a doença chega a representar de 10% a 20% dos tumores urogenitais masculinos (COELHO et al., 2018). No Brasil, esse tipo de tumor representa 2% de todos os tipos de câncer que atingem o homem, sendo mais frequente nas regiões norte e nordeste.

Assim, o câncer de pênis é um tumor cuja incidência é altamente variável, que pode surgir em qualquer região do órgão, porém mais frequentemente na glândula, provocando mudanças na cor e textura da pele e mucosa, assim como pode surgir nódulos ou feridas, que demoram muito tempo para desaparecer. Ademais, pode atingir também os mais jovens, especialmente em homens fumantes, não circuncidados, que façam má higiene da região peniana ou que tenham contato íntimo sem camisinha, entre outros fatores de risco que contribuem para o aparecimento do CA (COELHO et al., 2018).

O Papilomavírus Humano (HPV) inclui mais de 200 tipos, alguns dos quais são conhecidos como de alto risco, como os HPV 16 e 18, e outros de baixo risco, como os HPV 6 e 11. Os HPV de alto risco estão associados com o surgimento de vários tipos de cânceres, como os do colo do útero, outros cânceres anogenitais, como o de pênis, vagina, vulva e ânus, e um subgrupo de cânceres da cabeça e pescoço. Ademais, os estudos apontam que há uma possível associação entre o HPV e outras neoplasias, como câncer de esôfago e pulmão, embora o papel do HPV permaneça motivo de especulação (SANTOS et al., 2019).

A maioria das neoplasias de câncer de pênis é constituída pelo tipo histológico carcinoma epidermóide, também chamado espinocelular ou escamoso (CEC), que

corresponde a mais de 95% dos casos, e é derivado do epitélio estratificado, presente tanto na glândula como no sulco coronário e prepúcio (COELHO et al., 2018). O diagnóstico precoce é fundamental para evitar a evolução da doença e a amputação precoce do pênis, que acarreta consequências físicas, sexuais e psicológicas para o paciente (CARVALHO et al., 2007; FAVORITO et al., 2008). O tratamento do câncer de pênis consiste na abordagem da lesão primária e das possíveis metástases linfonodais nas regiões inguinais, sendo que a lesão primária deve ser tratada, preferencialmente, por cirurgia, cuja extensão varia desde a prostatectomia, amputação parcial, total, até a emasculação (FAVORITO et al., 2008).

Entre os alvos para o desenvolvimento de novas terapias para múltiplos tipos de câncer, incluindo aqueles associados com o HPV, encontra-se a via de sinalização para o receptor Roundabout (ROBO) e sua proteína de ligação (SLIT; ROBO/SLIT). A sinalização ROBO/SLIT forma uma via de sinalização fundamental para a organogênese e diferenciação em organismos vertebrados e invertebrados (BROSE; TESSIER-LAVIGNE, 2000). Na espécie humana, a família SLIT inclui 3 proteínas (SLIT 1 a 3), existindo 4 receptores ROBO (ROBO 1 a 4), com diferente expressão em vários tecidos. Atualmente, sabe-se que os receptores ROBO e os seus ligantes SLIT estão envolvidos em vários tipos de cânceres, nos quais interferem na diferenciação e mobilidade celular (JIANG et al., 2019).

Numerosas neoplasias malignas exibem metilação das regiões promotoras dos genes da família SLIT, levando uma perda da sua expressão e ao silenciamento desta via de sinalização (GARA et al., 2016; PRASAD et al., 2004; DAI et al., 2011; DENK et al., 2011; NARAYAN et al., 2006). Entre estas, encontram-se várias neoplasias malignas dos sistemas reprodutores feminino e masculino (NARAYAN et al., 2006). No entanto, nenhum estudo até ao presente momento investigou o envolvimento da interação desta via de sinalização no câncer de pênis. A hipótese do presente estudo é que essa via de sinalização possa estar associada com aspectos clínico-patológicos desta neoplasia, nomeadamente com a presença ou ausência de HPV.

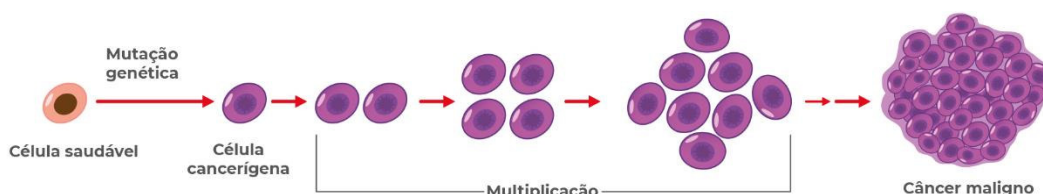
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Câncer

O câncer constitui-se em um tecido desordenado contendo células imperfeitamente diferenciadas, que pode invadir tecidos adjacentes ou órgãos à distância. As células malignas dividem-se rapidamente, tendo um comportamento agressivo e incontrolável, podendo determinar a formação de tumores, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo, dando origem a metástases (INCA, 2020) (Figura 1).

O câncer é um grupo de mais de 100 patologias caracterizado pelo crescimento desordenado e descontrolado de células anormais. Existem diferentes tipos de câncer com origem nos diferentes tipos de células do corpo. Por exemplo, os cânceres com origem em tecido epitelial, como a epiderme ou mucosas, são denominados de carcinomas, e quando possuem origem em tecidos conjuntivos, como os ossos ou cartilagens, são denominados sarcomas (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016).

Figura 1. O que é o câncer?



Fonte: INCA, 2002.

Dentre as diversas causas para o surgimento do câncer, podemos mencionar as causas externas e internas. As causas externas geralmente são fatores que estão associados ao meio ambiente, como a alimentação e estilo de vida (tabagismo, infecções, hábitos alimentares ruins, alcoolismo e sedentarismo), corresponde a 80-90% de contribuição para o surgimento do câncer, enquanto que as causas internas do aparecimento do CA determinam entre 10-20% dos casos e, dentre os fatores internos, podemos citar os hormônios, condições imunológicas e mutações genéticas hereditárias (INCA, 2020).

As mudanças do meio ambiente provocadas pelas civilizações humanas, os hábitos e o comportamento podem aumentar os riscos de diferentes tipos de câncer. Os fatores de riscos ambientais de câncer são denominados cancerígenos ou carcinogênicos, incluindo agentes físicos (ex.: radiação ultravioleta), químicos (ex.: compostos orgânicos derivados do benzeno) e biológicos (ex.: vírus oncogênicos, como o HPV), e esses fatores alteram a estrutura genética do DNA das células, levando ao surgimento de células oncogênicas (INCA 2020).

2.2 Câncer de pênis e aspectos epidemiológicos

O HPV está envolvido em aproximadamente 100% dos casos de tumores de colo de útero, com percentual menor em outros locais: 85% dos casos de câncer de ânus; 40%, de vulva; 70%, de vagina; e 50%, de pênis. Pode-se citar ainda que 35% está presente na orofaringe, 10%, na laringe e 23%, na boca (MONTEIRO et al., 2019). Nos países desenvolvidos, os tipos mais comuns de câncer diagnosticados foram pulmão, próstata e colorretal entre os homens; e mama, colorretal e pulmão entre as mulheres. Já nos países em desenvolvimento, o câncer de pulmão, fígado e estômago são os mais incidentes na população masculina; na feminina, a incidência maior foi para câncer de mama (novamente), colo do útero e pulmão (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

Clegg, Reichman e Miller (2009) apontaram que em regiões de alto Índice de Desenvolvimento Humano (IDH), como a Europa, quatro tipos de câncer (pulmão, mama feminina, cólon e reto e próstata) são responsáveis por quase metade da carga total de incidência de câncer. Nas áreas de IDH médio, misturam-se altas taxas de câncer de pulmão, cólon e reto, estômago e fígado. Finalmente, em áreas com baixo IDH, os tipos de câncer mais frequentes são aqueles tipicamente com origem em agentes infecciosos (respectivamente, HPV, vírus da hepatite B, vírus da hepatite C e o vírus da imunodeficiência humana – HIV).

O câncer de pênis em países desenvolvidos é raro e tem prevalência de 0,1-1 por 100.000 homens. Enquanto que a incidência global varia entre diferentes populações dependendo de fatores de risco, como infecção pelo papilomavírus

humano (HPV), tabagismo e higiene precária, ou fatores de proteção, como circuncisão infantil de rotina (DOUGLAWI; MASTERSON, 2019).

A incidência do câncer de pênis no Brasil é a maior do mundo, com a ocorrência de 8,3 casos por 100.000 homens, das quais as regiões norte e nordeste possuem a maioria dos casos, devido a diversos fatores, como condição de extrema pobreza social nestas regiões, carência de educação acerca da higiene íntima, fimose, infecção pelo Papiloma Vírus Humano, consumo de tabaco e a promiscuidade sexual (COELHO et al., 2018).

Metade dos casos de câncer de pênis são provenientes de infecção pelo HPV, podendo variar de 10 a 70%, essa variação se deve, principalmente, a escolha do método de detecção utilizado, a população estudada e ao tipo de amostra analisada, em que o genótipo mais prevalente é o HPV 16, com 30% dos casos (ALEMANY et al., 2016).

Alves et al. (2004), ao pesquisarem 21 amostras de tumor de pênis, verificaram que 95,5% foram identificadas com DNA do vírus Epstein-Barr que é apontado como agente associado ao câncer de pênis. O surgimento de neoplasia do câncer de pênis sugere-se que possa estar associado à progressão de lesões precursoras relacionada a duas vias principais; uma via referida a várias condições penianas como: aquelas relacionadas a presença do HPV negativo associado a inflamação crônica que não sara com tratamento, presença de fimose ou história de líquen escleroso, e a outra via estaria relacionada com a presença do DNA do HPV associados a infecções (BLEEKER et al., 2009).

A incidência e a morbimortalidade são medidas de controle para a vigilância epidemiológica, que permitem analisar a ocorrência, distribuição e a evolução da doença. Diante desse contexto, é importante conhecer o cenário epidemiológico dos diferentes tipos de câncer e caracterizar mudanças do cenário ao longo do tempo, para que, dessa forma, possamos propor estratégias de melhorias para nortear as ações de vigilância do câncer no Brasil. Os indicadores são os números que provêm dos registros de câncer e do Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM/MS).

Mundialmente, as taxas de prevalência do câncer de pênis (CA de pênis) são baixas (COLBERG et al., 2018). No Ocidente, o CA de pênis é diagnosticado em 1/100.000 pessoas ao ano (ALBERSEN; SPIESS, 2019). Em contrapartida, quando comparados países mais desenvolvidos com países em desenvolvimento, estes últimos apresentam maiores taxas de prevalência (COLBERG et al., 2018). O Brasil apresenta a maior incidência entre os países da América Latina, de aproximadamente 5,7 casos por 100.000 pessoas ao ano (MONTES CARDONA; GARCÍA-PERDOMO, 2017). O estado do Maranhão tem a maior taxa de incidência do Brasil, com uma taxa de incidência mínima, padronizada por idade, de 6,1 casos novos por 100.000 homens/ano (COELHO et al., 2018). O tipo histológico mais comum é o carcinoma espinocelular, ou carcinoma de células escamosas – CEC (MARCHIONNE et al., 2017), com localização inicial principalmente na glândula e prepúcio (COLBERG et al., 2018).

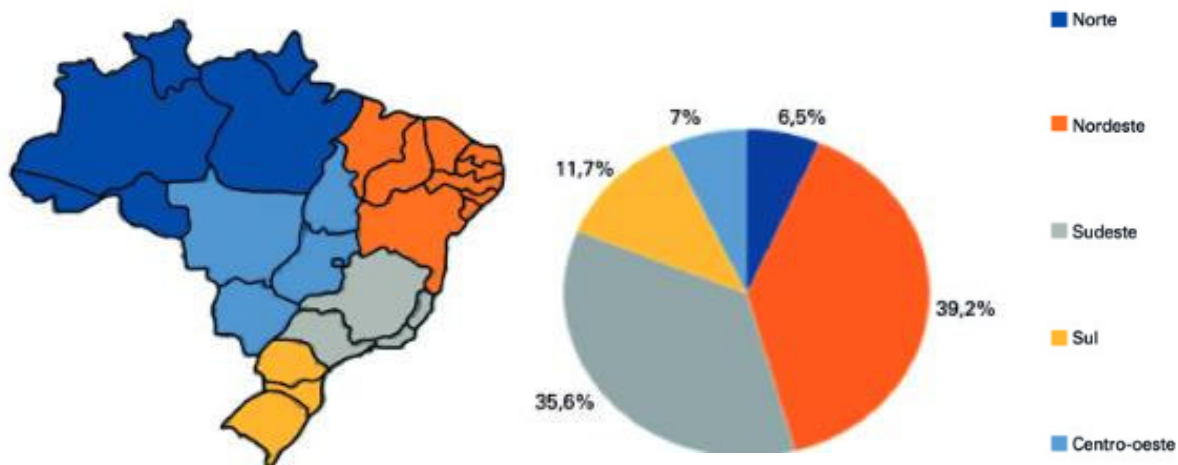
O carcinoma peniano representa 2% de todos os tipos de cânceres masculinos. A alta incidência é observada em países em desenvolvimento, incluindo o Brasil, onde é mais elevada nas regiões Norte e Nordeste, podendo chegar a 17% segundo dados do INCA (BRASIL, 2011). Dados levantados por meio do DATASUS sugerem que o país esteja entre os países com maior incidência, ficando apenas atrás de alguns países da África (LISBÔA, 2019; COELHO et al., 2018). Associa-se a esta situação a condição de extrema pobreza social nestas regiões, e ainda se soma a esta condição social a falta de higiene íntima, fimose, infecção pelo HPV, o consumo de tabaco, a promiscuidade sexual e a dificuldade no acesso a assistência à saúde, pois a capital maranhense se encontra muito isolada, e o estudo observou que a maioria dos pacientes são de baixa renda, agricultores e residem no interior (COELHO et al., 2018).

Bonfim (2017) realizou uma pesquisa em São Luís, Maranhão, e identificou, em seu estudo, que o coeficiente de mortalidade por câncer de pênis aumentou entre os anos de 2010 a 2014, onde no ano de 2014 o maior coeficiente estimado foi de 8,84 óbitos por 1 milhão de homens, correspondendo a 30 óbitos, aumento considerável se comparado ao ano de 2010, onde o coeficiente era 5,51 óbitos por 1 milhão de homens.

O CP está em quarto lugar dos cânceres que acometem o sexo masculino, ficando abaixo apenas do CA de próstata, bexiga e rim (COUTO, 2014). Essa patologia acomete com mais frequência os países subdesenvolvidos. No Brasil, a região Nordeste é a mais afetada, em decorrência dos fatores socioeconômicos e culturais (SILVA, 2014) (Figura 2). Essa região tem o maior número de novos casos de CP e incidência de 5,7%. No ano de 2016, a região com maior taxa de mortalidade por CP foi a região Norte (0,06%), em segundo lugar ficou o Nordeste (0,04%) e em terceiro, o Centro Oeste (0,03%) (LISBOA, 2019).

Segundo o DATASUS, houve 9.592 internações por CP no período de 1992 a 2017, com uma média de mais ou menos 365 internações por ano, cuja região Nordeste foi a responsável pela maioria das internações, totalizando 3.757 (39,2%), enquanto que a região Sudeste computou um valor de 3.416 (36,6%) e, por último, na região Norte, obteve-se um número de 611 (0,7%) internações (KORKES, 2022).

Figura 2. Distribuição das internações no Sistema Único de Saúde por diagnóstico de câncer de pênis, nas regiões geográficas do Brasil, de 1992 a 2017.



Fonte: KORKES, 2022.

2.3 Câncer de pênis: etiologia e fatores associados

O desenvolvimento do CA de pênis ocorre sob a forma de uma lesão exofítica ou ulcerada e acomete os linfonodos regionais (inguinais pélvicos e, raramente, periaórticos). Na falta de tratamento adequado, culmina em óbito em média de dois

anos após o diagnóstico, devido às suas complicações ou em decorrência de metástases (AITA, 2014). Segundo o Instituto Nacional do Câncer, as principais causas envolvidas na etiologia são a falta de higiene, presença de fimose ou excesso de prepúcio e associação com o HPV em 30 a 50% dos casos. Os sintomas mais frequentes são ferimentos que não cicatrizam, mesmo após tratamento, nódulos que não desaparecem e que têm secreção e mau cheiro, vermelhidão ou prurido constante na glândula de portadores de fimose (BRASIL, 2017).

Entre os fatores de risco envolvidos no CP destacam-se a presença de fimose, ou seja, alongamento do prepúcio com dificuldade ou impossibilidade de expor a glândula, sendo, inclusive, descrita como um dos fatores mais importantes no desenvolvimento da doença. Homens circuncidados ao nascimento raramente desenvolvem o CP, por outro lado, baixas condições socioeconômicas associadas a tais fatores aumentam as probabilidades da manifestação deste tipo de câncer (GUIMARÃES et al., 2017). Estudos ainda mostram que, analisando tais fatores de risco, a presença do HPV é de extrema relevância e importância para o desenvolvimento do câncer de pênis, aproximadamente 30% a 50% das Neoplasias intraepiteliais penianas estão relacionadas com a presença do DNA do HPV, sendo que essa porcentagem aumenta em países da América Latina e diminui em países asiáticos (PATEL et al., 2016; SCHLENKER; SCHNEEDE, 2018; ALEMANY et al., 2019).

O histórico de fimose ocorre em aproximadamente 25% a 60% dos pacientes com CP e está fortemente associado com carcinomas mais invasivos (ABREU, 2020). A fimose é considerada universalmente como tratável em recém-nascidos do sexo masculino. A fimose persistente pode resultar em dor, disfunções sexuais, aumento do risco de condições inflamatórias penianas e câncer peniano (MORRIS et al., 2020). Os tumores podem ser obscurecidos pela fimose, mascarando o seu diagnóstico. Em geral, a sintomatologia inclui o sangramento e mau cheiro da genitália. Todas as lesões penianas, particularmente aquelas em que o paciente apresenta o prepúcio não retrátil, requerem uma atenção especial e devem ser investigadas com suspeita de neoplasia (COLACITE et al., 2021). Os homens que são circuncidados ao nascimento apresentam 3,2 vezes menor risco de desenvolver o câncer de pênis do

que homens que nunca foram circuncidados (BLEEKER et al., 2009; CARDONA; GARCÍA-PERDOMO, 2018; MICHELS et al., 2009).

Estudos demonstram que grupos sociais que mantêm uma higiene adequada apresentam baixas prevalências de CP, logo, a má higiene configura-se como um dos principais fatores predisponentes. De modo relacionado ao citado anteriormente, a presença de fimose dificulta a higienização e a visualização dos estágios iniciais das lesões, sendo observada em mais de 80% dos pacientes com CP (MIRALLES-GURI et al., 2009).

2.3.1 HPV

Martel et al. (2018) mostraram que dos 11 patógenos infecciosos classificados do grupo pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), evidenciou-se que os quatro mais importantes são o *Helicobacter pylori*, o Papilomavírus Humano de alto risco (HPV), o vírus da hepatite B (HBV) e o vírus da hepatite C (HCV), sendo os mesmos responsáveis por mais de 90% dos cânceres relacionados à infecção em todo o mundo. Em maio de 2018, o diretor-geral da OMS anunciou um apelo global à ação para erradicar o câncer do colo de útero, aumentando, assim, a cobertura das vacinas contra o HPV, rastreamento e tratamentos eficazes (IARC, 2014).

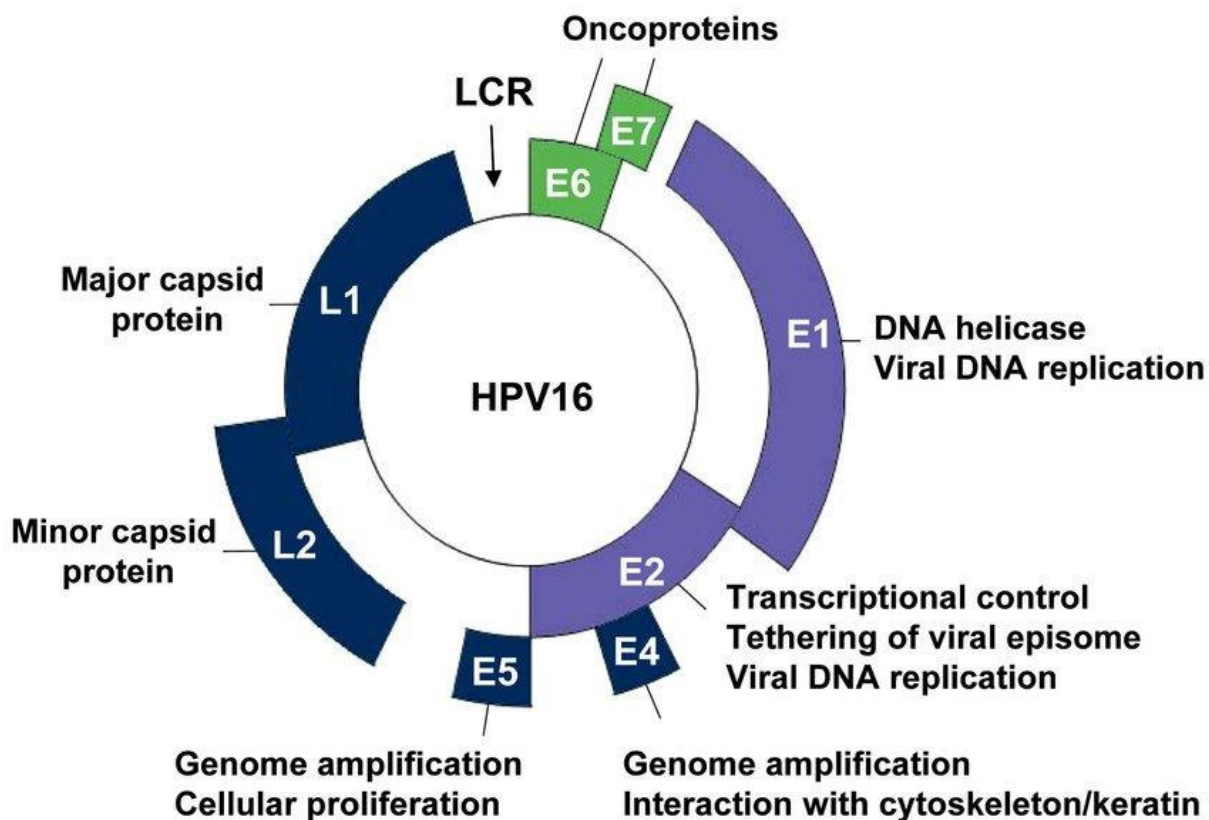
Dentre os HPV de alto risco oncogênicos, encontram-se os tipos 16 e 18, presentes em 70% dos casos de câncer de colo de útero, podendo causar infecções persistentes e o aparecimento de lesões precursoras e invasoras. Já os HPV 6 e 11, encontrados em 90% dos condilomas genitais e papilomas laríngeos, são considerados de baixo risco (INCA, 2020). A infecção pelo HPV também pode comportar-se como transitória, regredindo de forma espontânea na maioria dos casos. Naqueles casos em que a infecção persiste e, especialmente, é causada por um tipo viral oncogênico, pode ocorrer o surgimento de lesões precursoras que, se não forem identificadas e tratadas em tempo hábil, poderão progredir para o aparecimento não somente do câncer de colo de útero, mas também pode causar câncer na vulva, vagina, ânus, pênis e orofaringe (MARTEL et al., 2018).

2.3.2 Características do Papiloma Vírus Humanos (HPV)

Os hábitos sexuais das populações expostas ao Papiloma Vírus Humano (HPV) tendem a configurar-se como um importante fator de risco para o CA de pênis, uma vez que este tem sido constantemente associado à infecção pelo HPV (BRASIL, 2019; CARVALHO et al., 2007; SALVIONI et al., 2009; SCHEINER et al., 2008).

Entre as cepas pertencentes à família *Papillomaviridae*, encontram-se as que infectam o ser humano, o HPV, que consiste em uma variedade que ultrapassa 150 tipos virais sequencialmente numerados (WIND et al., 2019). Os papilomavírus são altamente específicos para cada espécie. O HPV mede cerca de 55nm de diâmetro, sendo constituído por apenas uma molécula de DNA-ácido desoxirribonucleico circular duplo, com cerca de 7.900 pares de bases (PIMENTA et al., 2020). Essa família viral é responsável pelo desenvolvimento de verrugas e lesões invasoras em diferentes grupos de mamíferos, incluindo o ser humano (Figura 3).

Figura 3. Representação esquemática do genoma do Papilomavírus Humano.



Fonte: ABRAMO; ARCHAMBAULT, 2011.

O DNA viral está associado a proteínas semelhantes às histonas, circundadas por 72 capsômeros, que consistem em duas proteínas estruturais chamadas L1 e L2. O genoma viral é dividido em três regiões, de acordo com sua localização e propriedades funcionais: as regiões E (precocemente) e L (tardia), e uma terceira região, LCR (região de controle longa) (LETO et al., 2011).

Os HPV mucosotrópicos são subdivididos em baixo e alto risco, dependendo de seu potencial oncogênico. O HPV 16, de alto risco, é o tipo mais observado nos carcinomas vulvares e cervicais, mas os HPVs 18, 21, 31, 33 e 34 também podem ser encontrados nessas lesões. Além desses, diversos outros tipos podem estar associados a lesões mucosas e cutâneas de baixo risco (LETO et al., 2011). Estudo conduzido no Brasil em 2017 estimou a prevalência de HPV em 54,3% dos jovens brasileiros na faixa etária entre 16 a 25 anos, entre esses, 38,4% apresentaram HPV de alto risco para câncer (ASSOCIAÇÃO HOSPITALAR MOINHOS DE VENTO, 2017).

De acordo com a American Cancer Society (2016), ainda que a carcinogênese do CA de pênis seja considerada multifatorial, a relação com o HPV tem sido observada clínica e experimentalmente, envolvendo o genoma do vírus e células penianas cancerosas. Em um estudo experimental realizado por Fonseca et al. (2020), foi realizado o primeiro modelo de camundongo para câncer de pênis relacionado ao HPV. Os autores observaram os camundongos com dez semanas de idade, que expressaram todos os genes iniciais do HPV 16 sob controle do promotor do gene citoqueratina 14 (Krt14) e controle do tipo selvagem, que foram expostos topicamente a metilbenzeno, antraceno ou veículo por 16 semanas.

Posteriormente, com 30 semanas, os mesmos foram sacrificados para análise histológica, na qual foi possível verificar a presença da expressão de Ki67 e citoqueratina 14 e dos oncogenes E6 e E7 do HPV 16, sendo confirmados por imunohistoquímica e PCR quantitativa, respectivamente. Os camundongos transgênicos HPV 16 desenvolveram lesões intraepiteliais, incluindo condilomas e neoplasia intraepitelial peniana (PeIN). As lesões expressaram citoqueratina 14 e os oncogenes E6 e E7 do HPV 16 e mostraram proliferação celular desregulada, demonstrada por células supra-basais positivas para Ki67.

Os camundongos transgênicos HPV 16 expostos ao antraceno (usado como matéria prima importante para a fabricação de corantes de alizarina e indantreno , usado em sua fração como óleo de antraceno), apresentaram aumento na incidência de PeIN e carcinoma de células escamosas. As lesões malignas mostraram características histológicas variadas, semelhantes às dos cânceres de pênis humanos associados ao HPV. Os camundongos do tipo selvagem não apresentaram lesões malignas ou pré-malignas, mesmo quando expostos ao antraceno. Essas observações fornecem a primeira evidência experimental para apoiar o papel etiológico do HPV 16 na carcinogênese peniana.

A presença do DNA viral do HPV demonstra relação relevante com a neoplasia de células escamosas. Segundo a OMS, em 2014, o câncer de colo de útero estava entre as cinco neoplasias mais frequentes na população feminina, e é a segunda principal causa de morte em mulheres com idades entre 20 e 39 anos (BUSKWOFIE et al., 2020; McGUIRE, 2015). O CA de colo de útero é o segundo tipo de câncer mais comum entre mulheres em países que não têm acesso a programas de rastreamento (McGUIRE, 2015). A relação causal entre o HPV e o câncer cervical e suas lesões precursoras está bem estabelecida na literatura. Portanto, reconhece-se que a maioria das infecções do trato genital feminino causadas por diferentes tipos de HPV tem natureza transitória (CARVALHO et al., 2019).

Segundo Lindoso et al. (2019), a prevenção do câncer de pênis é de fundamental importância, pois a doença está relacionada a hábitos sexuais e de higiene precários. Sendo assim, é necessário intensificar as campanhas de prevenção, repassando à população o conhecimento sobre a associação dos maus hábitos de higiene e o efeito carcinogênico da fimose e da infecção pelo HPV na gênese do câncer de pênis. Portanto, a imunização de adolescentes do sexo masculino é fundamental para interromper o ciclo de transmissão do HPV. O uso de preservativos reduz sensivelmente o risco o câncer de pênis, por reduzir o contágio de doenças sexualmente transmissíveis, como o vírus HPV (SOUZA et al., 2012).

Contudo, o HPV 16 sozinho é a causa de aproximadamente 50% em todo o mundo. No Brasil, o perfil de prevalência do HPV é semelhante ao global, sendo 53,2% para HPV 16 e 15,8% para HPV 18 (CARVALHO et al., 2019).

O câncer do colo do útero é uma doença grave que pode levar ao óbito. É um importante problema de saúde pública devido à alta incidência e mortalidade, especialmente nos países em desenvolvimento. Estimativas mundiais apontam aproximadamente 530 mil casos novos e 265 mil mortes por câncer do colo do útero ao ano, sendo 88% desses óbitos nos países em desenvolvimento, sendo que no mundo e no Brasil, se constitui como a terceira causa de morte por câncer entre mulheres (CLARO et al., 2021). No Brasil, o câncer do colo do útero é o terceiro tipo mais frequente que acomete as mulheres e faz, por ano, 5.264 vítimas fatais. Em 2018, as estimativas divulgadas pelo INCA são de 16.370 casos novos a cada 100 mil mulheres e risco estimado de 15,43 casos a cada 100 mil mulheres, com grandes desigualdades regionais (INCA, 2018).

De acordo com a Sociedade Americana do Câncer, o vírus HPV é responsável por cerca de 70% dos casos de cânceres cervicais, porém, diversas literaturas de países menos desenvolvidos demonstram relações variando de 90% a 100% entre a infecção do HPV e a lesão avançada do colo do útero. Os tipos 16 e 18 são os principais envolvidos com a oncogênese do tumor do colo de útero, e as vacinas administradas, de maneira precoce, contra esses agentes, juntos aos métodos contraceptivos, são os principais meios de prevenção do câncer cervical uterino (ROCK et al., 2020).

No mesmo estudo, não foi possível observar queda na mortalidade por esse câncer no país, atribuindo este resultado à baixa cobertura de prevenção da população de risco e a má aplicação do exame Papanicolau. Um levantamento realizado no estado de Roraima sobre a cobertura do exame preventivo demonstrou uma prevalência de 85,6%, ou seja, dentro dos padrões preconizados pela OMS, no entanto, não obteve a redução da incidência e mortalidade prevista, deixando em questão a qualidade diagnóstica da região, o que implica no rastreamento dessas mulheres que não conhecem seus direitos e, assim, não buscam o serviço de saúde de forma precoce, deixando, portanto, a doença progredir e implicar em sua morbidade e mortalidade (COLARES et al., 2020).

Através de dados obtidos a partir do Sistema de Informações do Programa Nacional de Imunizações (SI-PNI), através das doses aplicadas, extraíndo ano, sexo, faixa etária e o número de doses das imunizações, os autores observaram o intervalo

de doses de vacinas administradas entre 2014 e 2019 da vacina tetravalente. Foram administradas 482.763 doses da mesma vacina. Analisando como imunizações por ano de administração, foi registrado a seguinte distribuição percentual: 2014 (27%), 2015 (18%), 2016 (7%), 2017 (20%), 2018 (15%) e 2019 (13%).

A administração da vacina em pessoas do sexo feminino (75%) foi consideravelmente maior do que o masculino (25%). Os indivíduos com idade de 11 anos (24%) e de 14 anos (7%) são os que mais e menos recebem, respectivamente, doses da vacina. Em relação às doses necessárias para evitar, ocorreu uma redução no percentual de doses aplicadas, sendo distribuídos na seguinte frequência: 1ª dose (58%), 2ª dose (41%) e 3ª dose (1%). Uma pesquisa possibilitou conhecer o perfil de imunizações contra o HPV no estado do Piauí. Diante desse contexto, faz-se necessária a implementação de ações educativas sobre o HPV, com a busca ativa de esquemas incompletos para atingir uma meta de cobertura vacinal (COSTA et al., 2020).

Estudos realizados com homens entre 18 e 70 anos de idade apontam que homens brasileiros (72%) têm mais infecção por HPV que os mexicanos (62%) e norte-americanos (61%). A incidência de câncer de pênis é três vezes maior em homens brasileiros do que homens norte-americanos. No que diz respeito à infecção oral por HPV como principal fator de risco para o câncer de orofaringe, esta foi estabelecida em estudos de caso-controle. Ainda, a maioria ($\geq 90\%$) das infecções orais são adquiridas sexualmente (SILVA et al., 2017).

2.4 Carcinogênese relacionada ao HPV

O HPV é a infecção sexualmente transmissível mais comum em todo o mundo (ARAL E HOLMES, 2008). No Brasil, a prevalência geral de infecção do colo do útero pelo HPV varia entre 13,7 e 54,3%. Os papilomavírus exibem um tropismo específico por células epiteliais escamosas, denominadas queratinócitos, contudo, para que o vírus se integre a uma célula hospedeira, é necessário que as células basais sejam infectadas, uma vez que somente essas células são capazes de se dividirem. O

acesso a essas células é permitido a partir da ocorrência de lesões ou micro lacerações do epitélio (GARCÍA-TAMAYO et al., 2010).

Podemos dizer, portanto, que a infecção propriamente dita ocorre quando as partículas virais se ligam à superfície da célula do hospedeiro e promove a internalização no vacúolo citoplasmático. Logo após, são liberadas no citoplasma as proteínas dos capsídeos, que são degradadas e, posteriormente, o genoma viral é liberado no núcleo celular, permanecendo na sua forma episomal, isto é, não integrado ao genoma do hospedeiro (CHOW et al., 2010).

A carcinogênese pode ser dividida conceitualmente em quatro etapas: iniciação, promoção, conversão e progressão, sendo ela o resultado de mutações em genes específicos relacionados ao controle da multiplicação e diferenciação celular e à sobrevivência celular (Figura 4). A iniciação tumoral é o processo que envolve a exposição das células normais a agentes químicos, físicos ou virais que causam danos irreversíveis nos genes, levando a ativação de oncogenes e/ou inativação de genes supressores de tumor (CHOW et al., 2010).

Figura 4. As etapas da carcinogênese.



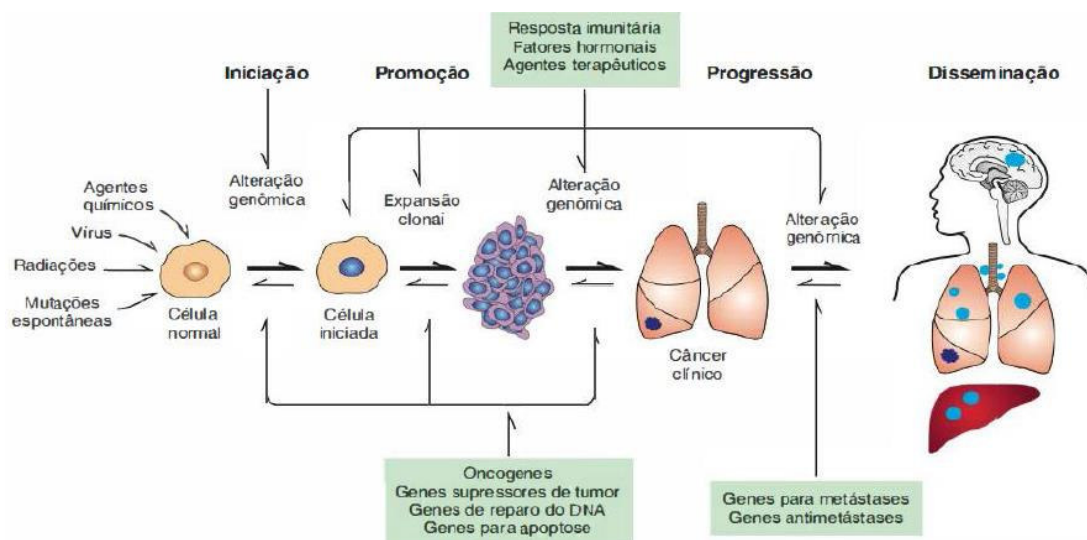
Fonte: INCA, 2002.

Esta etapa tem baixa frequência e depende diretamente da dose de carcinógeno. As células podem permanecer estacionárias no estado de “iniciadas”

durante tempo variado se não serem estimuladas a se dividir. No entanto, células iniciadas respondem de maneira aumentada a alguns estímulos como, por exemplo, aos fatores de crescimento (Figura 5) (INCA, 2002).

O processo de promoção compreende a expansão clonal das células iniciadas até formar tumores visíveis, geralmente lesões benignas ou focos de células pré-neoplásicas. A promoção pode ocorrer como consequência da exposição exógena, como o fumo do cigarro ou certas infecções, ou pode ser um processo endógeno, como a estimulação hormonal. Os promotores tumorais se caracterizam pela sua habilidade para reduzir o período de latência na formação de um tumor depois da exposição de um tecido a um iniciador, ou por aumentar o número de tumores formados nesse tecido. Assim, os promotores tumorais não são capazes, por si mesmos, de produzir mutações no DNA, ou seja, não são carcinogênicos. Eles são capazes de induzir a formação tumoral quando combinados com um iniciador (CHOW et al., 2010).

Figura 5. Genes envolvidos no processo da carcinogênese.



Fonte: INCA, 2019

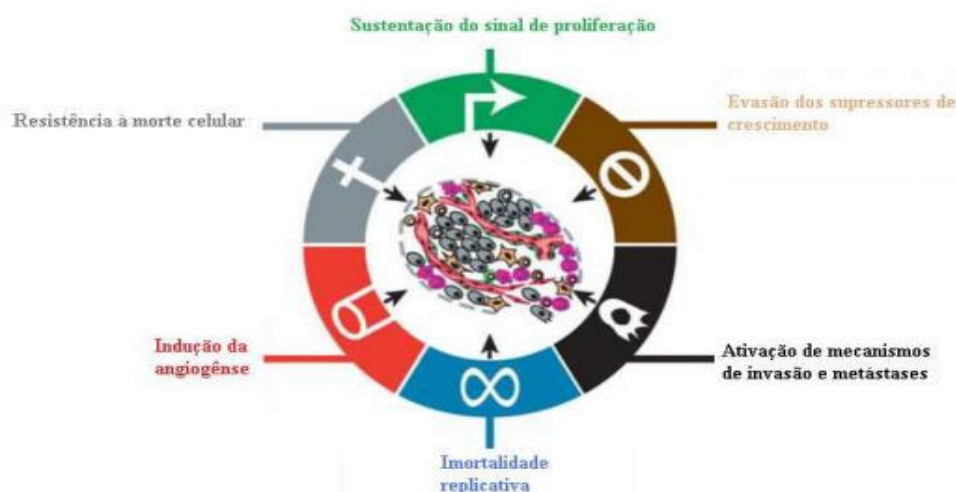
Denomina-se conversão maligna a transformação das células pré-neoplásicas em células que expressam o fenótipo maligno. Este processo necessita de mais trocas genéticas, as quais podem ocorrer por erros na síntese do DNA ou pela ativação de oncogenes e/ou inativação de genes supressores de tumor. A progressão tumoral caracteriza-se na fase em que a célula adquire características cada vez mais

agressivas, devido à enorme quantidade de mutações sofridas pela célula tumoral nesta fase. A instabilidade genômica experimentada pela célula propicia, então, um ambiente favorável as mutações genéticas, levando à amplificação de alguns genes e a expressão alterada de outros, podendo resultar em uma maior taxa de crescimento e na aquisição de propriedades, como a invasão local e a disseminação metastática (CHOW et al., 2010).

Os genes envolvidos na carcinogênese incluem aqueles cuja função está diretamente associada à proliferação celular, ao controle de morte celular programada, conhecido como apoptose, e à reparação do DNA danificado. Estes genes podem ser classificados em três classes principais: os proto-oncogenes, genes supressores de tumor e genes de reparação do DNA. Nos últimos anos, foi incorporada uma quarta classe de genes cuja alteração está associada com as etapas finais da progressão tumoral, os metastogenes e os genes supressores de metástase (CHOW et al., 2010).

Os proto-oncogenes estimulam os processos de divisão celular, enquanto genes supressores inibem. Quando ocorrem mutações, proto-oncogenes tornam-se oncogenes, os quais induzem à transformação maligna e causam multiplicação celular excessiva. No processo de carcinogênese, cada modificação genética adquirida confere às células tumorais um tipo de vantagem, constituindo assim os *hallmarks* (características) do câncer (Figura 6) (LIMA et al., 2013).

Figura 6. Os *hallmarks* do câncer.

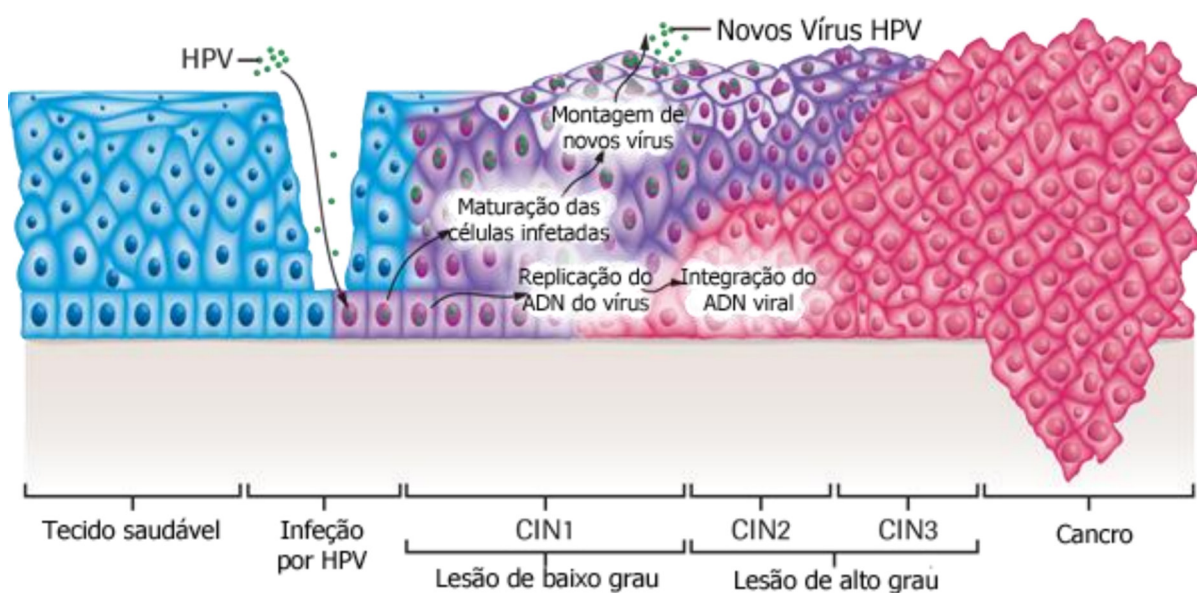


Fonte: HANAHAN; WEINBERG, 2011.

Essas capacidades adquiridas pelas células tumorais durante o desenvolvimento tumoral favorecem sua manutenção e são comuns a todos os tipos de cânceres. Dentre elas, podemos destacar a sustentação do sinal de proliferação, a evasão dos supressores de crescimento, a resistência à morte celular, a imortalidade replicativa, a indução da angiogênese, a ativação de mecanismos de invasão e as metástases (LIMA et al., 2013).

O ciclo de vida do HPV (Figura 7), depende do programa de diferenciação celular e a expressão das proteínas virais se dão ao longo das diferentes camadas do epitélio, promovendo a manutenção e amplificação do genoma viral, proliferação celular, montagem e liberação das partículas virais (LIMA et al., 2013)

Figura 7. Relação HPV/Câncer.



Fonte: Adaptado de WOODMAN, 2007.

Os mecanismos pelos quais o HPV de alto risco induz à progressão neoplásica de lesões benignas estão principalmente relacionados à capacidade dos genótipos de alto risco (ex.: HPV 16, HPV 18) de provocar infecções persistentes e de integrar seu genoma ao do hospedeiro (integração viral), com perda do gene E2, que, tem a função de controlar a expressão dos genes E6 e E7, resultando em sua superexpressão. A consequência dessa sucessão de eventos que leva a uma proliferação celular excessiva e desregulada, com comprometimento dos mecanismos de reparo do DNA,

favorecendo as mutações e o aparecimento de aberrações cromossômicas, além de bloquear a apoptose (MEDEIROS-FONSECA et al., 2020).

A persistência da infecção pelo HPV de alto risco é condição essencial para o desenvolvimento de neoplasias intraepiteliais do colo do útero. A integração do ácido desoxirribonucleico (DNA) viral no genoma celular é um evento necessário para desencadear o processo de carcinogênese. Notavelmente, a superexpressão das proteínas virais oncogênicas E6 e E7 leva a alterações no ciclo celular devido a mutações nos genes que codificam as proteínas supressoras de tumor p53 e Rb (retinoblastoma). Os níveis de ácido ribonucleico RNA mensageiro (mRNA) correspondentes à expressão das proteínas oncogênicas E6 e E7 estão intimamente relacionados com as lesões cervicais, sendo diretamente proporcionais (MEDEIROS-FONSECA et al., 2020).

2.5 Patologia do câncer de pênis

Atualmente, pensa-se que existam duas vias fisiopatológicas envolvidas na carcinogênese do CA de pênis, uma relacionada à infecção pelo HPV de alto risco, associada à presença de DNA de HPV e p16 em testes imunohistoquímicos; e a outra que poderia estar relacionada à inflamação crônica, associada a, por exemplo, líquen escleroatrófico ou inflamação crônica do prepúcio relacionada à fimose e à falta de higiene (ERBERSDOBLER, 2018; HAKENBERG et al., 2018).

Por isso, a classificação atual da Organização Mundial de Saúde (OMS) do carcinoma de células escamosas do pênis é baseada na presença de HPV ou não, dividindo o carcinoma escamoso peniano em múltiplos subtipos. O principal subtipo histológico de CA de pênis não-relacionado ao HPV é o subtipo usual, enquanto os subtipos histológicos mais frequentes relacionados à presença de HPV são os subtipos basalóide e condilomatoso (MOCH et al., 2016; CUBILLA et al., 2018; CUBILLA et al., 2016). A suspeita diagnóstica é feita clinicamente com o aparecimento de lesões – ulceradas, verruciformes ou planas na superfície peniana. No entanto, o diagnóstico definitivo histopatológico é necessário para condução terapêutica (CHAHOUUD et al., 2021).

Apesar da alta prevalência em nosso meio, falar sobre CA de pênis ou ser diagnosticado com tal patologia ainda é um tabu. Isso se reflete na busca tardia por ajuda e consequentemente acarreta em um diagnóstico tardio. Um estadiamento mais avançado no momento do diagnóstico reflete em um tratamento mais agressivo ao tumor. Graus histológicos mais baixos podem ser tratados com tratamentos locais ou cirurgias focais, como ressecção de lesão ou glandectomia, enquanto graus mais elevados necessitam de uma abordagem mais agressiva, desde amputação parcial do pênis até amputação total. Em alguns casos, quando o tumor atinge o testículo, é necessário fazer a retirada do mesmo e, em caso de comprometimento linfonodal, a linfadenectomia lateral é realizada (HAKENBERG et al., 2018; JOHNSTON; NIGAM, 2019). Por isso, a importância do diagnóstico precoce desses tumores.

Por vezes, a lesão encontra-se extremamente avançada no momento do diagnóstico, com comprometimento linfonodal, o que piora o prognóstico. O número de nódulos tumorais positivos, extensão extranodal e envolvimento pélvico foram altamente associados com pior sobrevida específica do câncer em pacientes com doença pN+ (DJAJADININGRAT, 2014). Além disso, em pacientes com sobrevida de longo prazo após câncer de pênis, são relatados casos de disfunção sexual, muito relacionado a dispareunia pós-tratamento, problemas de micção e aparência cosmética do pênis, o que pode afetar negativamente a qualidade de vida do paciente (AUDENET; SFAKIANOS, 2017).

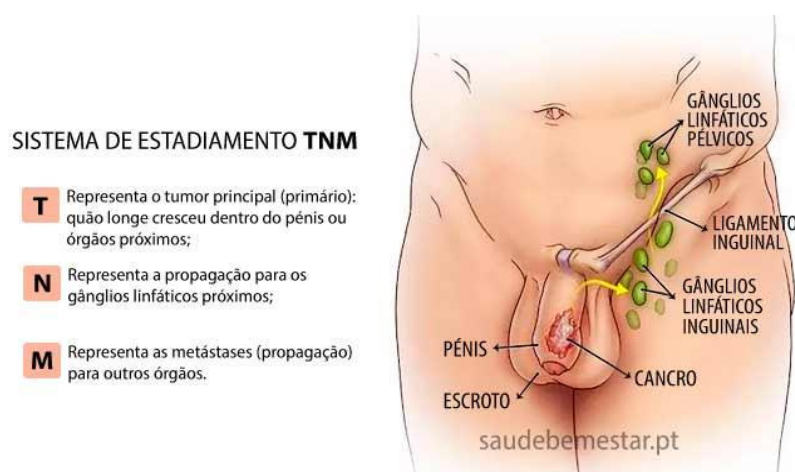
Até serem desenvolvidos tratamentos para a infecção por HPV ou tratamentos mais eficazes para o CA de pênis, a prevenção continua sendo o foco do controle da doença, como a higienização adequada do órgão, a cirurgia de fimose em casos específicos, utilização de preservativos em relações sexuais, o diagnóstico precoce da patologia e a vacina contra o HPV, para os subtipos relacionados ao HPV (STRATTON; CULKIN, 2016; COUTO, 2014). Para isso, é necessário entender melhor o perfil desses pacientes, seus hábitos, a característica histopatológica desses tumores e se eles têm ou não presença de HPV, para que assim sejam definidas políticas públicas voltadas para prevenção do CP, para avanços no tratamento e melhor prognóstico desses pacientes, aumentando consequentemente a qualidade de vida e taxa de sobrevida.

2.5.1 Classificação do câncer de pênis quanto ao estadiamento tumoral – TNM

A classificação TNM classifica o tumor de acordo com sua característica histológica por meio de uma descrição mais precisa das estruturas anatômicas envolvidas: o tamanho do tumor, tamanho dos nódulos regionais acometidos e presença de metástase a distância. Essa classificação é fundamental por funcionar como estratégia para subsidiar a perspectiva do prognóstico e terapêutico. Desta forma, os tumores de classe 1 estão limitados a pele e tecidos superficiais do pênis, com poucas probabilidades de invasão da região inguinal. Por outro lado, os tumores pertencentes a classe 2, 3 ou 4 independentes do grau de invasão na morfologia do pênis, possuem grande chances no comprometimento de metástases em linfonodos inguinais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Segundo a classificação TNM para o câncer de pênis, instituído em 2010 pelo American Joint Committee on Cancer (AJCC) tem como fundamento a avaliação da extensão tumoral (T), extensão do comprometimento linfonodal (N) e a ocorrência de metástases a distância (M). Quando o estadiamento do tumor atinge os estádios T2, T3 E T4 podemos dizer que o câncer de pênis é considerado avançado. Esses estádios relacionam-se ao grau de invasão e a probabilidade de metástase regional e sistêmica, o que repercute em pior prognóstico (Figura 8).

Figura 8. Sistema de estadiamento TNM.



Fonte: INCA, 2002.

O estadiamento TNM é um dos mais utilizados, pois é recomendado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC) e foi revisado em 2016 (Quadro 1).

Quadro 1. Sistema TNM – proposto pela UICC/AJCC para estadiamento do câncer de pênis.

T – Tamanho do tumor e grau de Infiltração	
Tx	Tumor não definido.
T0	Sem evidências de tumor primário.
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> .
Ta	Carcinoma verrucoso não-invasivo.
T1	Tumor invadindo tecido conjuntivo subepitelial.
T1a	Tumor invade tecido conjuntivo subepitelial sem invasão linfovascular e não é pouco diferenciado.
T1b	Tumor invade tecido conjuntivo subepitelial com invasão linfovascular ou é pouco diferenciado.
T2	Tumor invadindo corpo esponjoso com ou sem invasão da uretra.
T3	Tumor invadindo corpo cavernoso com ou sem invasão da uretra.
T4	Tumor invadindo outras estruturas adjacentes.
N – Situação dos linfonodos regionais	
Nx	Linfonodos regionais não avaliados.
N0	Nenhum linfonodo inguinal palpável ou visivelmente aumentado. Ausência de metástase em linfonodos regionais.
N1	Linfonodos inguinais unilaterais móveis palpáveis. Metástase em um dois linfonodo inguinais.
N2	Linfonodos inguinais móveis múltiplos ou bilaterais palpáveis. Metástase em mais de dois nodos inguinais unilaterais ou linfonodos inguinais bilaterais.
N3	Massa nodal inguinal fixa ou linfadenopatia pélvica unilateral ou bilateral. Metástase em linfonodos regionais inguinais profundos ou pélvicos, uni ou bilaterais ou extensão extranodal de metástase de linfonodos regionais.
M – Metástase Distante	
Mx	Presença de metástase à distância não pode ser avaliada.
M0	Ausência de metástase à distância.
M1	Presença de metástase à distância.

Fonte: BRIERLEY et al., 2017

2.5.2 Tratamento do câncer de pênis

O câncer de pênis (CP) requer um tratamento que geralmente ocorre após a verificação do tamanho do tumor, estágio e grau tumoral, localização da lesão e quando possível na preferência do paciente.

Em lesões primárias o tratamento mais indicado é a ressecção parcial ou total, radioterapia por feixe, braquiterapia e ablação a laser. As modalidades de tratamento local para o câncer peniano pequeno e localizado incluem cirurgia incisional, radioterapia. Lesões pequenas e invasivas (T1/T2) localizadas na glândula recebem tratamento como circuncisão adicional. Como opção tem-se: postectomia radical (tumores de prepúcio), excisão local, glandectomia parcial ou total, radioterapia e cirurgia a laser (HAKENBERG, 2017).

Quando existe comprometimento linfonodal deve-se efetuar o controle dos linfonodos regionais, sendo fundamental no tratamento do câncer de pênis, e pode ser necessário recorrer a quimioterapia adjuvante, em pacientes com doença que apresentam Metástase em múltiplos linfonodos ou linfonodos inguinais bilaterais (pN2) ou metástase em linfonodo pélvico, unilateral ou bilateral, ou extensão extranodal das metástases linfonodais regionais (pN3), após linfadenectomia radical. Por fim, há o tratamento sistêmico com quimioterapia a pacientes com tumor pN2-3 (HAKENBERG, 2017).

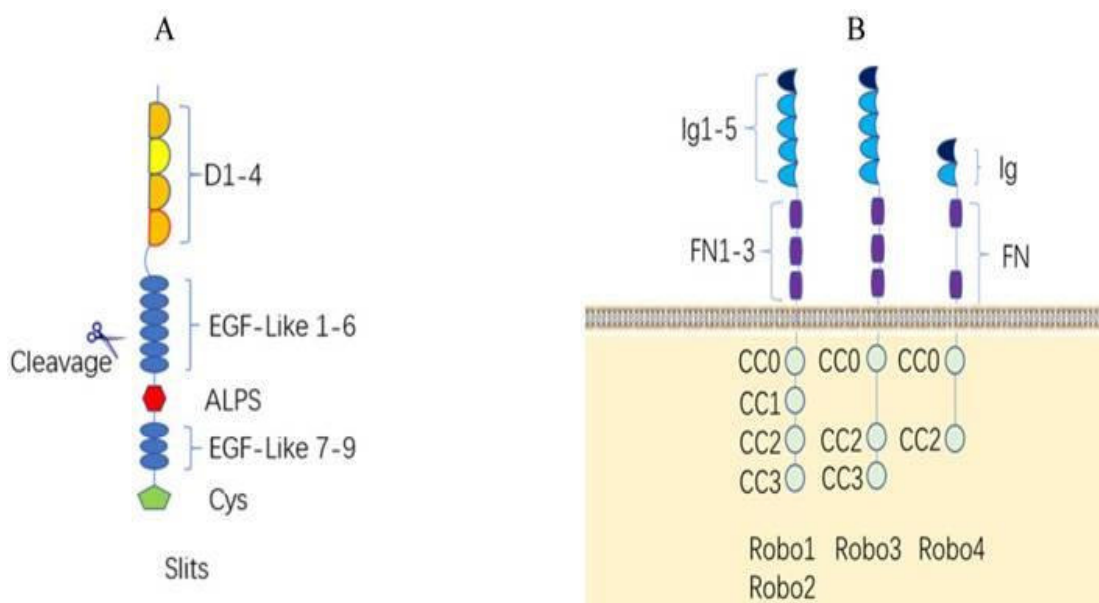
2.6 Sinalização SLIT/ROBO

Três genes SLIT (SLIT1, SLIT2, SLIT3) foram identificados em mamíferos (BROSE et al., 1999; HOLMES et al., 1998; ITOH et al., 1998). Os genes SLIT1 e SLIT2 são conhecidos por funcionar como quimiorrepelentes, atuando na orientação das células durante a organogênese (NGUYEN BA-CHARVET et al., 1999; RINGSTEDT et al., 2000; HAMMOND et al., 2005). Presume-se que a SLIT3 atue de forma semelhante, mas como exibe um padrão de expressão neuronal diferente (RINGSTEDT et al., 2000; HAMMOND et al., 2005) e demonstrou ser não repulsiva dos axônios motores (HAMMOND et al., 2005), isso ainda está para ser determinado.

Os genes SLIT codificam grandes proteínas glicosiladas, secretadas nomeadamente pelas células gliais da linha média, mas são também frequentemente encontradas associadas à matriz extracelular (BROSE et al., 1999). As SLIT são geralmente compostas por quatro domínios N-terminais ricos em leucina, seguidos por seis domínios semelhantes ao fator de crescimento epidérmico, um domínio semelhante à laminina G, outros três domínios EGF e um domínio do nó de cisteína C-terminal (BROSE et al., 1999).

O gene Roundabout (ROBO) (Figura 9), foi identificado pela primeira vez em triagens genéticas de *Drosophila sp.* para defeitos no cruzamento da linha média de axônios comissurais (KIDD et al., 1998; SEEGER et al., 1993). O nome “ROBO” origina-se da observação de axônios comissurais paralisados na linha média, criando um fenótipo designado “Roundabout” ou, abreviadamente, ROBO (TEAR et al., 1993). A formação de uma rede complexa de neurônios depende da interação SLIT/ROBO, que tem a função de mediar a atração ou repulsão de axônios em relação ao alvo específico, determinando, assim, a ação que essa interação irá realizar ao nível do sistema nervoso (FRANCESCO; ANDREW, 2019).

Figura 9. Estrutura do ROBO/SLIT.



Fonte: TONG et al., 2019.

A estrutura da SLIT humana constitui-se de fendas, que consistem em cinco regiões, como segue: um peptídeo de sinal N-terminal; quatro domínios ricos em

leucina (LRR, D1-D4) em conjunto com ligações dissulfeto; seis domínios semelhantes ao fator de crescimento epidérmico (semelhante ao EGF); um Agrin-Perlecan-Fenda de laminina (ALPS) (domínio semelhante a laminina G); três domínios de fator de crescimento epidérmico e um nó rico em cisteína C-terminal. As fendas são clivadas proteoliticamente entre domínios do tipo EGF (TONG et al., 2019) (Figura 9 – A).

Quanto à estrutura da proteína ROBO humana, os domínios extracelulares das proteínas ROBO1-3 têm as mesmas estruturas, incluindo cinco domínios de imunoglobulina, três domínios de fibronectina e um domínio transmembrana. O domínio extracelular ROBO4 tem apenas dois domínios de imunoglobulina, dois domínios de conexão de fibra e uma região transmembrana; a região intracelular ROBO1 e ROBO2 contém quatro domínios ricos em prolina conservados, referidos como CC0-CC3. O domínio intracelular ROBO3 contém CC0, CC2 e CC3, e o ROBO4 contém apenas CC0 e CC2 (TONG et al., 2019) (Figura 9 – B).

Muitos genes homólogos já foram identificadas em outras espécies (CHÉDOTAL, 2007). Após sua descoberta, as proteínas ROBO mostraram agir como receptores cognatos para o fator de orientação SLIT (BROSE et al., 1999; KIDD et al., 1999). Posteriormente, a via de sinalização SLIT/ROBO provou ser importante para muitos outros processos de desenvolvimento, incluindo a organogênese do rim (GRIESHAMMER et al., 2004), pulmões (DOMYAN et al., 2013) e coração (MOMMERSTEEG et al., 2013). Dado a sua importância durante o desenvolvimento, os receptores ROBO também foram implicados em vários tipos de câncer (SETH et al., 2005; LEGG et al., 2008; BALLARD E HINCK, 2012; HUANG et al., 2015) e em doenças crônicas, como a doença renal (HWANG et al., 2008) e fibrose hepática (CHANG et al., 2015). Como tal, eles agora são considerados alvos terapêuticos atraentes para o tratamento de várias patologias.

2.6.1 Via do SLIT/ROBO no câncer

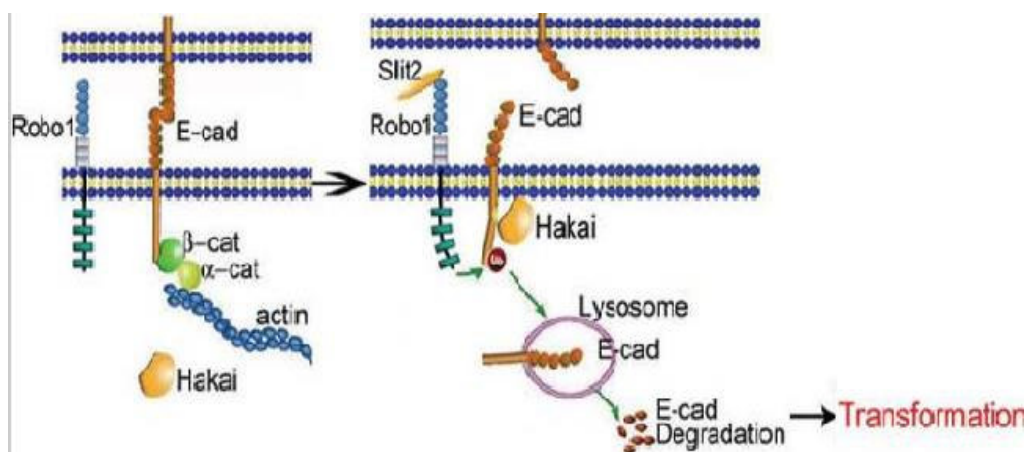
Os receptores ROBO são membros da superfamília de imunoglobulinas de moléculas de adesão celular (ICAMs), podendo realizar interações homofílicas e

heterofílicas (GARA et al., 2015). Por outro lado, essas proteínas transmembranas não apresentam atividade enzimática, o que sugere que esses receptores dependem da corrente de moléculas sinalizadoras. Atualmente, sabe-se que os receptores ROBO e seus ligantes SLIT estão envolvidos em diversos tipos de câncer onde interferem no controle da diferenciação e mobilidade celular (JIANG et al., 2019). Embora a sinalização SLIT/ROBO geralmente contribua para a homeostasia dos tecidos, muitos tipos de câncer mostram uma re-expressão específica de certas proteínas SLIT ou ROBO normalmente restritas ao desenvolvimento embrionário, contribuindo para a progressão tumoral (HAN et al., 2012).

Em estudo realizado por Grone et al. (2006), foi demonstrado que os genes ROBO1 e ROBO4 são expressos em níveis elevados no carcinoma colorretal em relação ao tecido saudável, enquanto a SLIT2 não apresentou expressão diferencial entre carcinoma colorretal e tecido saudável. A expressão de ROBO1 foi mais presente em células tumorais, enquanto ROBO4 foi mais expresso em células do endotélio tumoral. No estudo de Reichert et al. (2016), a expressão de SLIT2 e ROBO1 foi significativamente associada a um risco aumentado de metástase, o que sugere pior sobrevida para pacientes com carcinoma colorretal. Aumentos da expressão de ROBO1 e SLIT2 foram também detectados em tecidos mamários quando comparados aos tecidos epiteliais mamários normais e também houve aumento de SLIT1 no adenocarcinoma da próstata (HAN et al., 2012; GU et al., 2015). Outro tipo de câncer cada vez mais comum e de alta incidência que atinge mulheres jovens é o câncer de mama.

Recentemente, foi descoberto em outros estudos que o complexo SLIT/ROBO pode ligar e recrutar outras proteínas celulares, enfraquecendo a adesão e promovendo a migração de células tumorais, como a ubiquitina quinase Hakai, que leva à ubiquitinação de E-caderina (KOOHINI et al., 2019) (Figura 10).

Figura 10. Ilustração do modelo proposto do ROBO/SLIT.



Fonte: ZHOU et al., 2011.

Este estudo demonstra que o envolvimento de ROBO1 pela SLIT2 recruta a Hakai para a E-caderina, culminando na ubiquitinação de E-caderina e sua degradação lisossomal. A expressão de ROBO1 desencadeia uma transformação maligna em células HEK293 positivas para SLIT2, totalmente consistente com os papéis essenciais da sinalização de SLIT/ROBO durante a morfogênese celular e o desenvolvimento de órgãos. Assim, a sinalização SLIT/ROBO induz transformação maligna através da degradação da caderina-E, mediada por Hakai durante a carcinogênese de células epiteliais colorretais (KOOHINI et al., 2019).

No adenocarcinoma pancreático ductal, a expressão de ROBO2 é reduzida no epitélio enquanto a expressão de ROBO1 aumenta nas células do estroma tumoral, promovendo a agressividade tumoral através do fator de crescimento transformante beta ($TGF-\beta$) (PINHO et al., 2018).

Assim, a via SLIT/ROBO desempenha importantes papéis na biologia tumoral, que variam de tumor para tumor e até entre tipos celulares (ex. células tumorais versus células do estroma) dentro de tumores específicos. Apesar do seu importante papel no câncer, o seu papel no CP permanece desconhecido, tal como a sua possível associação com o HPV, justificando o presente estudo.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Analisar a interação da via de sinalização SLIT/ROBO com o HPV no carcinoma peniano e sua correlação com a tumorigênese.

3.2 Específicos

- Caracterizar os indivíduos envolvidos de acordo com seu perfil clínico, epidemiológico e histopatológico;
- Avaliar a prevalência de HPV nas amostras de câncer de pênis;
- Avaliar os tipos mais frequentes de HPV nas amostras de câncer de pênis;
- Avaliar os níveis de expressão gênica de genes da via SLIT/ROBO nas amostras de carcinoma peniano e em amostras de tecido sadio adjacente;
- Correlacionar os tipos de HPV encontrados nas amostras de carcinoma peniano com as variáveis clínico-histopatológicas;
- Correlacionar os níveis de expressão gênica encontrados nas amostras de carcinoma peniano com as variáveis clínico-histopatológicas;

4 METODOLOGIA

4.1 Tipo e local do estudo

Trata-se de um estudo quantitativo com recorte transversal. A pesquisa foi realizada no laboratório multiusuário com as amostras armazenadas no Biobanco de Tumores e DNA do Maranhão (BTMA). Foi realizada a análise dos prontuários dos pacientes vinculados às amostras nos hospitais de referência em Oncologia no Estado do Maranhão: Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello (IMOAB), Hospital Geral Tarquínio Lopes Filho e Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (HU-UFMA).

4.2 Critérios de inclusão na amostra

Foi utilizado o método de amostragem por conveniência. A população do estudo inclui 75 pacientes diagnosticados com câncer de pênis, no período compreendido entre 2018 e 2021. Participaram do estudo todos os pacientes cujas amostras foram armazenadas no BTMA.

4.3 Critério de exclusão da amostra

Foram excluídos da amostra pacientes que não aceitaram participar da pesquisa.

4.4 Coleta de dados

Os dados relacionados à investigação através do questionário sociodemográfico (Anexo B) foram coletados nos arquivos do Biobanco de Tumores e DNA do Maranhão (BTMA). Os dados clínicos e patológicos do paciente e do tumor (regiões acometidas, estadiamento clínico, tipo histológico, presença ou ausência de

comprometimento linfonodal e evolução clínica) foram obtidas diretamente do prontuário dos pacientes.

4.4.1 Coleta das amostras

As amostras estavam armazenadas no Banco de Tumor e DNA do Maranhão, sendo coletadas em três hospitais de referência em oncologia de São Luís – MA. Um dia antes do procedimento cirúrgico, a equipe de cada hospital entrava em contato com o grupo do BTMA para fornecer o mapa cirúrgico. Antes da cirurgia, a equipe convidava o paciente a participar da pesquisa, onde era aplicado um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE – Anexo A) e, em seguida, era aplicado um questionário sociodemográfico (Anexo B).

Para a pesquisa, era coletado um fragmento mínimo de tecido sadio e um fragmento de tecido tumoral de tamanho 0,5 x 0,3 x 0,3 cm. Os fragmentos das amostras eram colocados em um *ependorf* contendo RNA *later* (Life Technologies®) a 4 °C. O material coletado era armazenado no freezer a -20 °C em 24 horas e, após as 24 horas, o líquido do RNA *later* era desprezado e o material armazenado no freezer a -80 °C até o uso.

4.5 Extração e quantificação do DNA

A extração do DNA foi realizada para que posteriormente fosse feito o PCR para detecção de HPV nas amostras. O princípio do teste é o isolamento de DNA a partir de amostras de tecido fresco. Foi utilizado o kit *PureLink Genomic DNA Mini Kit Invitrogen* (*PureLink* Kit de purificação de DNA genômico).

4.5.1 Procedimentos iniciais

Ao abrir o kit, foi adicionado 96-100% de etanol aos tampões *PureLink Genomic Wash Buffer 1* e *Purelink Genomic Wash Buffer 2*, de acordo com as instruções do

fabricante. Depois, homogeneizou-se e foi ligado o termo-mixer a 55 °C. Após, as amostras de tecido fresco foram pesadas na balança analítica (uso máximo de 25mg de tecido).

4.5.2 Extração

O tecido pesado foi colocado em um tubo de 2 mL, depois foi adicionado 180 µL do *PureLink Genomic Digestion Buffer* e 20 µL de Proteinase K. As amostras foram incubadas a 55 °C (banho seco) até que a lise estivesse completa (1h - *overnight*). Vortexado algumas vezes. Após 1h de digestão, foi utilizado homogeneizador de tecidos para facilitar a digestão. Depois, o lisado foi centrifugado em velocidade máxima por três minutos à temperatura ambiente, para retirar debris. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Foi adicionado 20 µL de RNase ao lisado, depois vortexado e foi deixado incubando a temperatura ambiente por dois minutos. Adicionou-se 200 µL do *PureLink Genomic Lysis/Binding Buffer* e vortexou-se. Foi adicionado 200 µL de etanol 96-100% ao lisado e vortexado por cinco minutos. O lisado foi adicionado à coluna *PureLink Spin Column*.

O material foi centrifugado a 10,000 x g por 1 minuto, à temperatura ambiente. O tubo coletor utilizado foi descartado com o filtrado e foi colocada a coluna em um novo tubo coletor. Depois, foi adicionado 500 µL de *Wash Buffer 1* à coluna. Após isso, é centrifugada à temperatura ambiente a 10000 x g por 1 minuto. O tubo coletor foi descartado com o filtrado e colada à coluna em um novo tubo coletor. Foi adicionado 500 µL de *Wash Buffer 2* à coluna, centrifugado em velocidade máxima por 3 minutos, à temperatura ambiente. Descartado o tubo coletor com o filtrado. Depois, foi colocada a coluna *spin* em um tubo de 1,5 estéril e adicionado 50-100 µL de *PureLink Genomic Elution Buffer* à coluna. Incubado à temperatura ambiente por 1 minuto. A coluna foi centrifugada em velocidade máxima por 1 minuto. O tubo contém, ao final, DNA eluído, a coluna foi removida e descartada. O DNA purificado foi armazenado a -20 °C.

4.6 PCR Nested

Para realização do PCR Nested foi primeiro pré-aquecido o tampão 5x SS/IV *Buffer* para temperatura ambiente antes de ser utilizado. Para a preparação dos *primers* PGMY 09 e PGMY 11, foram utilizados os reagentes que vem em cada kit de *primer*. No PGMY 09, foram utilizados 13 reagentes, 2 µL de cada reagente, totalizando 26 µL e adicionado 74 µL de água pura. Para o PGMY 11, foram utilizados 5 reagentes, 2 µL de cada, totalizando 10 µL e adicionados 90 µL. Ao final, os dois *primers* continham 100 µL (VIDAL et al., 2012).

4.6.1 PCR

Para controle positivo, foi utilizada uma amostra que sabidamente tinha HPV positivo e para controle negativo, um tubo sem amostra. A amostra para reação consistiu em um volume final de 25 µL contendo, dessa, eram 5 µL da amostra de DNA adicionados 20 µL de uma mistura contendo 2,5µL de tampão 10X, 0,4 µL de cada *primer*, 0,5µL de cloreto de magnésio a 50 Mm, 0,2 µL de Dntp 10 Mm, 0,2 µL de Taq Polimerase Platinum (*Invitrogen*) e 15,8 µL de H₂O ultrapura (COUTLÉE et al., 2002).

Para o PGMY09, a reação durou aproximadamente 2 horas no termociclador, em 40 ciclos no termociclador *Biocycler* (*MJ Research*®, USA). Para a reação dos *primers* PGMY09, a desnaturação inicial ocorreu por 2 minutos a 95 °C, seguido por 40 ciclos de desnaturação por 40 segundos a 95 °C, 40 segundos de anelamento a 55 °C, 40 segundos de extensão a 72 °C. O segundo *round* foi utilizado PGMY11 no termociclador *overnight*.

4.6.2 Visualizações dos produtos amplificados

A visualização dos produtos amplificados foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão de TBE 1x. Foi adicionado uma alíquota de 5UI de DNA homogeneizado de carregamento e corante a 0,1% *Gel Red*, sendo toda a

mistura aplicada no gel. A eletroforese foi realizada em 30 minutos a 5v/cm² em cuba horizontal (*Life Technologies*®, EUA). Logo em seguida, os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em um transluminador de luz ultravioleta (*BIO-RAD Laboratories*®, EUA).

4.6.3 Identificação dos tipos de HPV presentes

Os tipos de HPV presentes foram identificados utilizando o método semiquantitativo (Anyplex II 28, Seegene), tal como anteriormente descrito (GONÇALVES et al., 2020). O ensaio está dividido em dois passos: no primeiro passo, são detectados 14 tipos de HPV de alto risco oncogênico. No segundo passo, são detectados 9 tipos de HPV de baixo risco e 5 são considerados de possível alto risco.

4.6.4 Extração de RNA / Conversão cDNA

Para isolamento da molécula de ácido ribonucleico, foi utilizado o *Rneasy Plus Micro kit* (*Invitrogen*). Para a reação de transcriptase reversa, foi utilizado kit *SuperScript® IV First-Strand Synthesis System* da *Thermo Fischer Scientific*®.

4.6.5 qRT/PCR

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

- 1) Inicialmente, para a reação de cadeia de polimerase, preparou-se o mix *Power Syber Green*. Ao combinar-se, nessa ordem, 6 µl de *Power Syber Green*, 0,4 µl do *primer F*, 0,4 µl do *primer R* e 4,5 µl de água ultrapura para cada gene alvo;
- 2) Após essa etapa, homogeneizou-se e distribuiu-se 11 µl do *mix* em cada poço da placa, de acordo com o número de reações;
- 3) Em seguida, acrescentou-se 1 µl de ácido desoxirribonucleico complementar

das amostras em cada poço da placa. Após esse processo, vedou-se a placa. Em ocasiões onde houve formação de bolhas na placa, utilizou-se o *spin*. Após preparação prévia, colocou-se a placa no aparelho *StepOne* e iniciou-se a reação;

Utilizou-se a seguinte ciclagem: 95 °C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C a 5 segundos, 54 °C a 10 segundos, 95 °C a 15 segundos, 60 °C a 1 minuto e 95 °C a 15 segundos. A Reação em Cadeia de Polimerase em tempo real foi realizada no Sistema de Detecção de Sequência *StepOne* para os seguintes *primers*:

- SLIT1 *forward*, 5'-GACGTGGTCTGTCCCCACAA-3; e *reverse* 5'-AATCTCATTGTTATTCAATCGCAGTT-3;
- SLIT2 *forward*, 5'-TCCTAACTCCAAAGGGATTCAAATGT-3; e *reverse*, 5'-GGCTCCGTTTTTACACTTGTTGTCT-3;
- SLIT3 *forward*, 5'-CCGCCTAACTACACAGGTGAGCTAT-3; e *reverse*, 5'-CGCTGTAGCCAGGGACACACT-3;
- ROBO1 *forward*, 5'-GCATCGCTGGAAGTAGCCATACT-3; e *reverse*, 5'-CTAGAAATGGTGGGCTCAGGAT-3;
- ROBO2 *forward*, 5'-GGGTTACTACATCTGCCAGGCTT-3; e *reverse*, 5'-AGGTGGAGGTCTATCTGTCAAAACAT-
- ROBO4 *forward*, 5'- CCCTGTGCTTGGAAGTCAAGTG-3' e *reverse*, 5'-CGCTGATGTACCCATAGGTGG-3;
- GAPDH *forward*, 5'- TGCACCACCAACTGCTTAGC -3', e *reverse*, 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG -3'.
- HUMAN HIF-1a *forward*, 5'-ACCCACCGCTGAAACGC-3; e *reverse* 5'-TAGGCTCAGGTGAACTTTGTCT-3'.

Os resultados foram expressos sob a forma de $2^{-\Delta\Delta CT}$, calculado como anteriormente descrito (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

4.7 Análise histológica para coloração de hematoxilina e eosina (H&E)

As amostras foram coletadas para análise histológica fixada em formol a 10% durante 48 horas. Logo em seguida, os tecidos foram desidratados através de graduações de álcool (70%, 90% e duas vezes 100%) e xileno (duas vezes 100%) e

emblocados em parafina utilizando um processador automático STP 120 (Micro, Boise, ID). Os blocos de parafina foram cortados em secções de 4 µm de espessura, colocados em lâminas de vidro e coradas com hematoxilina e eosina (H&E).

Para corar com H&E, as lâminas foram submetidas inicialmente a desparafinização em xilol, desidratadas em graduações de álcool, depois lavagem das lâminas, imersão em hematoxilina, lavagem em água corrente, imersas em eosina, posteriormente expostas a água corrente, graduação de álcool e, por fim, em xilol, e montadas com lamínula. As amostras foram analisadas em microscópio óptico para determinação do subtipo histológico e do grau histológico nas amostras de câncer de pênis (MOCH et al., 2016), em colaboração com o Prof. Dr. Antonio Cubilla, da Universidade Nacional de Asunción.

4.8 Aspectos éticos

A presente pesquisa é parte do projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUUFMA sob parecer de número 4.487.133 (Anexo C), de acordo com as normas para pesquisa envolvendo seres humanos.

4.9 Análise estatística

Para sumarização de variáveis sociodemográficas individuais e retirada de células indeterminadas e sem resposta, foi utilizado o programa estatístico STATA 14.0. A análise estatística para variáveis categóricas consistiu em testes de associação utilizando-se o Teste do Qui-Quadrado. Para estudo dos níveis de expressão gênica da via SLIT/ROBO em tecidos tumorais e sadios e suas correlações com o HPV e variáveis clínico-patológicas, foi utilizado o GraphPad Prism da versão m9.3.1. A normalidade destas variáveis foi testada usando o teste de Shapiro-Wilk, verificando-se que não seguem uma distribuição normal. Para testar a associação dos valores de expressão gênica com as restantes variáveis foi usado o teste de Mann Whitney. Os valores estimados para níveis de significância foram comparados ao valor padrão de 0,05 para o nível de significância.

5 RESULTADOS

5.1 Variáveis sociodemográficas

Dos 75 pacientes estudados em nossa casuística que tinham CEC, a maioria dos pacientes usufruía de menos de um salário mínimo (52%). A média de idade dos pacientes ao diagnóstico foi de aproximadamente 64 anos (± 16), sendo a menor idade registrada de 30 anos e a maior, de 97. A maioria tinha o ensino fundamental incompleto (30,59%). Quanto ao estado civil, a maioria se dizia casada (43,53%), enquanto que em relação à procedência, a maioria residia no interior do estado do maranhão (61,76%) (Tabela 1).

Tabela 1. Dados sociodemográficos de pacientes diagnosticados com câncer de pênis.

Variável	n	%
Renda		
< 1 salário	13	52
2 – 3 salários	3	12
> 3 salários	2	8
Escolaridade		
Analfabeto	23	27,06
Fundamental incompleto	26	30,59
Fundamental completo	20	23,53
Médio incompleto	8	9,41
Médio completo	7	8,24
Superior incompleto	1	1,18
Estado civil		
Solteiro	24	28,24
União Estável	12	14,12
Casado	37	43,53
Divorciado	4	4,71
Viúvo	8	9,41
Procedência		
São Luís – MA	21	30,88
Interior – MA	42	61,76
Outro estado	5	7,35

Fonte: próprio autor.

A Tabela 2 mostra as características relacionados ao hábito de vida e sexualidade dos pacientes, onde foi possível identificar os seguintes dados: em relação a higiene cotidiana, afirmaram que conseguiam higienizar o pênis (74,36%), embora menos da metade relatasse que conseguia expor a glândula de forma parcial (32,20%). Quando foram questionados em relação à variável intervalo da idade da primeira relação sexual, a maioria (60,87%) respondeu que ocorreu no intervalo entre 15 e 19 anos. Quando perguntado sobre a variável parceiro fixo, a maioria respondeu que morava com cônjuge (67,95%), e se os mesmos haviam realizado a circuncisão, a maioria respondeu que não (76,92%). Ainda foi perguntado sobre o uso de camisinha e a maioria relatou que nunca havia usado (50,67%), e se os mesmos pacientes faziam a higienização do membro após a relação sexual, a maioria respondeu que sim (80,43%). A presença de verrugas genitais surgiu em 50% dos indivíduos. Quanto ao local da lesão, a maioria apresentou na glândula do pênis (62,79%).

Tabela 2. Características relacionados ao hábito de vida e sexualidade dos pacientes diagnosticados com câncer de pênis.

Variáveis	n	%
Higiene cotidiana		
Sim	58	74,36
Não	20	25,64
Expõe glândula		
Não	13	22,03
Parcial	19	32,20
Total	27	45,76
Intervalo de idade da 1ª relação		
5 – 9	2	2,90
10 – 14	19	27,54
15 – 19	42	60,87
20 – 24	4	5,80
25 – 29	2	2,90
Parceiro fixo		
Sim	53	67,95
Não	25	32,05
Circuncisão		

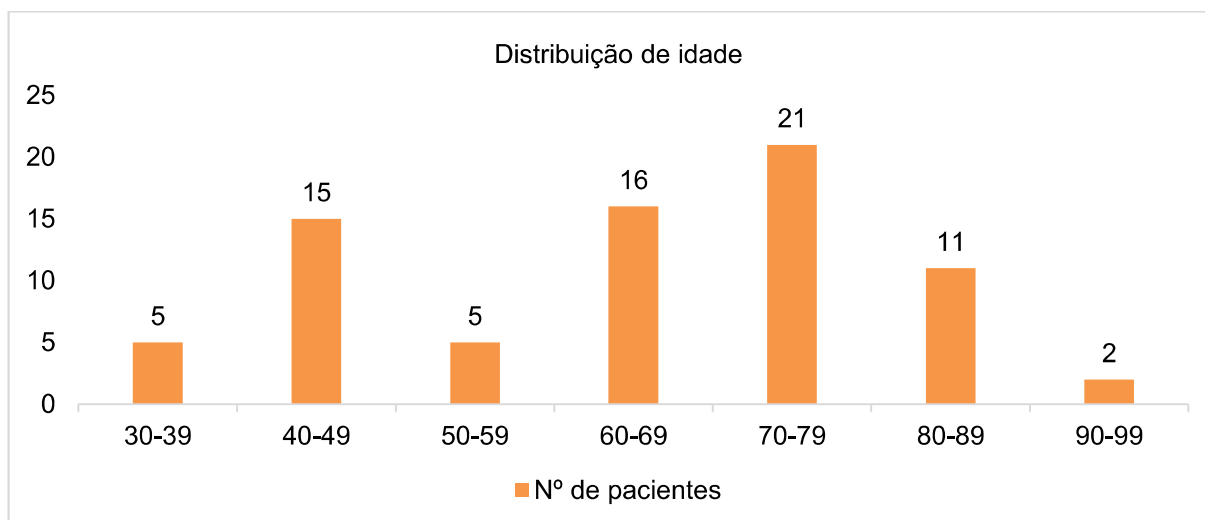
(continua)

(continua)

Sim	18	23,08
Não	60	76,92
Camisinha		
Às vezes	31	41,33
Nunca	38	50,67
Sempre	6	8
Higiene após relação		
Sim	37	80,43
Não	9	19,57
Verrugas		
Sim	41	50
Não	41	50
Local da lesão		
Corpo	5	5,81
Glande	54	62,79
Glande + corpo	5	5,81
Glande + prepúcio	9	10,47
Glande + prepúcio + corpo	6	6,98
Prepúcio	6	6,98
Prepúcio + corpo	1	1,16

Fonte: próprio autor.

Gráfico 1. Distribuição de idade dos pacientes com câncer de pênis.



Fonte: próprio autor.

A Tabela 3 classifica os subtipos de amostras de tumor de HPV, onde podemos observar que o subtipo predominante neste estudo foi o condilomatoso, representando 50% das amostras, seguida do subtipo usual (25%).

Tabela 3. Classificação das amostras de HPV pelo subtipo histológico.

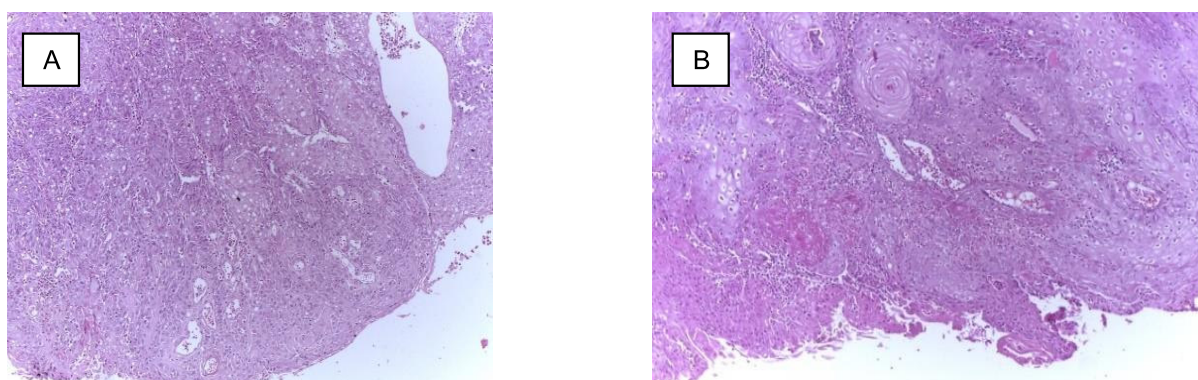
Subtipo	n	%
Basaloide	3	12,50
Ceratinizante	1	4,17
Condilomatoso	12	50,00
Usual	6	25,00
Verrucoso	1	4,17
Sem outra especificação	1	4,17

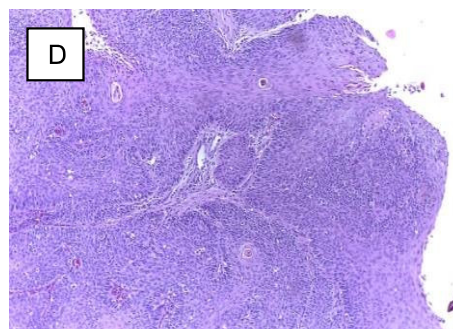
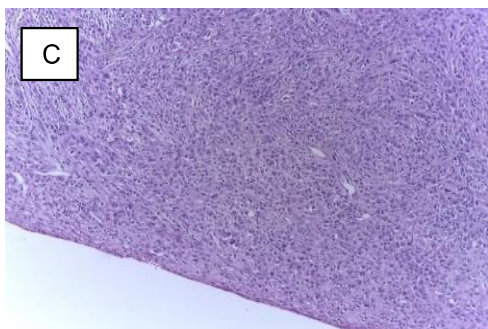
Fonte: próprio autor.

5.2 Variáveis clínico-patológicas

Todas as amostras foram classificadas como carcinomas escamosos, tendo sido depois divididas em subtipos histológicos com base em lâminas coradas com H&E (Figura 11).

Figura 11. Histologia de amostras de pênis demonstrando diversos subtipos de carcinoma escamoso (H&E, 100x).





Legenda: A = Usual, H&E, 100x; B = Condilomatoso com coilócitos, H&E, 100x; C = Sarcomatóide, H&E, 100x; D = Basalóide, H&E, 100x. Fonte: próprio autor.

Os dados relativos ao estadiamento TNM foram recolhidos dos prontuários médicos e sumarizados na Tabela 4. Verifica-se que a maioria dos pacientes apresentou estadiamento T2 ou T3, com falta de avaliação dos linfonodos (n=31; total=44), não sendo possível serem avaliados (categorias Nx ou pNx), e de eventuais metástases distantes (Mx, pMx).

Tabela 4. Sistema de classificação TNM.

Estadiamentos	n	%
T		
T1	1	1,85
T1a	6	11,11
T1b	7	12,96
T2	17	31,48
T3	16	29,63
T4	3	5,56
Tis	4	7,41
N		
N0	1	2,27
NX	5	11,36
pN0	1	2,27
pN1	1	2,27
pN2	2	4,55
pN3	3	6,82
pNx	31	70,45
M		
MX	4	16
pMX	21	84

Fonte: próprio autor.

Cerca de um terço dos pacientes (34,48%) apresentava, ao diagnóstico, Grau I de Broders. Quantidades similares apresentavam Grau II (idem) e Grau III (31,03%) (n=58).

Tabela 5. Classificação de Broders.

Broders	n	%
I	20	34,48
II	20	34,48
III	18	31,03

Fonte: próprio autor.

De 41 pacientes, apenas em 12 (29,27%) foi identificada invasão perineural (Tabela 6).

Tabela 6. Invasão perineural.

Invasão perineural	n	%
Sim	12	29,27
Não	29	70,73

Fonte: próprio autor.

Observou-se uma associação estatisticamente significativa da variável higiene cotidiana ($p = 0,003$) e da variável invasão angiolinfática ($p = 0,032$) com a presença ou não de HPV. A prática de higienizar-se foi mais frequentemente relatada por pacientes HPV positivos (85,71% deles). Dentre os pacientes que tinham HPV, a maioria não apresentou invasão angiolinfática (61,29%), enquanto que a maioria dos que não apresentaram HPV tinham a invasão angiolinfática (75%) (Tabela 7).

Tabela 7. Associação das variáveis com diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao HPV de pacientes diagnosticados com câncer de pênis.

Variáveis	Presença de HPV		p
	HPV (+) n (%)	HPV (-) n (%)	
Higiene cotidiana			
Sim	36 (85,71)	12 (52,17)	0,003
Não	6 (14,29)	11 (47,83)	

(continua)

(continua)

Invasão angiolinfática			
Sim	12 (38,71)	9 (75)	0,032
Não	19 (61,29)	3 (25)	

Fonte: próprio autor.

A presença de DNA de HPV foi avaliada utilizando PCR Nested. Neste teste, quase dois terços das amostras revelaram presença de DNA de HPV (61,84%) (Tabela 8).

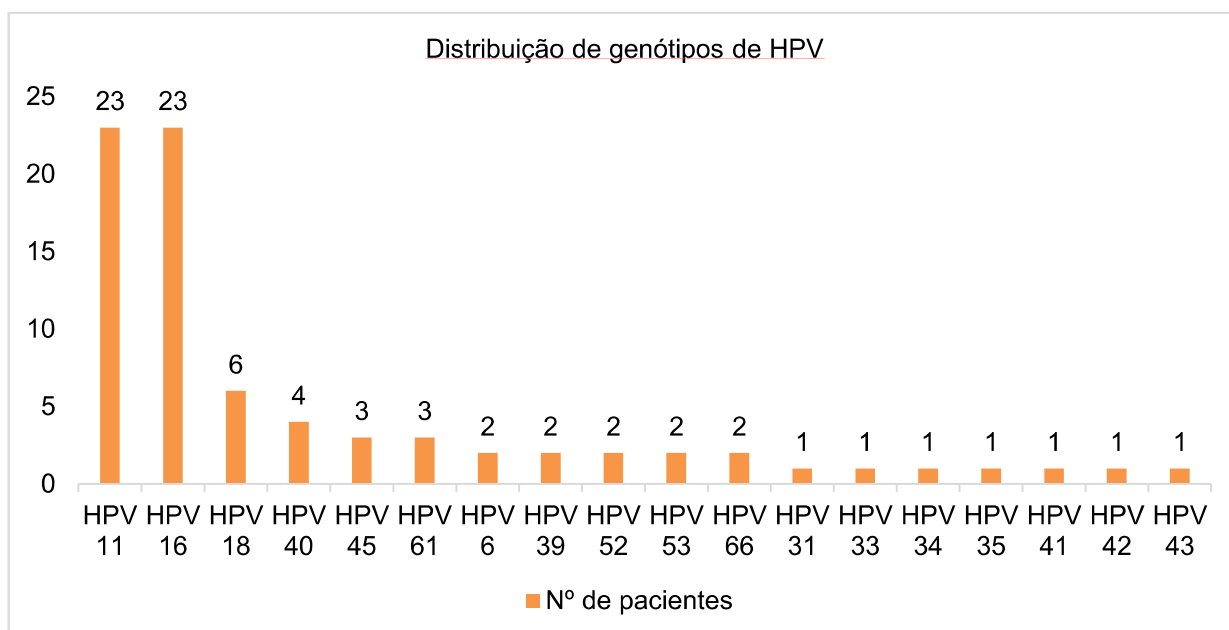
Tabela 8. Classificação das amostras quanto à presença de DNA de HPV.

HPV	n	%
Negativo	29	38,16
Positivo	47	61,84

Fonte: próprio autor.

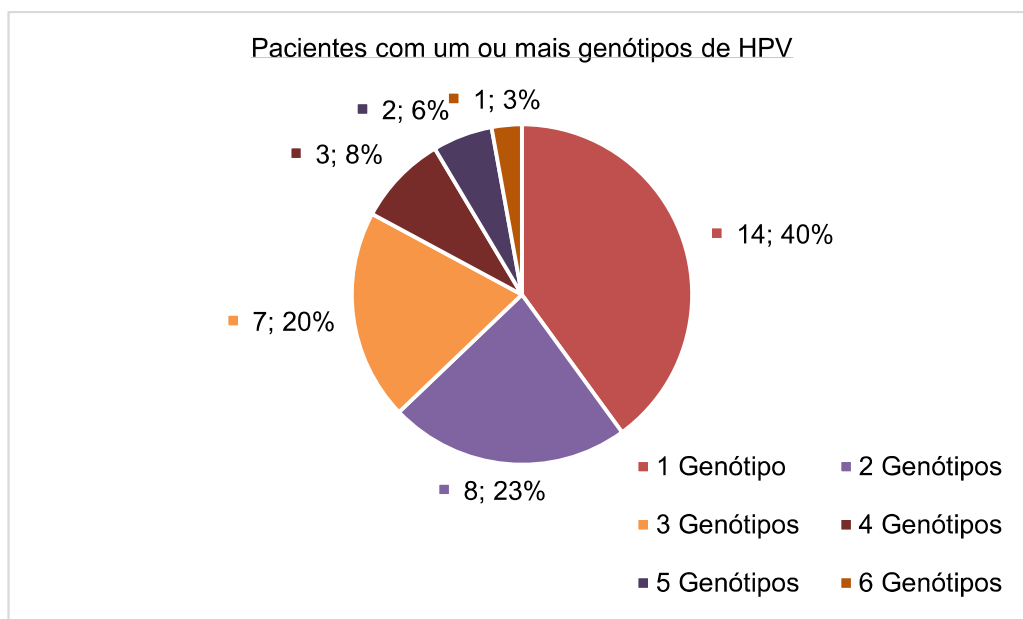
A presença dos genótipos HPV 11 e HPV 16 foi detectada em metade dos 46 pacientes HPV-positivos que foram analisados (Figura 13). Enquanto 40% dos casos apresentaram infecções por um único tipo de HPV, a maioria apresentava infecções múltiplas (Figura 14).

Gráfico 2. Distribuição de genótipos de HPV em amostras de câncer de pênis HPV-positivas.



Fonte: próprio autor.

Gráfico 3. Frequências absolutas e relativas de pacientes com infecções por HPV simples e múltiplas.



Fonte: próprio autor.

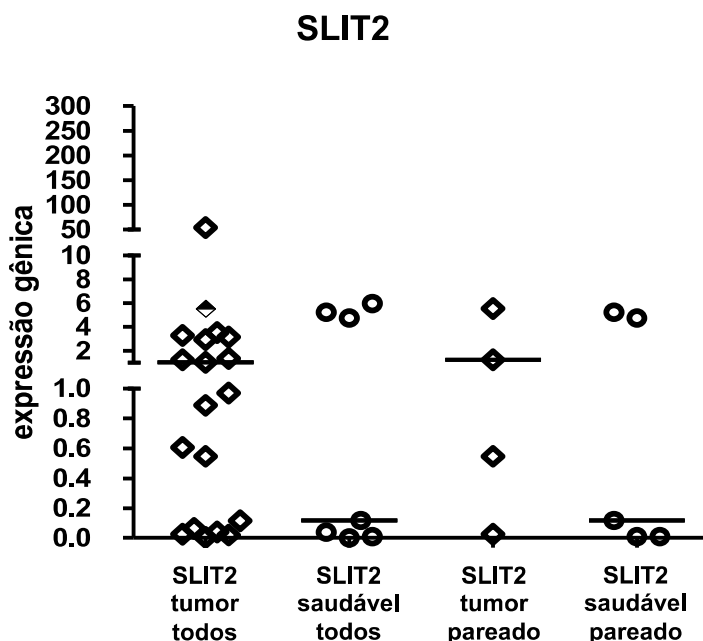
5.3 Estudo do eixo SLIT/ROBO

Para estudar as possíveis alterações da expressão de genes do eixo SLIT/ROBO no CP, começamos por comparar os seus níveis de expressão em amostras tumorais e em amostras de tecido adjacente não tumoral (Gráficos 4 a 8).

Os níveis de expressão de todos os genes foram bastante baixos, com a maioria das amostras a apresentar valores de CT superiores a 30. Inicialmente, foram comparados os níveis de expressão génica de todas as amostras tumorais disponíveis com todas as amostras sadias disponíveis, independentemente de serem ou não amostras pareadas de cada paciente. Em seguida, a análise foi repetida apenas em pacientes com amostras tumorais e sadias pareadas.

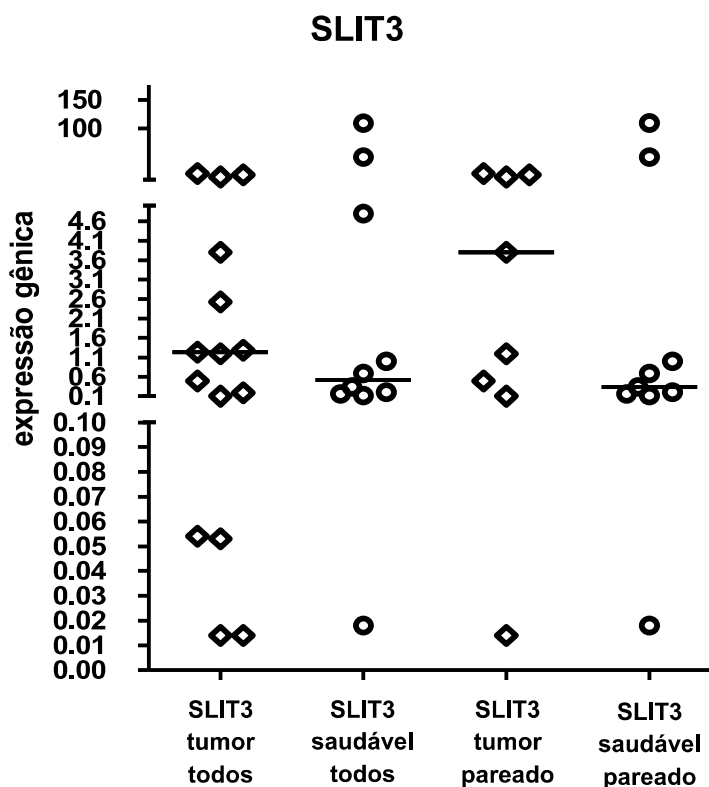
Nestas análises, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para nenhum dos genes estudados, entre amostras tumorais e sadias, usando as duas abordagens referidas.

Gráfico 4. Níveis de expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) do SLIT2 em amostras de CP e de tecido adjacente.



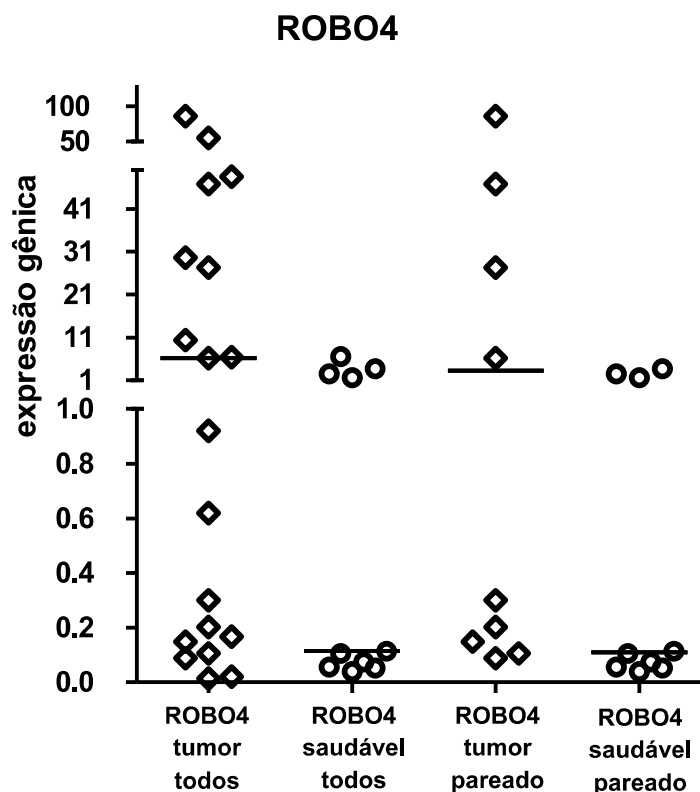
Legenda: Losangos = amostras de CP; Círculos = tecido adjacente. Foram comparadas amostras sem pareamento (primeiros dois grupos) e amostras pareadas (últimos dois grupos). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney para ambas as análises. Fonte: próprio autor.

Gráfico 5. Níveis de expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) do SLIT3 em amostras de CP e de tecido adjacente.



Legenda: Losangos = amostras de CP; Círculos = tecido adjacente. Foram comparadas amostras sem pareamento (primeiros dois grupos) e amostras pareadas (últimos dois grupos). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney para ambas as análises. Fonte: próprio autor.

Gráfico 8. Níveis de expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) do ROBO4 em amostras de CP e de tecido adjacente.



Legenda: Losangos = amostras de CP; Círculos = tecido adjacente. Foram comparadas amostras sem pareamento (primeiros dois grupos) e amostras pareadas (últimos dois grupos). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney para ambas as análises. Fonte: próprio autor.

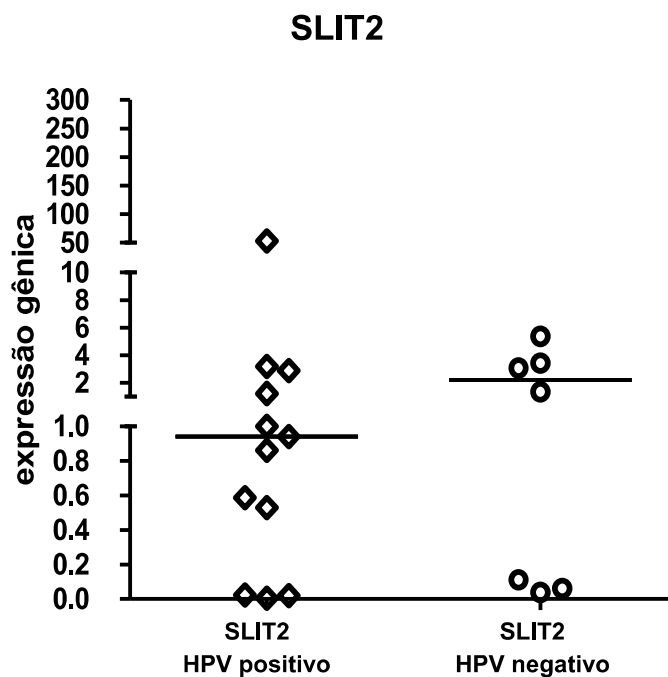
5.3.1 Níveis de expressão de genes do eixo SLIT/ROBO e variáveis clínico-patológicas

Foi estudada a relação entre os níveis de expressão gênica do SLIT2, SLIT3, ROBO1, ROBO2 e ROBO4 com a presença ou ausência de DNA de HPV, com a presença de tipos de HPV de alto risco ou apenas HPVs de baixo risco, com a presença de invasão perineural e angiolinfática, com o grau histológico (categorizado como baixo – grau I ou como alto – graus II ou III), estadiamento TNM (categorizado como baixo se inferior a T2 sem envolvimento linfonodal e como alto se igual ou superior a T2 e se inferior a T2 com envolvimento linfonodal) e com os subtipos histológicos presentes (agrupados como subtipos relacionados com o HPV e subtipos independentes do HPV).

5.3.2 Níveis de expressão do gene SLIT2 e variáveis clínico-patológicas

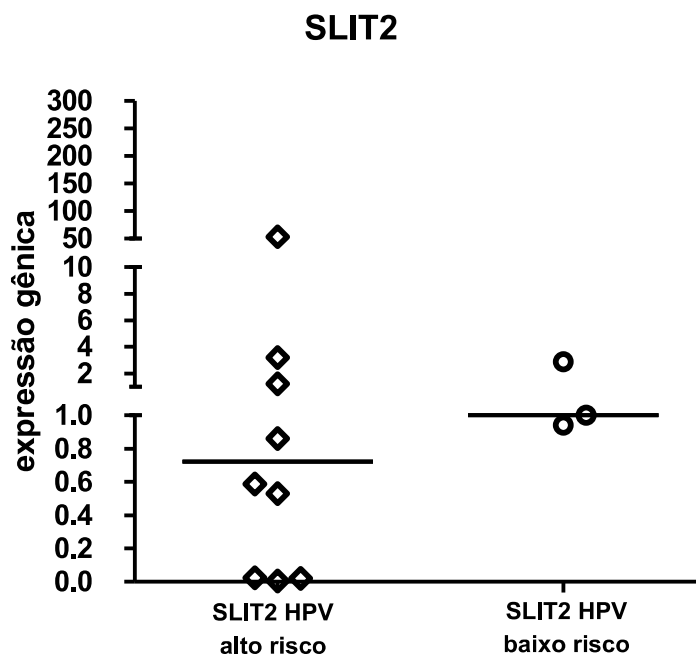
Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os níveis de expressão do SLIT2 e a presença de DNA de HPV, os tipos de HPV presentes, com a presença de invasão angiolinfática, com o grau histológico, estadiamento TNM, nem com os subtipos histológicos presentes ($p > 0,05$ nos Gráficos 9, 10 e 12 ao 15). Foi observada uma associação significativa entre níveis mais reduzidos de SLIT2 e a presença de invasão perineural ($p = 0,028$ no teste de Mann-Whitney, no Gráfico 11).

Gráfico 9. Níveis de expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) do SLIT2 em amostras de CP com DNA de HPV positivo e negativo.



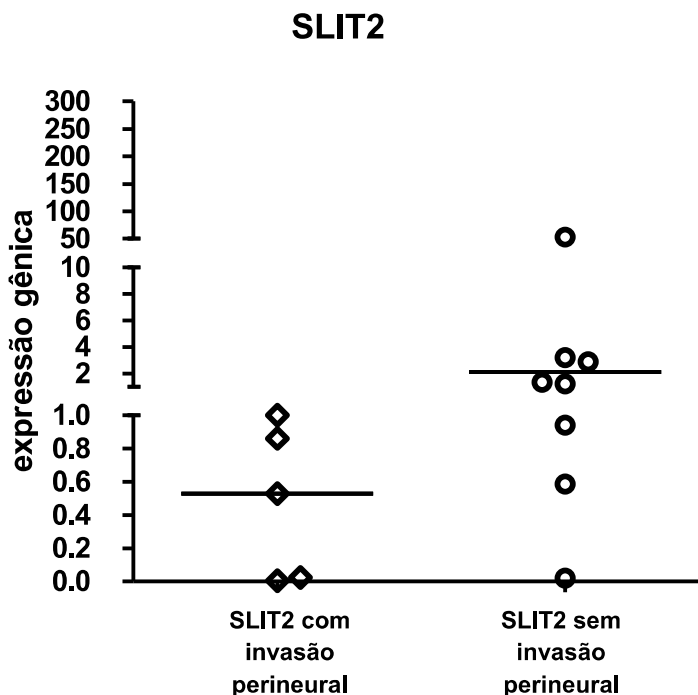
Legenda: Losangos = amostras de CP com DNA de HPV positivo ($n = 13$); Círculos = amostras de CP com DNA de HPV negativo ($n = 8$). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 10. Níveis de expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) do SLIT2 em amostras de CP com DNA de HPV de alto e baixo risco.



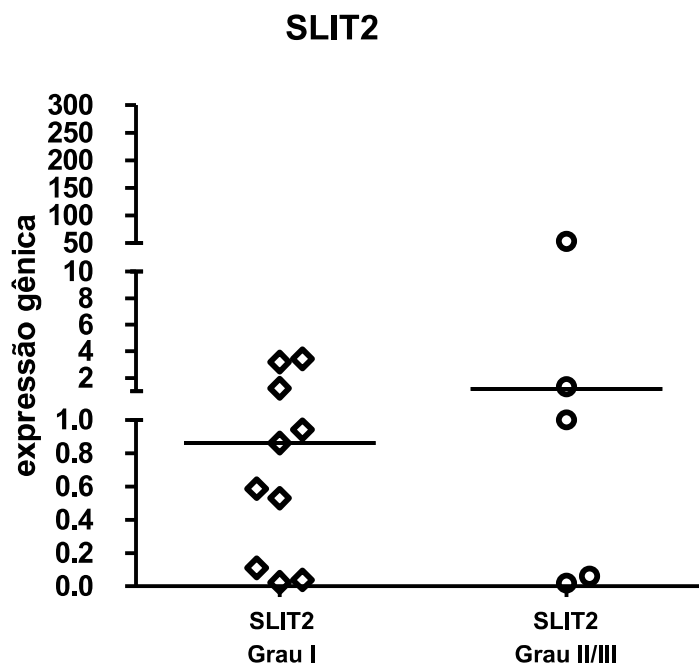
Legenda: Losangos = amostras de CP com DNA de HPV de alto risco ($n = 10$); Círculos = amostras de CP com DNA de HPV de baixo risco ($n = 3$). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 11. Níveis de expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) do SLIT2 em amostras de CP com e sem invasão perineural.



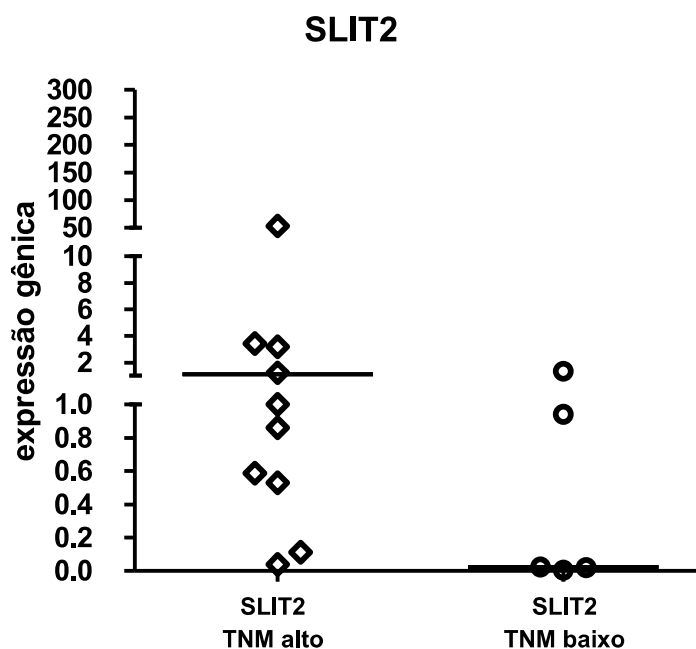
Legenda: Losangos = amostras de CP com invasão perineural ($n = 5$); Círculos = amostras de CP sem invasão perineural ($n = 10$). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P = 0,028$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 12. Níveis de expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) do SLIT2 em amostras de CP com Grau de Broders I e II/III.



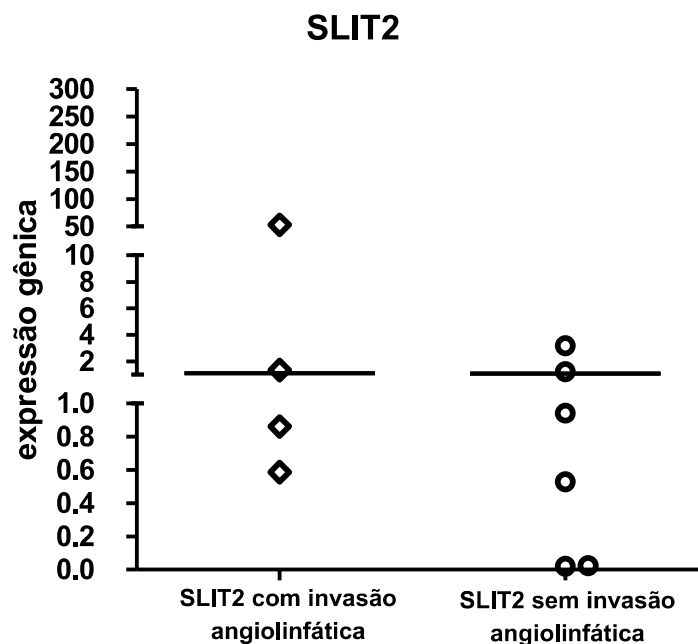
Legenda: Losangos = amostras de CP com Grau de Broders I ($n = 11$); Círculos = amostras de CP Grau de Broders II/III ($n = 6$). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 13. Níveis de expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) do SLIT2 em amostras de CP com TNM alto e baixo.



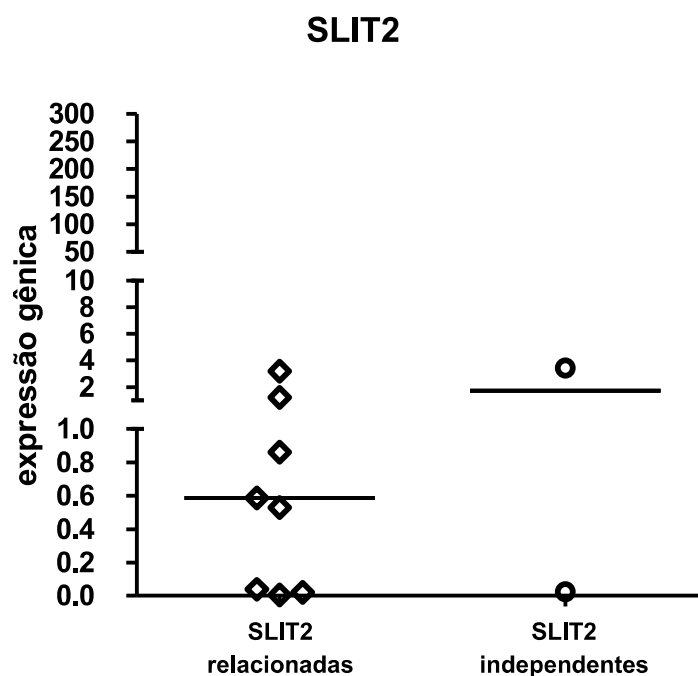
Legenda: Losangos = amostras de CP com TNM alto ($n = 12$); Círculos = amostras de CP com TNM baixo ($n = 5$). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 14. Níveis de expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) do SLIT2 em amostras de CP com e sem invasão angiointerfática.



Legenda: Losangos = amostras de CP com invasão angiointerfática ($n = 4$); Círculos = amostras de CP sem invasão angiointerfática ($n = 8$). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 15. Níveis de expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) do SLIT2 em amostras de CP relacionadas ou não com os subtipos de HPV.

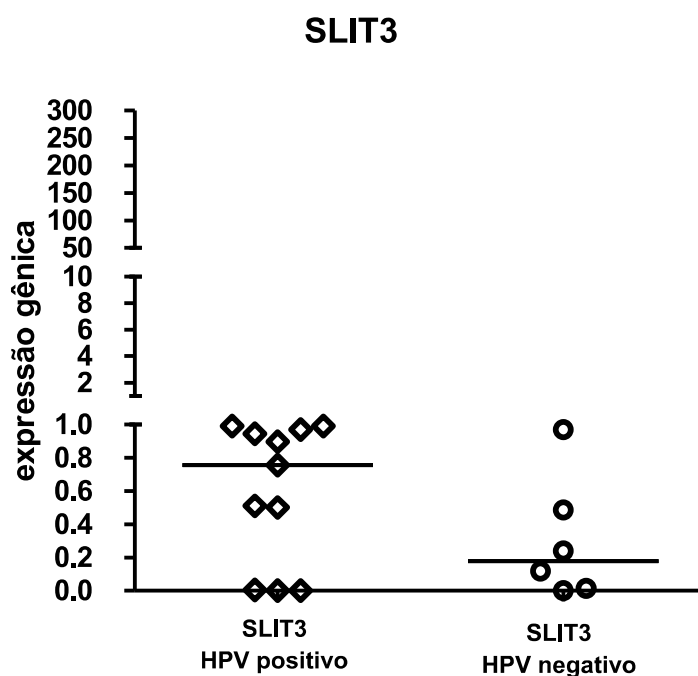


Legenda: Losangos = amostras de CP relacionadas com subtipo de HPV ($n = 9$); Círculos = amostras de CP independentes do subtipo de HPV ($n = 2$). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

5.3.3 Níveis de expressão do gene SLIT3 e variáveis clínico-patológicas

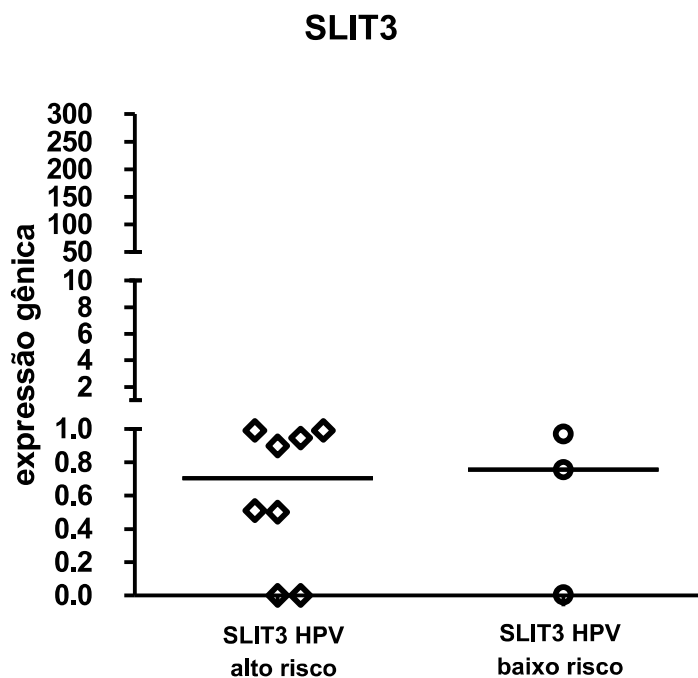
Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os níveis de expressão do SLIT3 e a presença de DNA de HPV, os tipos de HPV presentes, com a presença de invasão perineural, invasão angiolinfática, com o grau histológico, estadiamento TNM nem com os subtipos histológicos presentes ($p > 0,05$ nos Gráficos 16 ao 21).

Gráfico 16. Níveis de expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) do SLIT3 em amostras de CP com DNA de HPV positivo e negativo.



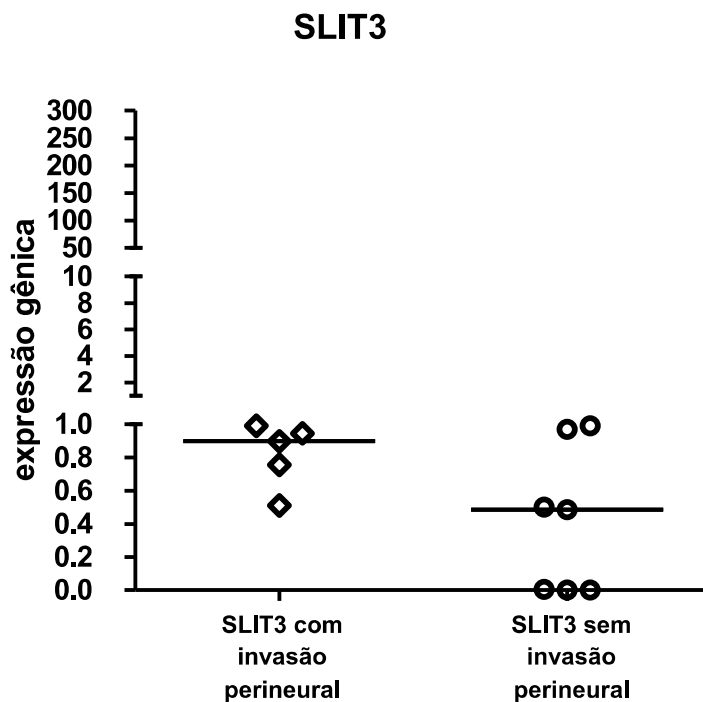
Legenda: Losangos = amostras de CP com DNA de HPV positivo ($n = 11$); Círculos = amostras de CP com DNA de HPV negativo ($n = 6$). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 17. Níveis de expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) do SLIT3 amostras de CP com DNA de HPV de alto e baixo risco.



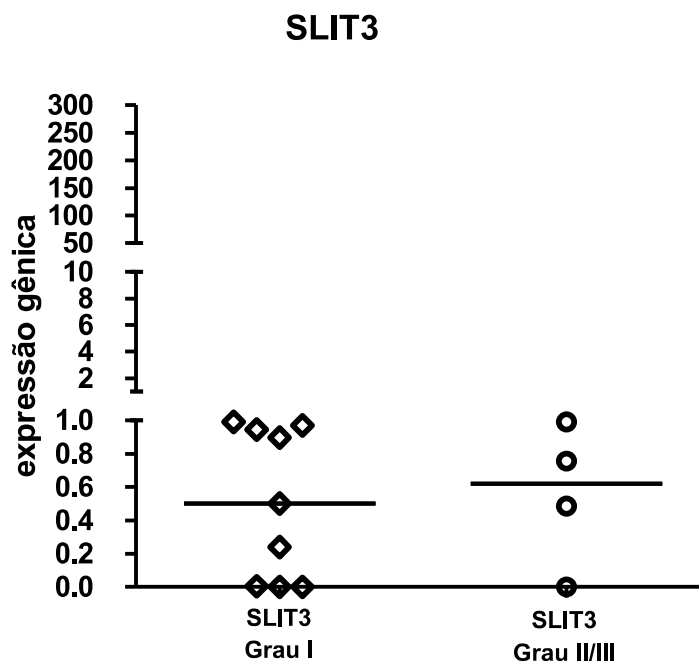
Legenda: Losangos = amostras de CP com DNA de HPV de alto risco (n = 8); Círculos = amostras de CP com DNA de HPV de baixo risco (n = 3). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 18. Níveis de expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) do SLIT3 em amostras de CP com e sem invasão perineural.



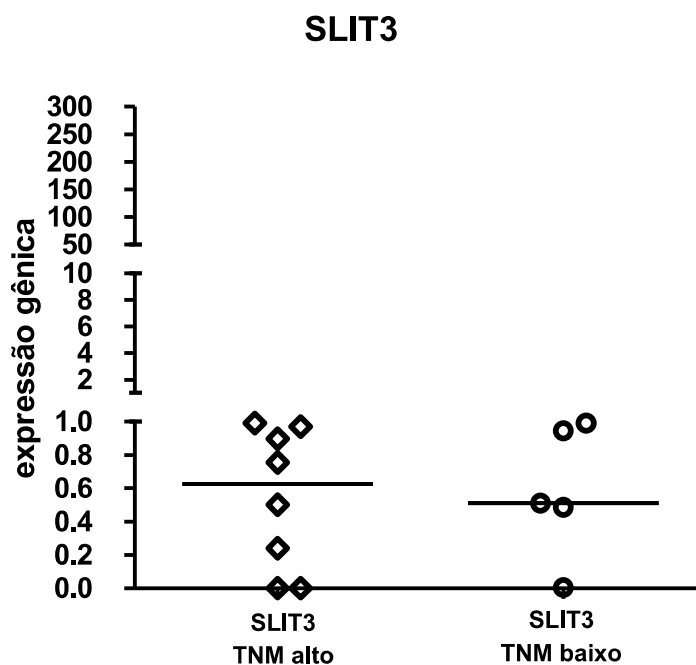
Legenda: Losangos = amostras de CP com invasão perineural (n = 5); Círculos = amostras de CP sem invasão perineural (n = 7). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 19. Níveis de expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) do SLIT3 em amostras de CP com Grau de Broders I e II/III.



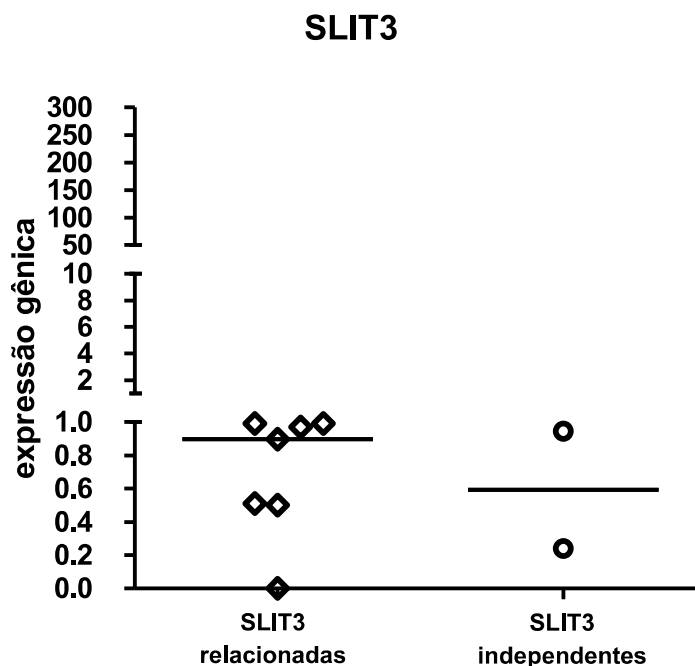
Legenda: Losangos = amostras de CP com Grau de Broders I ($n = 9$); Círculos = amostras de CP Grau de Broders II/III ($n = 4$). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 20. Níveis de expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) do SLIT3 em amostras de CP com TNM alto e baixo.



Legenda: Losangos = amostras de CP com TNM alto ($n = 8$); Círculos = amostras de CP com TNM baixo ($n = 5$). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 21. Níveis de expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) do SLIT3 em amostras de CP relacionadas ou não com os subtipos de HPV.

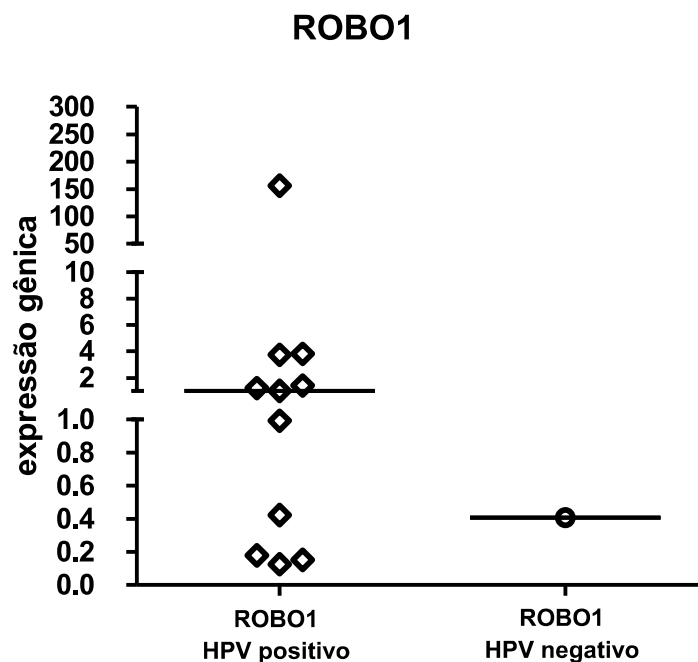


Legenda: Losangos = amostras de CP relacionadas com subtipo de HPV (n = 7); Círculos = amostras de CP independentes do subtipo de HPV (n = 2). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

5.3.4 Níveis de expressão do gene ROBO1 e variáveis clínico-patológicas

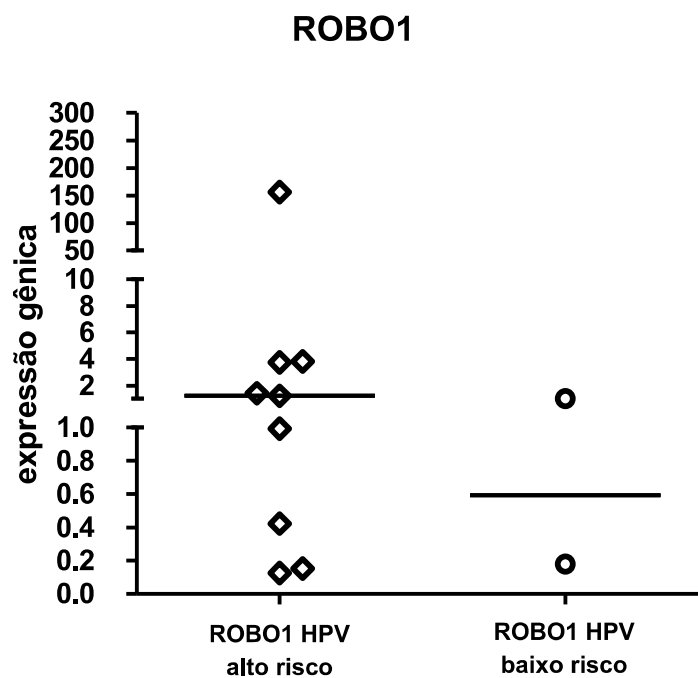
Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os níveis de expressão do ROBO1 e a presença de DNA de HPV, os tipos de HPV presentes, com a presença de invsão perineural e invasão angiolinfática, com o grau histológico, estadiamento TNM nem com os subtipos histológicos presentes ($p > 0,05$ nos Gráficos 22 ao 28).

Gráfico 22. Níveis de expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) do ROBO1 em amostras de CP com DNA de HPV positivo e negativo.



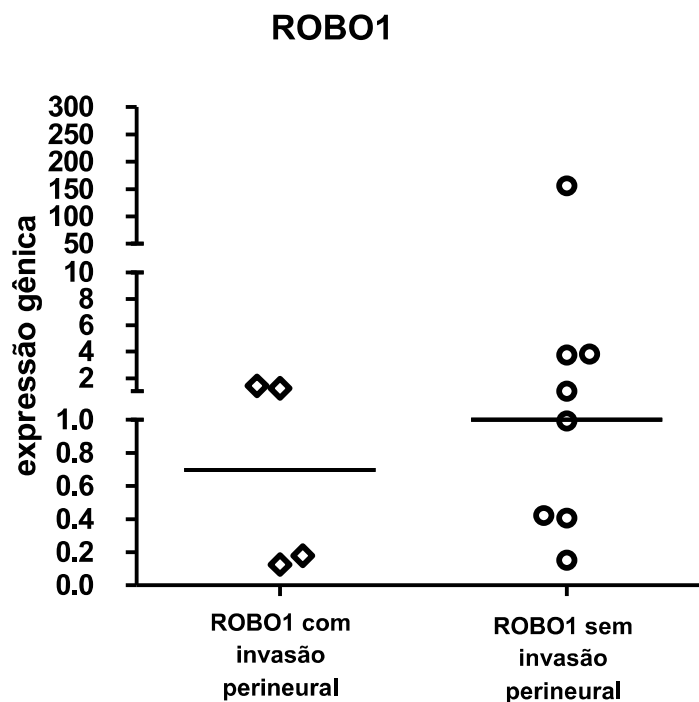
Legenda: Losangos = amostras de CP com DNA de HPV positivo ($n = 11$); Círculos = amostras de CP com DNA de HPV negativo ($n = 1$). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 23. Níveis de expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) do ROBO1 em amostras de CP com DNA de HPV de alto e baixo risco.



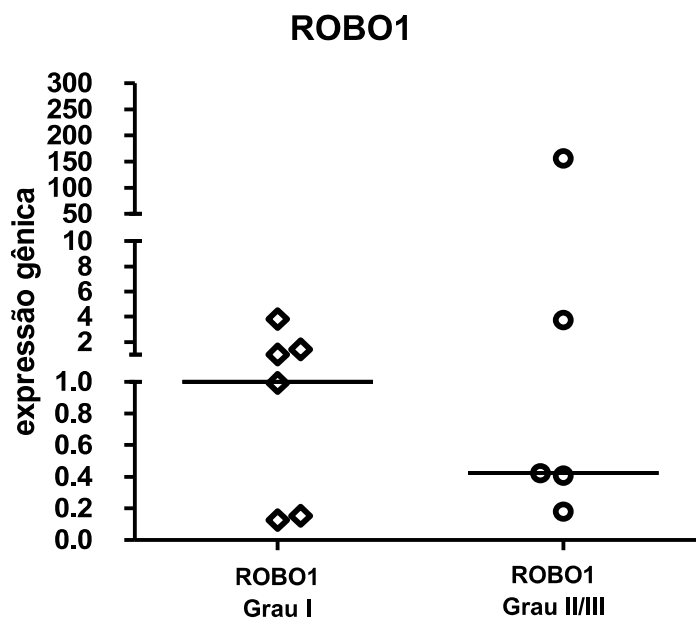
Legenda: Losangos = amostras de CP com DNA de HPV de alto risco ($n = 9$); Círculos = amostras de CP com DNA de HPV de baixo risco ($n = 2$). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 24. Níveis de expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) do ROBO1 em amostras de CP com e sem invasão perineural.



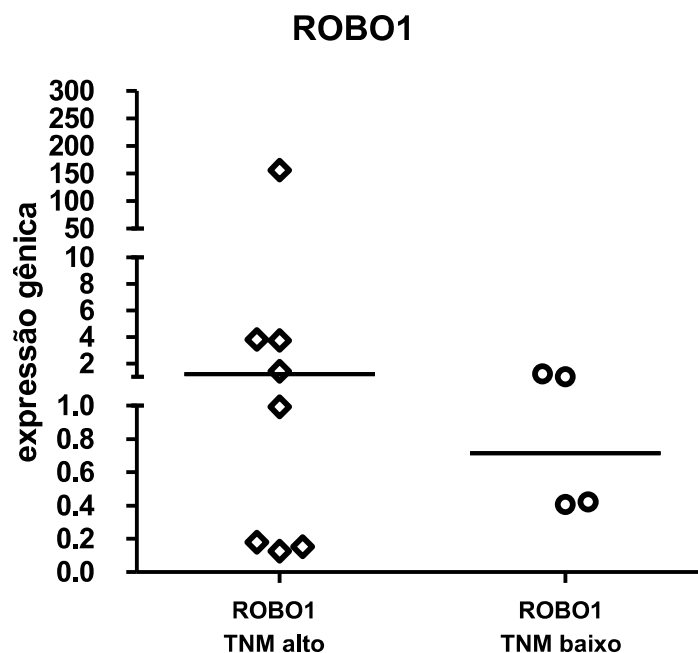
Legenda: Losangos = amostras de CP com invasão perineural ($n = 4$); Círculos = amostras de CP sem invasão perineural ($n = 8$). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 25. Níveis de expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) do ROBO1 em amostras de CP com Grau de Broders I e II/III.



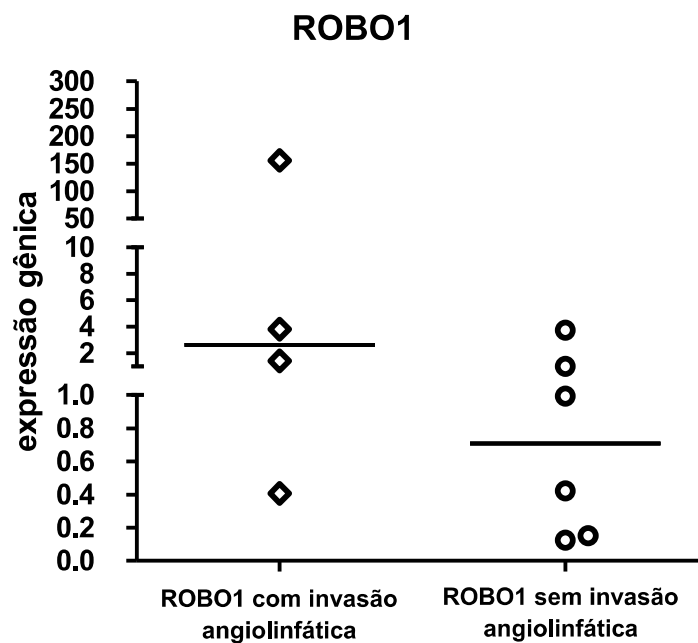
Legenda: Losangos = amostras de CP com Grau de Broders I ($n = 6$); Círculos = amostras de CP Grau de Broders II/III ($n = 5$). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 26. Níveis de expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) do ROBO1 em amostras de CP com TNM alto e baixo.



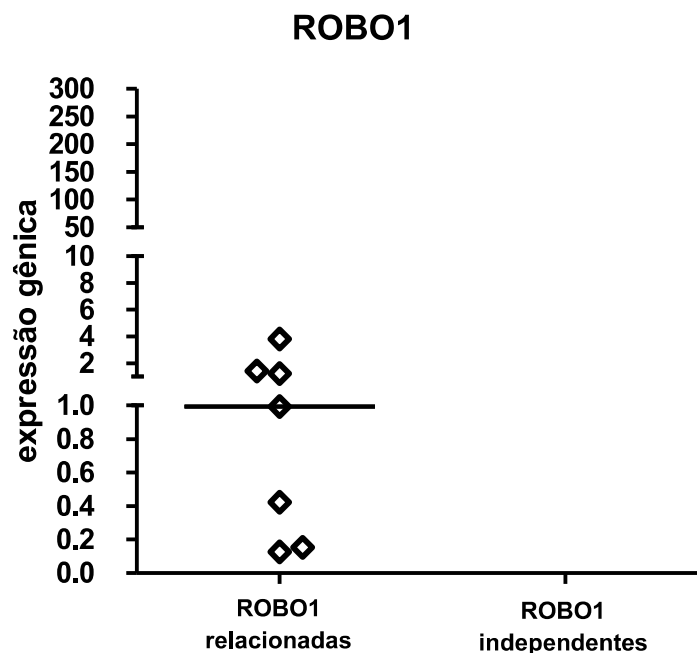
Legenda: Losangos = amostras de CP com TNM alto ($n = 8$); Círculos = amostras de CP com TNM baixo ($n = 4$). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 27. Níveis de expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) do ROBO1 em amostras de CP com e sem invasão angirolinfática.



Legenda: Losangos = amostras de CP com invasão angirolinfática ($n = 4$); Círculos = amostras de CP sem invasão angirolinfática ($n = 6$). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 28. Níveis de expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) do ROBO1 em amostras de CP relacionadas ou não com os subtipos de HPV.

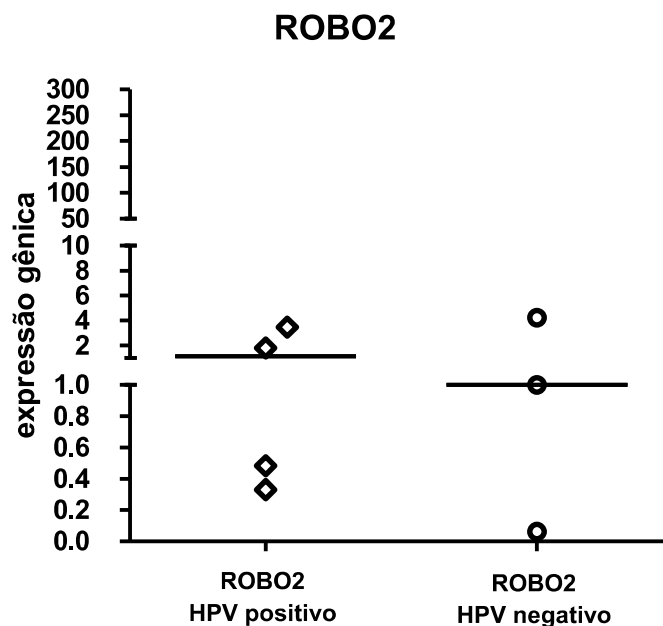


Legenda: Losangos = amostras de CP relacionadas com subtipo de HPV (n = 7); Círculos = amostras de CP independentes do subtipo de HPV (n = 0). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

5.3.5 Níveis de expressão do gene ROBO2 e variáveis clínico-patológicas

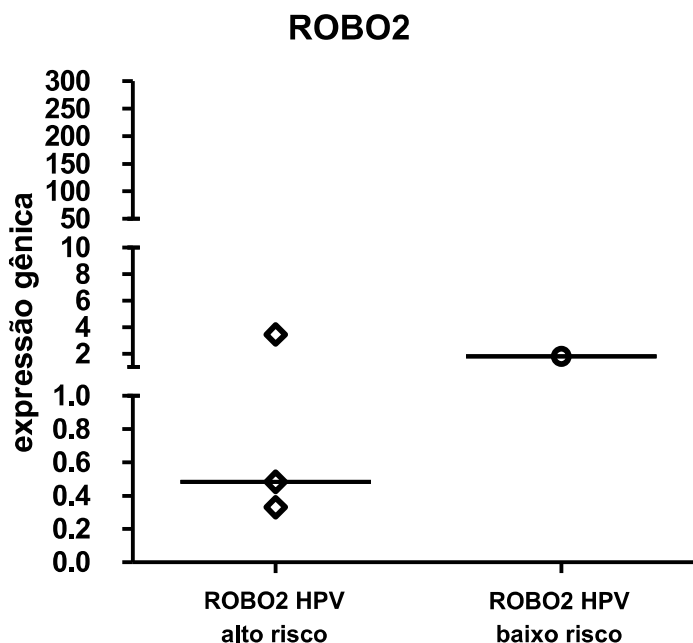
Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os níveis de expressão do ROBO2 e a presença de DNA de HPV, os tipos de HPV presentes, com a presença de invasão perineural, invasão, invasão angiolinfática, com o grau histológico, estadiamento TNM nem com os subtipos histológicos presentes ($p > 0,05$ nos Gráficos 29 ao 35).

Gráfico 29. Níveis de expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) do ROBO2 em amostras de CP com DNA de HPV positivo e negativo.



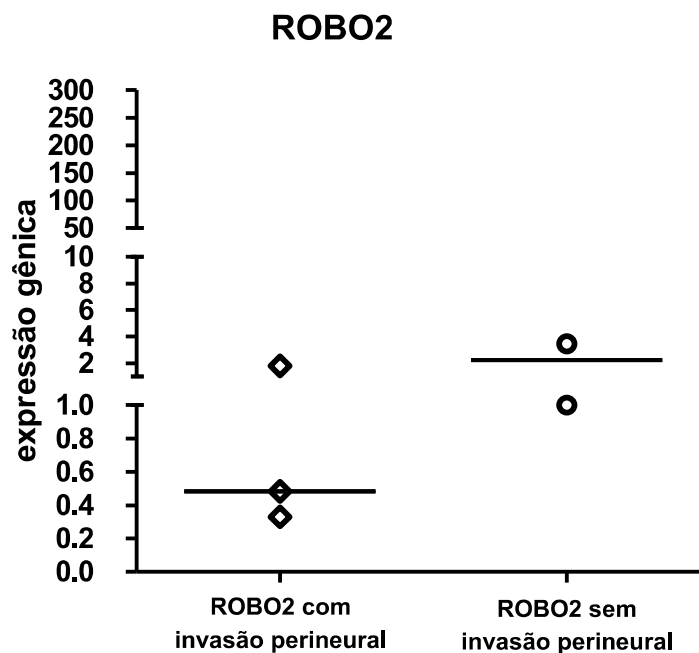
Legenda: Losangos = amostras de CP com DNA de HPV positivo ($n = 4$); Círculos = amostras de CP com DNA de HPV negativo ($n = 3$). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 30. Níveis de expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) do ROBO2 em amostras de CP com DNA de HPV de alto e baixo risco.



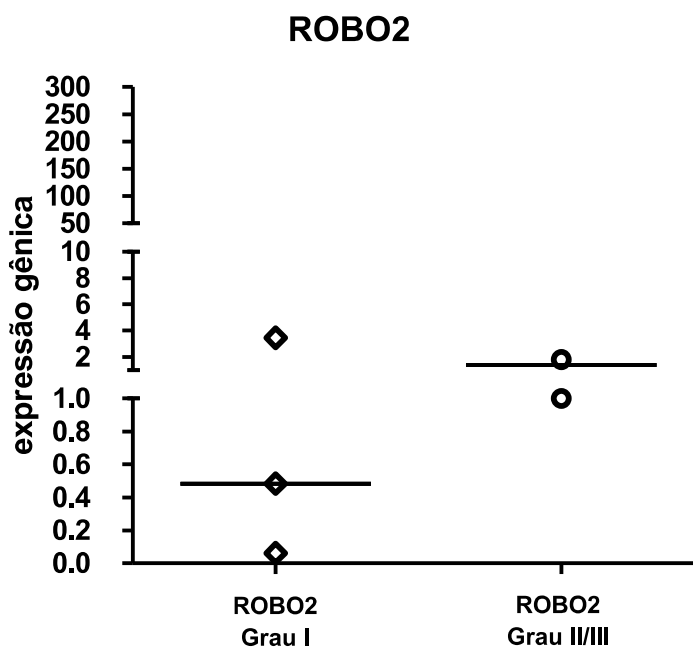
Legenda: Losangos = amostras de CP com DNA de HPV de alto risco ($n = 3$); Círculos = amostras de CP com DNA de HPV de baixo risco ($n = 1$). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 31. Níveis de expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) do ROBO2 em amostras de CP com e sem invasão perineural.



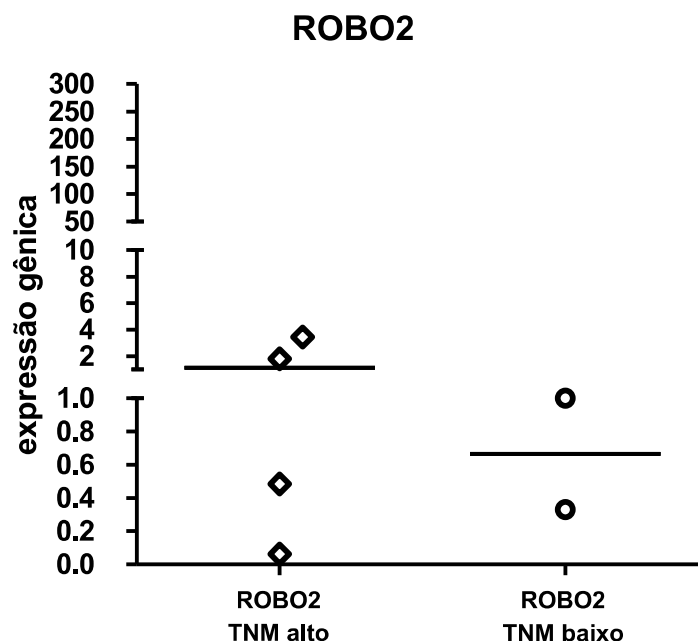
Legenda: Losangos = amostras de CP com invasão perineural ($n = 3$); Círculos = amostras de CP sem invasão perineural ($n = 2$). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 32. Níveis de expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) do ROBO2 em amostras de CP com Grau de Broders I e II/III.



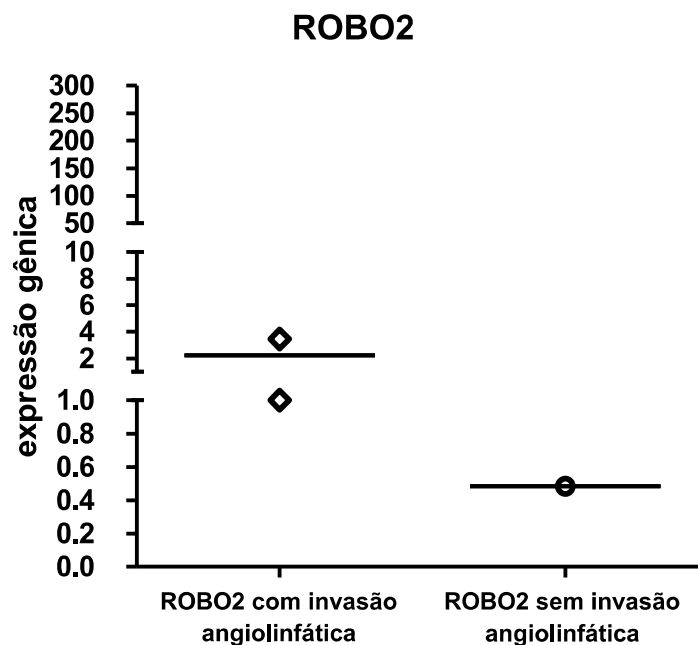
Legenda: Losangos = amostras de CP com Grau de Broders I ($n = 3$); Círculos = amostras de CP Grau de Broders II/III ($n = 2$). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 33. Níveis de expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) do ROBO2 em amostras de CP com TNM alto e baixo.



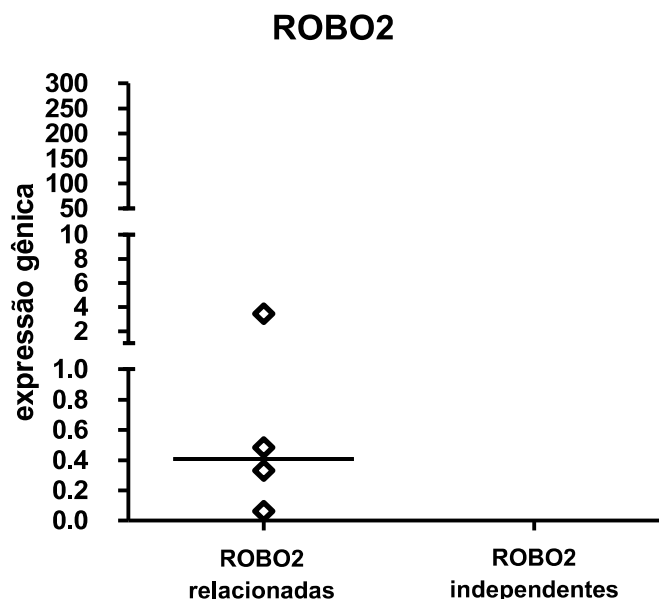
Legenda: Losangos = amostras de CP com TNM alto ($n = 4$); Círculos = amostras de CP com TNM baixo ($n = 2$). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 34. Níveis de expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) do ROBO2 em amostras de CP com e sem invasão angirolinfática.



Legenda: Losangos = amostras de CP com invasão angirolinfática ($n = 2$); Círculos = amostras de CP sem invasão angirolinfática ($n = 1$). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 35. Níveis de expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) do ROBO2 em amostras de CP relacionadas ou não com os subtipos de HPV.

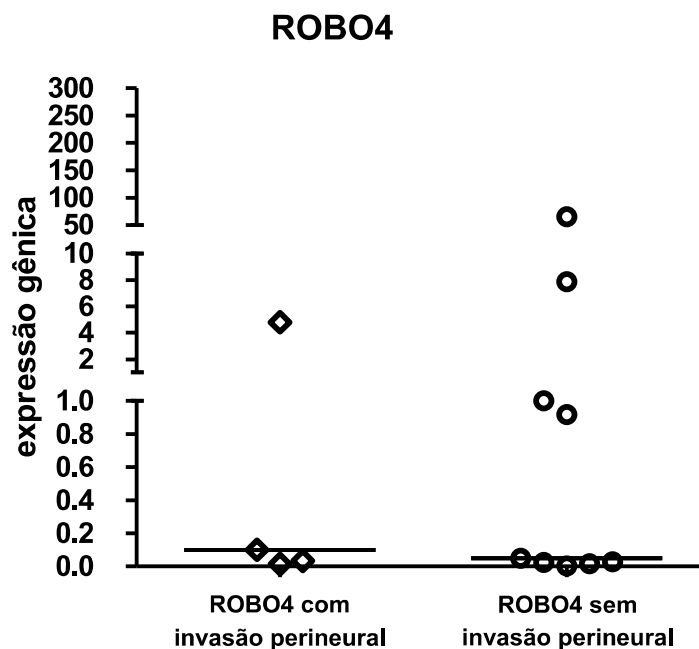


Legenda: Losangos = amostras de CP relacionadas com subtipo de HPV (n = 4); Círculos = amostras de CP independentes do subtipo de HPV (n = 0). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

5.3.6 Níveis de expressão do gene ROBO4 e variáveis clínico-patológicas

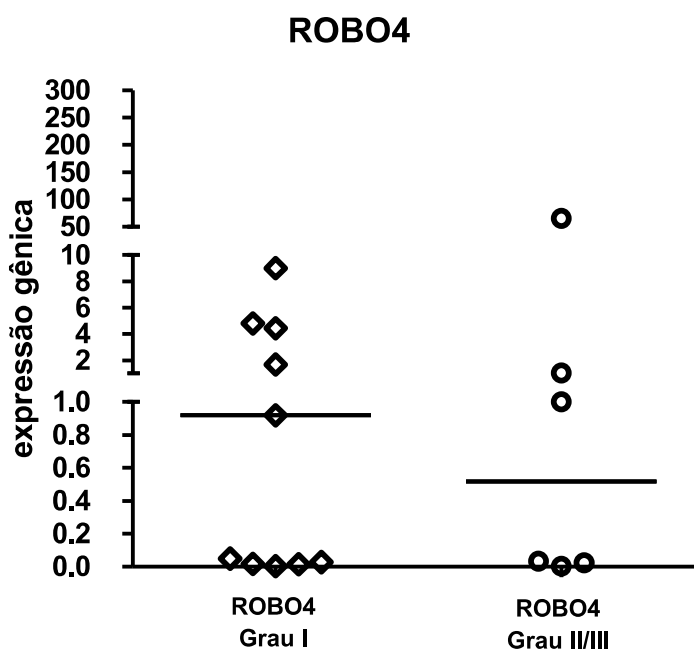
Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os níveis de expressão do ROBO4 e a presença de DNA de HPV, os tipos de HPV presentes, com a presença de invasão perineural, com o grau histológico, estadiamento TNM, nem com os subtipos histológicos presentes ($p > 0,05$ nos Gráficos 36 ao 40 e 42). Foi observada uma associação significativa entre níveis mais elevados de ROBO4 e a presença de invasão angiolinfática ($p = 0,0303$ no teste de Mann-Whitney no Gráfico 41).

Gráfico 38. Níveis de expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) do ROBO4 em amostras de CP com e sem invasão perineural.



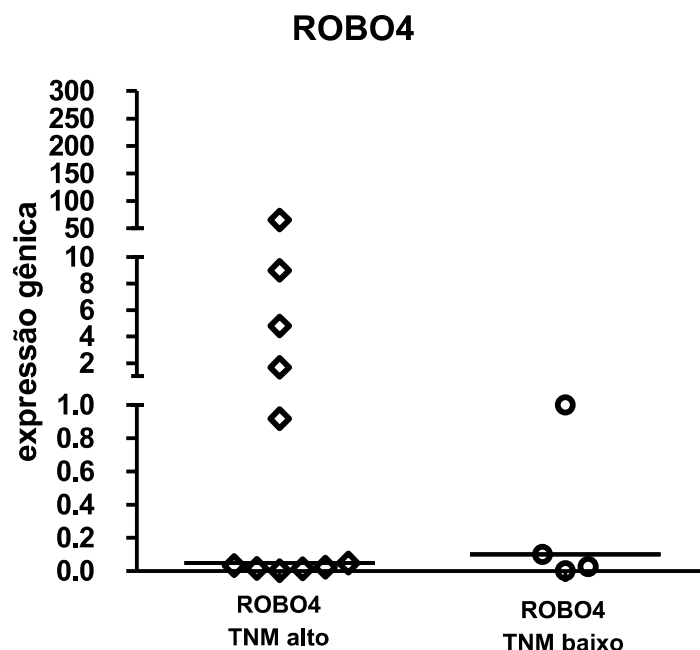
Legenda: Losangos = amostras de CP com invasão perineural ($n = 5$); Círculos = amostras de CP sem invasão perineural ($n = 9$). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 39. Níveis de expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) do ROBO4 em amostras de CP com Grau de Broders I e II/III.



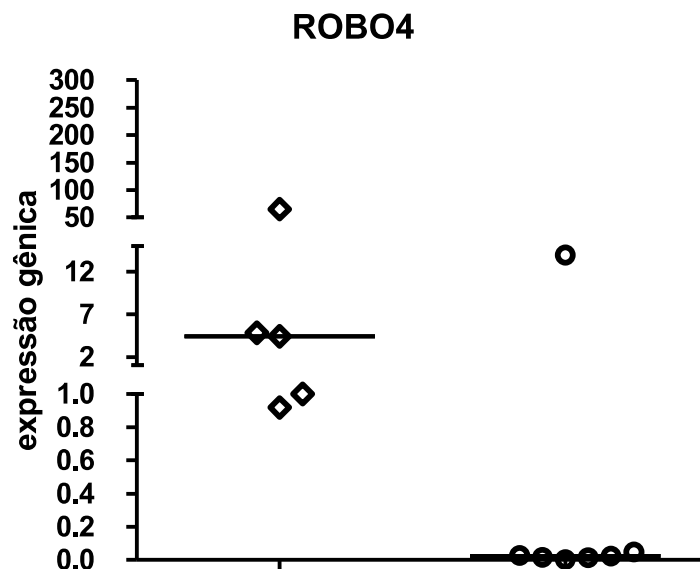
Legenda: Losangos = amostras de CP com Grau de Broders I ($n = 11$); Círculos = amostras de CP Grau de Broders II/III ($n = 6$). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 40. Níveis de expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) do ROBO4 em amostras de CP com TNM alto e baixo.



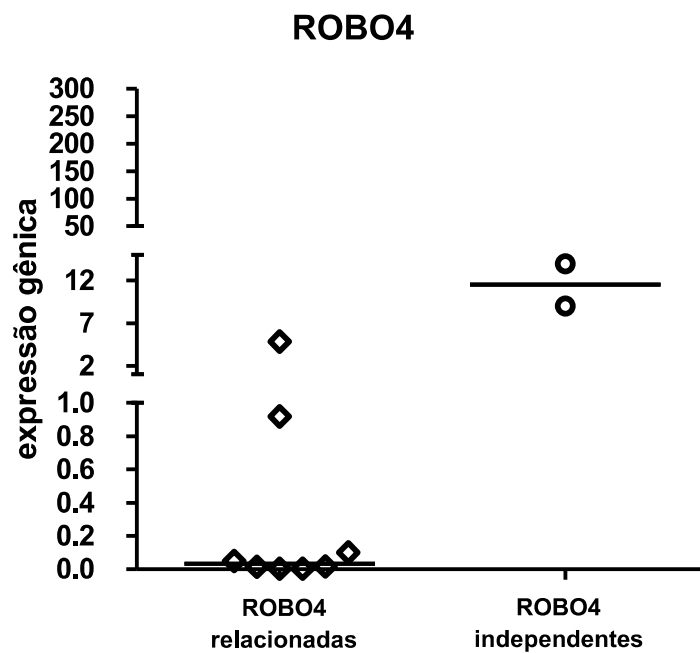
Legenda: Losangos = amostras de CP com TNM alto ($n = 11$); Círculos = amostras de CP com TNM baixo ($n = 5$). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 41. Níveis de expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) do ROBO4 em amostras de CP com e sem invasão angiolinfática.



Legenda: Losangos = amostras de CP com invasão angiolinfática ($n = 5$); Círculos = amostras de CP sem invasão angiolinfática ($n = 7$). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P = 0,0303$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 42. Níveis de expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) do ROBO4 em amostras de CP relacionadas ou não com os subtipos de HPV.



Legenda: Losangos = amostras de CP relacionadas com subtipo de HPV ($n = 8$); Círculos = amostras de CP independentes do subtipo de HPV ($n = 2$). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

6 DISCUSSÃO

O câncer peniano é uma neoplasia que apresenta maior incidência em homens acima de 50 anos de idade, mas que pode atingir pacientes mais novos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). O câncer de pênis tem estreita relação com o grau de desenvolvimento socioeconômico do país: em países caracterizados como subdesenvolvidos, como na Índia, que apresenta a maior incidência mundial, podendo chegar a 3,32 casos a cada 100 mil habitantes; e em países em desenvolvimento, como o Brasil, onde há elevadas taxas de câncer peniano, podendo variar de 3 a 7 casos/100.000 homens.

Desta forma, países sul-americanos e da África do Norte apresentam taxas de câncer de pênis que variam de 6 a 14 casos/100.000 homens. Em Israel, ocorre a menor incidência em judeus, com taxas próximas a zero, e nos Estados Unidos, a incidência é de 0,2 casos para cada 100 mil habitantes (Couto et al. (2014). Estudo realizado em Pernambuco por Couto et al. (2014) demonstrou que 50% dos pacientes era analfabeto e 43,2% tinha apenas a primeira série e somente 6,8% concluíram o colegial.

Araújo et al. (2018), em seu estudo com 183 pacientes, a maioria dos pacientes (51,4%) tinha 60 anos ou mais no momento do diagnóstico do CP. Fimose era relatada por (90,1%) dos participantes. Tumor grau II-III foi observado em 50,2% dos indivíduos, Jackson estágio III-IV em 23,6% dos casos, invasão tumoral profunda (51,9%), metástase inguinal (36,1%), linfadenectomia inguinal (38,8%) e recidiva inguinal pós-cirúrgica em 8,7% dos pacientes. Quanto ao tratamento primário das lesões: penectomia parcial 72,7%, penectomia total em 14,2% e emasculação em 4,4% dos casos. Ainda de acordo com o mesmo estudo, a prevalência de DNA de HPV foi de 30,6% em amostras de tecido de PC embebidas em parafina. O genótipos de alto risco oncogênico foram encontrados em 24,9% dos casos e HPV de baixo risco em 3,8%. Infecção simples foi encontrada em 49 casos de HPV infecção múltipla em sete casos. Entre as amostras positivas para DNA de HPV, o tipo de HPV mais frequente foi o HPV 16 (62,5%) e HPV 18 (5,4%). O HPV 6 e o HPV 11 no total foram responsáveis por aproximadamente 12,4% dos casos de câncer peniano. As variáveis clínicas e patológicas foram submetidas à análise bivariada, com o resultado sendo a

prevalência do HPV-DNA, apenas a variável grau tumoral (II/III) permaneceu associados após análise multivariada. As mesmas variáveis foram analisadas com o desfecho positivo para HPV de alto risco, idade e grau do tumor [II e III] incluído no modelo de análise multivariada, permaneceu estatisticamente associado ao desfecho a variável tumor grau II/III.

Nossos estudos têm resultados semelhantes à presente pesquisa, como o de Paiva (2010), que mostra que a relação entre o grau de escolaridade e as condições socioeconômicas dos indivíduos, como a baixa renda familiar, o consumo de tabaco, os péssimos hábitos de higiene do órgão, a não circuncisão e a demora na busca pelo serviço de saúde, são fatores que contribuem para o desenvolvimento do CP e diagnóstico tardio.

Embora existam estudos relatando que solteiros ou divorciados apresentam maior risco de CP, ainda não há nenhuma evidência voltada para esta associação (TORBRAND et al., 2017). Estes resultados com relação ao quesito estado civil se aproximam dos resultados obtidos no estudo realizado por Couto et al. (2014), em Pernambuco, que evidenciou que 57% dos homens acometidos por câncer de pênis eram casados, 33% solteiros e 10% eram viúvos, em conformidade com o estudo na casuística dos nossos resultados.

Em nossa casuística, podemos identificar que a média de idade dos portadores de CP ocorreu em torno de 60 anos, o que corrobora com o estudo de Miranda (2018) que encontrou em sua pesquisa que, o CP acometia 7% dos homens com idade até 35 anos, e os homens acima de 66 anos representaram 39 % dos portadores de cp. A faixa etária de 60 anos ou mais, em São Luís – MA, está praticamente com o mesmo valor encontrado pelo autor já citado, observando-se um pico em torno de 66 anos de idade. Estas nossas observações e de outros grupos de pesquisas caracterizam o cp como uma doença de desenvolvimento lento que pode ser prevenida em idade jovem e se manifesta em idade mais avançada caso não seja procurado ajuda dos cuidados de saúde (SILVA et al., 2019).

Ressalta-se que no Brasil, no estado do Pará, no ano de 2010, o CP acometeu principalmente homens entre 41 e 70 anos (FONSECA et al., 2010). Enquanto que no

estudo de Reis et al. (2010), em seus resultados foi possível identificar que 22% dos casos de CP ocorreram em homens com idade menor de 40 anos.

De acordo com Miranda (2018), a lesão no prepúcio foi identificada em 7,3%, as lesões da glândula representaram 22,8%, as lesões no corpo do pênis somaram 7,5%, já a lesão sobreposta do pênis representou 3,2%. No entanto, segundo Cubilla (2009), aproximadamente 48% dos casos de câncer de pênis a lesão é diagnosticada na glândula, 21% no prepúcio e 9% em ambas as áreas. No sulco coronal, há em torno de 6% de diagnóstico das lesões. Ainda de acordo com Cubilla (2009), frente ao diagnóstico tardio, a lesão tende a se estender para o prepúcio, com infiltração em tecidos adjacentes, podendo invadir a próstata e bexiga, mas é rara a metástase à distância.

Resultados de um estudo realizado por meio de uma revisão sistemática das bases de dados referenciais LILACS/SciELO (Bireme), publicados até 2012, revelaram que a doença está intimamente relacionada com a ausência de circuncisão e de autoexame, falta de prevenção específica, infecções sexualmente transmissíveis e qualidade de higiene íntima inadequada. Desta forma, fica claro que campanhas educativas podem diminuir a incidência do CP em nosso meio (SYVONEY et al., 2013).

Há evidências de que a circuncisão previne o CP somente se for realizada no período neonatal, visto que o homem que é submetido à circuncisão no período pós-neonatal tem 3,2 vezes mais risco de desenvolver o CP (FAVORITO et al., 2008).

Nas nossas pesquisas, os casos classificados como T2 e T3 representaram a maioria dos pacientes em estudo. Em contrapartida, Couto et al. (2014) constatou no seu estudo, realizado em Pernambuco, que 36,4% e 50% dos pacientes CP apresentou estágio T1 e T2, respectivamente. Resultados semelhantes foram verificados por Paiva (2010), com 83,85% dos estadiamentos do câncer de pênis classificados como T1 e T2. Tais achados diferem da presente pesquisa.

Dentre os pacientes que apresentaram CP, observamos a presença de HPV em 61,84%. Pesquisas realizadas por Reis et al. (2010) demonstram que a infecção pelo HPV pode ser um fator de risco para o aparecimento do CP, assim como a

associação dos HPV 16 e 18 em mais de 50% dos casos. Contudo, em nossas pesquisas, a presença dos genótipos HPV 11 e HPV 16 foi detectada em metade dos 46 pacientes HPV-positivos que foram analisados (Figura 13). Enquanto 40% dos casos apresentaram infecções por um único tipo de HPV, a maioria apresentava infecções múltiplas.

Daling et al. (2005) relatam que determinados subtipos de HPV vêm sendo correlacionados com o CP, em que o condiloma aumenta o risco em 5 a 6 vezes e que, em sua pesquisa, o HPV foi identificado em 70-100% das neoplasias intraepiteliais e em 40-50% dos casos de carcinoma de pênis invasivo.

Bleeker et al. (2002) encontraram o DNA do HPV, principalmente dos tipos de HPV de alto risco, através de PCR em 59% dos *swabs* penianos. Wiener et al. (1995) encontraram 25 tipos de HPV infectando a região genital. HPV 6 e 11 são mais comumente associados a lesões não displásicas, como a presença de verrugas genitais.

Akogbe et al. (2012) descrevem que a maioria das lesões causados por câncer de pênis são HPV-positivas e abrigam predominantemente vários genótipos de HPV (HPV 6, HPV 11 ou HPV 16). Miralles-Guri et al. (2009) relatam que o HPV 16 é, de longe, o genótipo mais comum no câncer de pênis.

Os diversos estudos citados revelam diferentes taxas de infecção pelo HPV, refletindo importantes diferenças geográficas e diferentes métodos de detecção de HPV. Neste contexto destaca-se a importante pesquisa de meta-análise realizada por Olesen et al. (2019), de abrangência mundial, que relata que cerca de 50% das lesões de CP HPV-positivas. Alemany et al. (2016), utilizando amostras de 1000 pacientes do mundo inteiro estimaram a existência de 30% a 50% de casos HPV-positivos.

Na nossa pesquisa, o HPV 11 e 16 foram os genótipos mais frequentes, enquanto Hernandez et al. (2014), ao pesquisaram o DNA do HPV, viram que este estava presente em 50 dos 79 casos (63%) de câncer peniano invasivo. Esta percentagem de casos positivos é claramente superior à média mundial estimada por Alemany et al. (2016) e por Olesen et al. (2019) e deverá ser um importante fator contributivo para a elevada incidência de CP no Maranhão. Dezesesseis genótipos virais

foram detectados. O HPV 16, encontrado em 46% (36/79) de todos os casos (72% dos casos positivos para HPV), foi o genótipo mais prevalente, seguido, igualmente, pelos HPV 18, 33 e 45, cada um dos quais compreendia 5% de todos os casos. Múltiplos genótipos foram detectados em 18% dos casos virais positivos.

O presente estudo é o primeiro no Maranhão a conseguir elucidar os genótipos virais presentes na totalidade das amostras HPV-positivas. Os estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa e de outros grupos maranhenses (COELHO et al., 2018), basearam a sua análise em métodos de sequenciamento de DNA (sequenciamento de Sanger) o que não lhes permitia identificar os tipos virais envolvidos em infecções múltiplas. O nosso estudo superou esta limitação utilizando metodologias baseadas na PCR, através de uma valiosa parceria internacional estabelecida com o Instituto Português de Oncologia do Porto.

O papel etiológico do HPV 16 no CP foi recentemente demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa utilizando um modelo animal de camundongos (MEDEIROS-FONSECA et al., 2020). Por outro lado, o papel desempenhado pelos HPVs de baixo risco oncogênico como o HPV 6 e HPV 11 na carcinogênese peniana continua a ser um tema de debate. Enquanto estes tipos virais se associam sobretudo com condilomas cervicovaginais, os estudos acima citados revelam uma importante percentagem de casos de CP com mono-infecções por HPV 6 ou HPV 11.

Yugawa e Kiyono (2009) já enfatizavam que exposição recorrente do tecido peniano ao HPV leva à integração do DNA do HPV ao genoma do hospedeiro e eventual transformação da célula hospedeira em um fenótipo maligno. Diante do exposto, Kristiansen et al. (2019) descreves como fator de risco para o câncer de pênis a presença de doenças inflamatórias da pele, como líquen plano, uso de drogas imunossupressoras, procedimentos cirúrgicos penianos prévios, história de balanite ou verrugas genitais.

Thomas et al. (2021) também relataram como fatores de risco a ausência de circuncisão infantil, fimose, inflamação crônica, má higiene peniana, tabagismo, imunossupressão e infecção pelo HPV. Contudo, em nossa pesquisa, verificamos, na Tabela 7, que não houve correlação, visto que a prática de se higienizar foi mais frequente em pacientes HPV-positivos.

Além disso, nossa amostra de pacientes HPV-negativos apresentou o maior percentual de invasão angiolinfática (75%). Contudo, as pesquisas divergem ao discutir a invasão angiolinfática como fator preditivo de metástase. Hughes et al. (2010) e Diorio et al. (2016) sugerem haver relação, enquanto De Paula et al. (2007) apontam que a invasão angiolinfática não se caracteriza como fator de metástase linfonodal. Nenhuma relação significativa foi encontrada em nosso estudo, reforçando a necessidade de estudos adicionais sobre este assunto.

É reconhecido que o homem utiliza e frequenta menos os serviços disponíveis na Atenção Básica, se comparado com o segmento feminino. As razões para tal comportamento se deve a vários fatores que levam ao aumento da morbidade e mortalidade masculina por causas preveníveis e evitáveis (SILVA et al., 2013). Entre as causas apontadas pelo retardo na busca pelos serviços de saúde estão a negligência pelo autocuidado, gerada pelo medo, vergonha e insegurança, e a falta de orientação por parte dos profissionais em relação ao tratamento, como a crucial penectomia total e a retirada de órgãos adjacentes (SILVA et al., 2014).

A via de sinalização do SLIT/ROBO foi agora estudada pela primeira vez em CP, tendo sido obtidos resultados quanto à expressão de dois ligantes SLIT (SLIT2 e SLIT3) e de três receptores ROBO (ROBO1, ROBO2 e ROBO4). Não foram realizadas reações de PCR em tempo real bem-sucedidas para os genes SLIT1 e ROBO3, requerendo a preparação de pares de *primers* alternativos.

Em geral, os níveis de expressão observados para os 5 genes foram baixos, com valores de CT superiores a 30. Em uma primeira análise, comparamos os níveis de expressão gênica em amostras tumorais e em amostras de tecido sadio, não tendo observado diferenças significativas entre os dois grupos. Esta observação pode indicar que esta via de sinalização não é desregulada durante o processo de carcinogênese peniana ou pode refletir uma alteração diferente da expressão gênica em populações celulares diferentes (por exemplo, em células tumorais e estromais), levando a uma manutenção dos níveis de expressão no tecido como um todo. Esta possibilidade poderá ser testada através de estudos imunohistoquímicos ou de imunofluorescência, que permitam determinar a distribuição dos produtos gênicos nos tecidos de CP.

Este tipo de fenômeno foi descrito em outros tipos de câncer como o adenocarcinoma pancreático ductal (PDAC), em que foi analisado a expressão de genes da via SLIT/ROBO em todo o tecido, onde pode-se observar uma perda progressiva de ROBO2 no epitélio, um aumento progressivo em ROBO1 no estroma e nenhuma alteração na expressão de mRNA de ROBO3 ao comparar sequencialmente pâncreas de camundongo normal, modelo de metaplasia acinar-ductal e um modelo de camundongo geneticamente modificado de PDAC. Além disso a baixa expressão de mRNA do ROBO2 foi associada a baixa sobrevida do paciente (PINHO et al., 2018).

Em seguida, procuramos estudar a relação dos níveis de expressão de cada gene com a presença ou ausência de DNA de HPV e com os subtipos presentes (alto risco versus baixo risco). De fato, Barzon et al. (2014) observaram uma marcada hipermetilação da região promotora do gene SLIT2 em CP HPV-positivo, sugerindo uma redução da expressão daquele gene nas lesões HPV-positivas. No entanto, não foi possível observar qualquer diferença entre as lesões HPV-positivas e HPV-negativas nem entre lesões contendo HPV de alto risco e aquelas apenas com HPV de baixo risco. Esta última análise é limitada no seu poder estatístico pelo baixo número de amostras com HPV de baixo risco, requerendo estudos adicionais.

Os níveis de expressão de cada gene foram também correlacionados com os subtipos histológicos, agrupados como relacionados com HPV e independentes de HPV (CHAUX et al., 2012). Esta foi uma forma alternativa de testar uma possível associação entre cada gene e o HPV. Também nesta abordagem não foram observadas associações com o HPV, sugerindo que os níveis de SLIT/ROBO no CP não dependem da ação do HPV, variando de forma idêntica nas lesões HPV-positivas e HPV-negativas.

A expressão de componentes da via SLIT/ROBO foi associada com o comportamento biológico de vários tipos de câncer (LI et al., 2021). Assim, procuramos testar possíveis associações entre os níveis de expressão de cada gene e importantes variáveis clínico-patológicas relacionadas com o prognóstico dos pacientes, como o grau histológico, o estágio TNM e a presença de invasão perineural e angiolímfática.

No conjunto de resultados obtidos, destaca-se a associação estatisticamente significativa entre os níveis de expressão de SLIT2 e a presença de invasão perineural. Esta é uma importante observação uma vez que a invasão perineural contribui decisivamente para a progressão do CP e o prognóstico dos pacientes, sugerindo que o SLIT2 pode ser um marcador de prognóstico útil. O papel do SLIT2 na invasão perineural pode ser explicado pela sua atuação no desenvolvimento dos nervos como observado no estudo de Nones et al. (2014), que descobriram que a via de sinalização SLIT/ROBO, possui alterações de metilação em 48% dos pacientes que apresentaram câncer de pâncreas demonstrado por sequenciamento genômico de amostras de câncer de pâncreas. Enquanto que no estudo de Gohrig et al. (2014), os mesmos descobriram que o RNA mensageiro (mRNA) de SLIT2 está regulado negativamente no câncer de pâncreas e está associado com metástase linfonodal.

Em um outro estudo realizado em modelo de camundongos de câncer pancreático, a alta expressão de SLIT2 pode inibir o crescimento de tumores do pâncreas, reduzir seu volume, inibir a invasão tumoral e duodeno e inibir metástase linfática, metástase à distância e angiogêneses tumoral. Os autores também observaram que a expressão de SLIT2 pode inibir a capacidade de invasão de tumores pancreáticos aos nervos periféricos (GOHRIG et al., 2014).

Outra importante observação foi a associação significativa entre os níveis de expressão de ROBO4 e a presença de invasão angiolinfática, mais uma vez sugerindo o seu potencial uso como marcador de prognóstico. O papel do ROBO4 na biologia do endotélio está bem estabelecido uma vez que ROBO4 é um marcador endotelial tumoral expresso na rede vascular de vários tecidos tumorais. No entanto, o papel que ROBO4 desempenha no câncer de próstata não está bem estabelecido (KOOHINI et al., 2018).

No entanto, um estudo realizado por Pircher et al. (2019) com análise de imuno-histoquímica com 95 pacientes que foram submetidos a prostatectomia radical revelou expressão elevada de ROBO4 bem como sua proteína ligante SLIT2 em tecido doente quando comparado com tecido sadio, podendo estar presente tanto no estroma tumoral quanto em células epiteliais circundante. Em estágios avançados do câncer de próstata foi observada uma tendência que gerou uma hipótese de que o aumento de ROBO4 e SLIT2 está associado ao retardo menor recorrência tumoral (recidiva do

tumor) quando foi comparado com as amostras dos pacientes que apresentaram baixa expressão desta via de sinalização, revelando assim um papel protetor de ROBO4. E ainda o mesmo estudo aponta que quanto maior grau histológico do tumor foi associado com maiores níveis de expressão de ROBO4. Estas observações contraditórias indicam a necessidade de estudos mais aprofundados do papel desta via de sinalização no câncer.

O nosso estudo tem como limitação a necessidade de um número maior de pacientes, prontuários preenchidos de forma completa e sem lacunas de dados clínicos e patológicos dos pacientes, bem como uma resposta fidedigna dos pacientes quando realizadas as perguntas presentes no questionário sociodemográfico, a fim de que possamos obter resultados verdadeiros e significativos.

O nosso estudo abre importantes perspectivas futuras para a biologia do câncer e o estudo da via SLIT/ROBO. Para tal, é relevante que possamos ter mais casos clínicos, bem como fazer uso de modelos in vivo e in vitro de câncer de pênis (MEDEIROS-FONSECA et al., 2021), de forma a poder modificar a expressão destes genes de forma experimental. Essas novas abordagens poderão permitir buscar terapias menos agressiva no tratamento do câncer de pênis como, por exemplo, buscar uma terapia moduladora da via SLIT/ROBO oferecendo aos pacientes com essa patologia melhor prognóstico, bem como aumento da sobrevida, perspectiva e qualidade de vida.

Apesar dos esforços terapêuticos, não podemos perder de vista a necessidade de prevenir o CP, através da adesão 100% nas campanhas de vacinação para o HPV, adesão a higiene do membro com água e sabão, bem como a adesão às restantes medidas preventivas deste e de outros tipos de câncer (SOUZA et al., 2021).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O perfil dos pacientes foi: homens com idade de 60 anos ou mais, de baixa escolaridade, que residiam no interior do Estado do Maranhão, que nunca haviam realizado a circuncisão, contribuindo para o desenvolvimento do CP. O aparecimento da lesão ocorreu na glândula do pênis no momento do diagnóstico. O subtipo histológico mais comum em nosso estudo foi o condilomatoso e o usual, sendo esses subtipos associados a presença do HPV, sendo de baixo e alto risco, respectivamente. Diante dessa evidência, torna-se necessária a investigação pela qual o HPV pode causar CEC.

Em relação à classificação TNM, o que mais prevaleceu foi T2 e T3, referindo que o tumor atingiu mais o corpo cavernoso e esponjoso do pênis. Em relação ao grau histológico, o que mais evidenciou foi o grau de Broders I e II. A falta de informação dificulta o acesso ao serviço de saúde, o que retarda o diagnóstico precoce, por isso a importância de desenvolver políticas públicas voltadas para a população masculina. Ademais, houve diferença significativa com os dados histopatológicos da presença do DNA do HPV quando à higiene foi associada com a invasão angiolinfática.

A maioria dos pacientes apresentou HPV positivo e, destes, quando genotipados, a maioria apresentou infecções múltiplas. Entretanto, este é um dado importante, uma vez que o paciente pode ser infectado por mais de um tipo de HPV, podendo ele ser de baixo ou alto risco. Apesar da baixa incidência do câncer de pênis no mundo, sua relevância é constituída principalmente pelas repercussões psicossociais e pela sua evitabilidade com medidas simples de higiene íntima, uso de preservativo e vacinação contra o Papiloma Vírus Humano.

Assim, a prevenção do câncer de pênis está relacionada ao autocuidado, e isto inclui a responsabilidade pela higiene íntima diária, presença de sinais e sintomas clínicos, busca dos serviços de saúde de forma precoce, entre outros fatores. Além disso, para que seu prognóstico seja favorável, faz-se necessário depender da precocidade do diagnóstico. Diante disso, é essencial que o homem conheça seus direitos dentro das políticas de Saúde Públicas, como a Política Nacional Integral à Saúde do Homem, que visa promover ações de saúde nos diversos contextos socioculturais e político-econômicos, revelando que o homem é um indivíduo singular,

que precisa conhecer seus direitos e deveres para que possa usufruir de uma expectativa de vida maior e redução dos índices de morbimortalidade por causas preveníveis e evitáveis nessa população.

Além disso, pacientes que apresentaram redução da expressão do SLIT2 apresentaram associação estatística significativas quando associado com a invasão perineural, o resultado reforça dados na literatura de que a via está relacionada com a orientação axonal (HAN et al., 2012; GU et al., 2015). Por outro lado, níveis mais elevados de ROBO4 estão associados com a presença de invasão angiolinfática.

Em pacientes infectados pelo HPV, essa associação deve receber atenção por parte do profissional de saúde para fins de diagnósticos, prognósticos e terapêuticos. Maiores estudos devem ser realizados para estreitar ainda mais esta associação, bem como, melhorar o entendimento sobre os mecanismos de interferência destes genes da via SLIT/ROBO na progressão e comportamento tumoral.

Quanto a presença da via SLIT/ ROBO no câncer de pênis, podemos dizer que não houve associação desta via com os tecidos tumoral e tecido sadios, bem como não foi possível associar com a presença ou ausência de DNA de HPV e nem com o subtipo histológico. Entretanto, houve uma associação significativa com os dados clínicos-patológicos onde os níveis de expressão genica da glicoproteína SLIT2 associa-se com a invasão perineural e os níveis de expressão gênica do receptor ROBO4 associa-se fortemente com a invasão angiolinfática, sugerindo o potencial destes como marcadores de agressividade tumoral. Ademais, não foi possível verificar correlações desta via de sinalização SLIT/ROBO com outras variáveis clínico-patológicas.

REFERÊNCIAS

AC CAMARGO Câncer Center. **Tudo sobre o câncer**. São Paulo, 2017. Disponível em: <<http://www.accamargo.org.br/tudo-sobre-o-cancer>>. Acesso em: 29 set 2016.

ADORNO, A. F., et al. A utilidade da captura híbrida para o HPV de alto risco em pacientes com atipia de células escamosas na colpocitologia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 56, [s.n.], p. 1-6, 2020.

AITA, G. A. **Características clinicopatológicas e fatores prognósticos em portadores de Câncer de Pênis com linfonodos negativos submetidos ou não a linfadenectomia inguinal**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Fundação Antônio Prudente. São Paulo, 2014.

AKOGBE, G. O., et al. Race and prevalence of human papillomavirus infection among men residing in Brazil, Mexico and the United States. **International Journal of Cancer**, [s.l.], v. 131, n. 3, p. E282-E291, 2012.

ALBERSEN, M.; SPIESS, P. E. Editorial: penile cancer. **Current Opinion in Urology**, [s.l.], v. 29, n. 2, p. 143-144, mar, 2019.

ALEMANY, L.; CUBILLA, A.; HALEC, G.; KASAMATSU, E.; QUIROS, B.; MASFERRER, E., et al. Role of Human Papillomavirus in penile carcinomas worldwide. **European Urology**, Barcelona, v. 69, n. 5, p. 953-961, 2016.

AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). **Breast Cancer Facts & Figures 2015-2016**. Atlanta: American Cancer Society, 2015.

ANDRADE, B. S. **Câncer de pênis: aspectos epidemiológicos, psicológicos e estratégias de prevenção**. Monografia (Graduação em Enfermagem) – Centro Universitário AGES. Paripiranga, 2021.

ARAÚJO, D. F., et al. Análise de toxicidade hematológica e bioquímica da quimioterapia em mulheres diagnosticadas com câncer do colo do útero. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 56, [s.n.], p. 1-6, 2020.

AUDENET, F.; SFAKIANOS, J. P. Psychosocial impact of penile carcinoma. **Translational Andrology and Urology**, [s.l.], v. 6, n. 5, p. 874-878, out, 2017.

BAILÓN, C. M., et al. Human papillomavirus genotypes and P16INK4A expression in squamous penile carcinoma in Mexican patients. **BMC Infectious Diseases**, [s.l.], v. 19, n. 1, p. 1-8, 2019.

BALLARD, M. S.; HINCK, L. A Roundabout way to cancer. **Advances in Cancer Research**, [s.l.], v. 114, [s.n.], p. 187-235, 2012.

BASTOS, M. M. S. M., et al. HPV16 induces penile intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma in transgenic mice: first mouse model for HPV-related penile cancer. **Journal of Pathology**, [s.l.], v. 251, n. 4, p. 411-419, 2020.

BLEEKER, M., et al. Penile cancer: epidemiology, pathogenesis and prevention. **World Journal of Urology**, Amsterdam, v. 27, n. 2, p. 141-150, 2009.

BLEEKER, M. C., et al. Penile lesions and human papillomavirus in male sexual partners of women with cervical intraepithelial neoplasia. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [s.l.], v. 47, n. 3, p. 351-357, 2002.

BONFIM, S. B. A. **Situação da mortalidade por câncer de pênis no Estado do Maranhão**. Monografia (Graduação em Enfermagem) – Universidade Federal do Maranhão. São Luís, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Informática do SUS (DATASUS). Informações de

Saúde (TABNET). **Assistência à Saúde**. Brasília: DATASUS, 2019. Disponível em: <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0202>>. Acesso em: 20 abr 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Tipos de câncer: colorretal**. Brasília: Ministério da Saúde, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. **Perfil da morbimortalidade masculina no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2018.

BROSE, K.; TESSIER-LAVIGNE, M. Slit proteins: key regulators of axon guidance, axonal branching and cell migration. **Current Opinion in Neurobiology**, [s.l.], v. 10, n. 1, p. 95-102, 2000.

BUSKWOFIE, A.; DAVID-WEST, G.; CLARE, C. A. A review of cervical cancer: incidence and disparities. **Journal of the National Medical Association**, [s.l.], v. 112, n. 2, p. 229-232, 2020.

CARDONA, C. E. M.; GARCÍA-PERDOMO, H. A. Incidence of penile cancer worldwide: systematic review and meta-analysis. **Revista Panamericana de Salud Pública**, [s.l.], v. 41, n. 12, p. e117, abr, 2018.

CARVALHO, K. F.; COSTA, L. M. O.; FRANÇA, R. F. A relação entre HPV e câncer de colo de útero: um panorama a partir da produção bibliográfica da área. **Revista Saúde em Foco**, [s.l.], v. 11, n. 5, p. 1-15, 2019.

CARVALHO, N. S., et al. Associação entre HPV e câncer peniano: revisão de literatura. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, [s.l.], v. 19, n. 2, p. 92-95, 2007.

CASTELLSAGUÉ, X., et al. Male circumcision, penile human papillomavirus infection, and cervical cancer in female partners. **New England Journal of Medicine**, [s.l.], v. 346, n. 15, p. 1105-1112, 2002.

CHAHOU, J.; KOHLI, M.; SPIESS, P. E. Management of advanced penile cancer. **Mayo Clinic Proceedings**, [s.l.], v. 96, n. 3, p. 720-732, mar, 2021.

CHAUX, A.; CUBILLA, A. L. The role of human papillomavirus infection in the pathogenesis of penile squamous cell carcinomas. **Seminars in Diagnostic Pathology**, [s.l.], v. 29, n. 2, p. 67-71, 2012.

CHOW, L. T.; BROKER, T. R.; STEINBERG, B.M. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. **APMIS**, [s.l.], v. 118, n. 6-7, p. 422-449, 2010.

CLARO, I. B.; LIMA, L. D.; ALMEIDA, P. F. Diretrizes, estratégias de prevenção e rastreamento do câncer do colo do útero: as experiências do Brasil e do Chile. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 10, p. 4497-4509, 2021.

COELHO, E. B. S.; SCHWARZ, E.; BOLSONI, C. C.; CONCEIÇÃO, T. B. **Política nacional de atenção integral a saúde do homem**. Florianópolis: UFSC, 2018.

COELHO, R. W. P., et al. Penile cancer in Maranhão, Northeast Brazil: the highest incidence globally? **BMC Urology**, [s.l.], v.18, n. 1, p. 1-7, mai, 2018.

COLARES, W. T. H. C., et al. Análise clínico-epidemiológica do câncer de colo uterino em Manaus: relação entre faixa etária e estadiamento. **Brazilian Journal of Health Review**, [s.l.], v. 3, n. 6, p. 16510-16517, 2020.

COLBERG, C., et al. Epidemiologie des peniskarzinoms. Epidemiology of penile cancer. **Der Urologe**, German, v. 57, n. 4, p. 408-412, abr, 2018.

COSTA, R. H. F., et al. Análise das imunizações contra o Papiloma Vírus Humano (HPV) no estado do Piauí. **Research, Society and Development**, [s.l.], v. 9, n. 7, p. e869974715-e869974715, 2020.

- COUTO, T. C., et al. Epidemiological study of penile cancer in Pernambuco: experience of two reference centers. **International Brazilian Journal of Urology**, Pernambuco, v. 40, n. 6, p. 738-744, 2014.
- CUBILLA A. L., et al. Members of the ISUP Penile Tumor Panel. The World Health Organization 2016 classification of penile carcinomas: a review and update from the International Society of Urological Pathology expert-driven recommendations. **Histopathology**, [s.l.], v. 72, n. 6, p. 893-904, mai, 2018.
- CUBILLA, A. L. The role of pathologic prognostic factors in squamous cell carcinoma of the penis. **World Journal of Urology**, [s.l.], v. 27, n. 2, p. 169-177, 2009.
- CUBILLA, A. L., et al. The variegated morphology of HPV-related neoplasms of the penis. **Oncology (Williston Park)**, New York, v. 30, n. 3, p. 253-256, mar, 2016.
- DAI, C. F., et al. Expression and roles of Slit/Robo in human ovarian cancer. **Histochemistry and Cell Biology**, [s.l.], v. 135, n. 5, p. 475-485, 2011
- DALING, J. R., et al. Penile cancer: importance of circumcision, human papillomavirus and smoking in situ and invasive disease. **International Journal of Cancer**, [s.l.], v. 116, n. 4, p. 606-616, 2005.
- DENK, A. E., et al. Slit3 inhibits activator protein 1-mediated migration of malignant melanoma cells. **International Journal of Molecular Medicine**, [s.l.], v. 28, n. 5, p. 721-726, 2011.
- DICKINSON, R. E., et al. Glucocorticoid regulation of SLIT/ROBO tumour suppressor genes in the ovarian surface epithelium and ovarian cancer cells. **PloS One**, v. 6, n. 11, p. e27792, 2011.
- DILLNER, J., et al. Etiology of squamous cell carcinoma of the penis. **Scandinavian Journal of Urology and Nephrology**, [s.l.], v. 34, n. 205, p. 189-193, 2000.
- DJAJADININGRAT, R. S., et al. Contemporary management of regional nodes in penile cancer – improvement of survival?. **The Journal of Urology**, v. 191, n. 1, p. 68-73, jan, 2014.
- DOUGLAWI, A.; MASTERSON, T. A. Penile cancer epidemiology and risk factors: a contemporary review. **Current Opinion in Urology**, Indianapolis, v. 29, n. 2, p. 145-149, 2019.
- ERBERSDOBLER, A. Pathologie und histopathologische begutachtung des peniskarzinoms. Pathology and histopathological evaluation of penile cancer. **Der Urologe**, German, v. 57, n. 4, p. 391-397, abr, 2018.
- FAVORITO, L. A., et al. Epidemiologic study on penile cancer in Brazil. **International Brazilian Journal of Urology**, [s.l.], v. 34, n. 5, p. 587-593, 2008.
- FENG, Y., et al. srGAP1 mediates the migration inhibition effect of Slit2-Robo1 in colorectal cancer. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 35, n. 1, p. 1-10, 2016.
- FERLAY, J., et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, [s.l.], v. 136, n. 5, p. E359-E386, 2015.
- FERRÁNDIZ-PULIDO, C., TORRES, I.; GARCÍA-PATOS, V. Penile squamous cell carcinoma. **Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)**, [s.l.], v. 103, n. 6, p. 478-487, 2012.
- FONSECA, A. G., et al. Câncer de pênis: estudo epidemiológico no estado do Pará. **Revista Paraense de Medicina**, [s.l.], v. 14, n. 1, p. 11-16, 2011.
- GARA, R. K., et al. Slit/Robo pathway: a promising therapeutic target for cancer. **Drug Discovery Today**, [s.l.], v. 20, n. 1, p. 156-164, 2015.
- GARCÍA-TAMAYO, J.; MOLINA, J.; BLASCO-OLAETXEA, E. El virus del papiloma humano y el cáncer cervical: Una revisión de la historia actualizada sobre la investigación del cáncer del cuello uterino en Venezuela. **Investigación Clínica**, [s.l.], v. 51, n. 2, p. 193-208, 2010.

GODINHO, T. M., et al. Perfil do paciente que inicia hemodiálise de manutenção em hospital público em Salvador Bahia. **Brazilian Journal of Nephrology**, [s.l.], v. 28, n. 2, p. 96-103, jun, 2006.

GOHRIG, C.; DETJEN, K. M.; HILFENHAUS, G. Axon guidance factor Slit2 inhibits neural invasion and metastasis in pancreatic cancer. **Cancer Research**, Berlin, v. 74, n. 5, p. 1529–1540, 2014.

GRÖNE, J., et al. Robo1/Robo4: differential expression of angiogenic markers in colorectal cancer. **Oncology Reports**, [s.l.], v. 15, n. 6, p. 1437-1443, 2006.

GU, F., et al. Function of Slit/Robo signaling in breast cancer. **Frontiers of Medicine**, [s.l.], v. 9, n. 4, p. 431-436, 2015.

GUIMARÃES, R. M., et al. A transição da mortalidade por cânceres no Brasil e a tomada de decisão estratégica nas políticas públicas de saúde da mulher. **Revista de Saúde Pública**, v.20, n. 1, p. 33-50, 2016.

HAKENBERG, O. W., et al. The diagnosis and treatment of penile cancer. **Deutsches Ärzteblatt International**, [s.l.], v. 115, n. 39, p. 646-652, set, 2018.

HAKENBERG, O. W.; COMPÉRAT, E.; MINHAS, E. S.; NECCHI, A.; PROTZEL, C.; WATKIN, N. **EAU guidelines on penile cancer**. Amsterdam: EAU, 2017.

HAN, B., et al. Role of Slit-Robo signaling in the proliferation of human mucoepidermoid carcinoma Mc3 cells. **Journal of Southern Medical University**, [s.l.], v. 32, n. 1, p. 37-39, 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, [s.l.], v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Viva Mulher 20 anos: história e memória do controle do câncer do colo do útero e de mama no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2018.

JIANG, Z., et al. Targeting the SLIT/ROBO pathway in tumor progression: Molecular mechanisms and therapeutic perspectives. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, [s.l.], v. 11, [s.n.], p.1-14, jun, 2019.

JOHNSTON, M. J.; NIGAM, R. Recent advances in the management of penile cancer. **F1000Research**, [s.l.], v. 8, [s.n], abr, 2019.

KLERING, R. **Pesquisa de papiloma vírus humano (HPV) em tecidos placentários**. Monografia (Graduação em Medicina) – Universidade Federal da Fronteira Sul. Passo Fundo, 2020.

KOOHINI, K.; KOOHINI, Z.; TEIMOURIAN, S. Slit/Robo signaling pathway in cancer; a new stand point for cancer treatment. **Pathology & Oncology Research**, [s.l.], v. 25, n. 4, p. 1285-1293, out, 2019.

KRISTIANSEN, S., et al. Risk factors for penile intraepithelial neoplasia: a population-based register study in Sweden, 2000-2012. **Acta Dermato-venereologica**, [s.l.], v. 99, n. 3, p. 315-320, 2019.

LETO, M. G. P., et al. Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s.l.], v. 86, n. 2, p. 306-317, 2011.

LI, J.; KANG, R.; TANG, D. Cellular and molecular mechanisms of perineural invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma. **Cancer Communications**, London, v. 41, n. 8, p. 642-660, 2021.

LIMA, M. A. P.; SILVA, C. G. L.; RABENHORST, S.H.B. Role of the Human Papillomavirus early proteins in the carcinogenesis. El papel de las proteínas tempranas del virus del Papiloma Humano en la carcinogénesis. **Revista Brasileira de Cancerologia**, [s.l.], v. 59, n. 4, 2013.

LINDOSO, G. S., et al. Epidemiologia e estratégias de prevenção do câncer de pênis no estado do Maranhão. **Revista de Investigação Biomédica**, [s.l.], v. 10, n. 3, p. 237-242, 2019.

LISBÔA, L. L. C. **Mortalidade por câncer de pênis: análise de tendência nos estados brasileiros**. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Universidade Federal do Maranhão. São Luís, 2019.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, Foster City, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

MARCHIONNE, E., et al. Penile squamous cell carcinoma: a review of the literature and case report treated with Mohs micrographic surgery. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s.l.], v. 92, n. 1, p. 95-99, jan/fev, 2017.

MCGUIRE, S. **World Cancer Report 2014**. Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, WHO Press, 2015.

MEDEIROS-FONSECA, B., et al. HPV16 induces penile intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma in transgenic mice: first mouse model for HPV-related penile cancer. **The Journal of Pathology, Original Paper**, [s.l.], v. 251, n. 4, p. 411-419, 2020.

MEDEIROS-FONSECA, B.; CUBILLA, A.; BRITO, H.; MARTINS, T.; MEDEIROS, R.; OLIVEIRA, P.; COSTA, R. M. G. Experimental models for studying HPV-positive and HPV-negative penile cancer: new tools for an old disease. **Cancers**, Vila Real, v. 13, n. 3, p. 460, 2021.

MIRANDA, M. C. L. **Análise epidemiológica do câncer de pênis no Brasil entre os anos de 1985 a 2015**. Dissertação (Pós-Graduação em Políticas Públicas) – Escola Superior de Ciências, Santa Casa de Misericórdia de Vitória. Vitória, 2018.

MOCH, H., et al. The 2016 WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs – part A: renal, penile, and testicular tumours. **European Urology**, [s.l.], v. 70, n. 1, p. 93-105, 2016.

MONTEIRO, B. K. S. M., et al. Human papillomavirus in anal region: literature review. **Revista Médica de Minas Gerais**, Aracaju, v. 29, [s.n.], p. e2027, 2019.

MORRIS, B. J.; MATTHEWS, J. G.; KRIEGER, J. N. Prevalence of phimosis in males of all ages: systematic review. **Urology**, [s.l.], v. 135, [s.n.], p. 124-132, jan, 2020.

NARAYAN, G., et al. Promoter hypermethylation-mediated inactivation of multiple Slit-Robo pathway genes in cervical cancer progression. **Molecular Cancer**, [s.l.], v. 5, n. 16, p. 1-10, 2006.

NGUYEN, C., et al. Penile cancer with positive nodes: A case of HPV p16-positivity and its significance, implication of data from head and neck cancer. **Urology Case Reports**, [s.l.], v. 27, [s.n.], p. 101009, 2019.

NONES, K., et al. Genome-wide DNA methylation patterns in pancreatic ductal adenocarcinoma reveal epigenetic deregulation of SLIT-ROBO, ITGA2 and MET signaling. **International Journal of Cancer**, [s.l.], v. 135, n. 5, p. 1110-1118, 2014.

OLESEN, T. B., et al. Prevalence of human papillomavirus DNA and p16(INK4a) in penile cancer and penile intraepithelial neoplasia: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Oncology**, [s.l.], v. 20, n. 1, p. 145-158, 2019.

OLIVEIRA, R. T. V., et al. Prevenção do câncer de pênis e a valorização da saúde do homem. **Brazilian Journal of Health Review**, [s.l.], v. 3, n. 2, p. 1527-1530, 2020.

PRASAD, A., et al. Slit protein-mediated inhibition of CXCR4-induced chemotactic and chemoinvasive signaling pathways in breast cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 279, n. 10, p. 9115-9124, 2004.

- PIRCHER, A., et al. Robo 4-the double-edged sword in prostate cancer: impact on cancer cell aggressiveness and tumor vasculature. **International Journal of Medical Sciences**, [s.l.] v. 16, n. 1, p. 115-124, 2019.
- REICHERT, M. C.; BROWN, H. E.; EVANS, T. A. In vivo functional analysis of Drosophila Robo1 immunoglobulin-like domains. **Neural Development**, [s.l.], v. 11, n. 1, p. 5, 2016.
- ROCK C. L., et al. American Cancer Society guideline for diet and physical activity for cancer prevention. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**, [s.l.], v. 70, n. 4, p. 245-271, 2020.
- SANTOS, J. M. O., et al. The role of microRNAs in the metastatic process of high-risk HPV-induced cancers. **Cancers**, [s.l.], v. 10, n. 12, p. 493, 2018.
- SOUZA, J. Z. S., et al. Atuação do enfermeiro frente a prevenção do câncer de pênis na Atenção Primária de Saúde: uma revisão de escopo da literatura. **Research, Society and Development**, Nova Iguaçu, v. 10, n. 9, p. e36710912662-e36710912662, 2021.
- SILVA, A., et al. Molecular detection of oncogenic subtypes of human papillomavirus (HPV) in a group of women in the Amazon region of Brazil. **Acta Scientiarum Health Sciences**, Porto Alegre, v. 42, [s.n.], p. e50005, 2020.
- SILVA, R. J. C., et al. HPV-related external genital lesions among men residing in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, São Paulo, v. 21, n. 4, p. 376-385, 2017.
- SILVA, R. S., et al. Aspectos demográficos e epidemiológicos da mortalidade. **Acta Paulista de Enfermagem**, [s.l.], v. 27, n. 1, p. 44-47, 2014.
- STRATTON, K. L.; CULKIN, D. J. A contemporary review of HPV and penile cancer. **Oncology (Williston Park)**, New York, v. 30, n. 3, p. 245-249, mar, 2016.
- TONG, M., et al. The role of the Slit/Robo signaling pathway. **Journal of Cancer**, [s.l.], v. 10, n. 12, p. 2694, 2019.
- TORBRAND, C., et al. Socioeconomic factors and penile cancer risk and mortality; a population-based study. **BJU International**, [s.l.], v. 119, n. 2, p. 254-260, 2017.
- TORRE, L. A., et al. Global cancer statistics, 2012. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**, [s.l.], v. 65, n. 2, p. 87-108, 2015.
- WIENER, J. S.; WALTHER, P. J. The association of oncogenic human papillomaviruses with urologic malignancy: the controversies and clinical implications. **Surgical Oncology Clinics of North America**, [s.l.], v. 4, n. 2, p. 257-276, 1995.
- YUGAWA, T.; KIYONO, T. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. **Reviews in Medical Virology**, [s.l.], v. 19, n. 2, p. 97-113, 2009.
- ZHOU, W. J., et al. Slit-Robo signaling induces malignant transformation through Hakai-mediated E-cadherin degradation during colorectal epithelial cell carcinogenesis. **Cell Research**, [s.l.], v. 21, n. 4, p. 609-626, 2011.

ANEXOS

Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Banco de Tumores e DNA do Maranhão

Universidade Federal do Maranhão.
Hospital Universitário
Banco de Tumores e DNA do Maranhão - HUUFMA

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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

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

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

A sua participação é voluntária, você poderá recusar ou sair da pesquisa em qualquer momento, bastando para isso, comunicar aos responsáveis pela investigação, sem prejuízo

algum para você. Caso você recuse ou decida retirar-se da pesquisa, o material será descartado conforme as normas da legislação sanitária.

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

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

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

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

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

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

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

Nome do familiar:

Endereço:

Fone:

São Luís, ____ de _____ de 20__.

Assinatura do participante

Pesquisador Responsável

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

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

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

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

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

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

Anexo B – Questionário Sociodemográfico

Questionário Epidemiológico de Carcinoma Peniano

CARCINOMA PENIANO		FICHA DE REGISTRO
N° do Prontuário:	Instituição: () HU UFMA () IMOAB () HG	
Nome do Paciente:		
IDENTIFICAÇÃO		
Cor: () branca () parda () preta () outra Raça: _____	Data de Coleta: ____/____/____	
Naturalidade:	Data de Nascimento: ____/____/____	
Residência:	Telefone: () _____	
Endereço:		
Estado Civil: () casado () solteiro () união consensual () viúvo () solteiro () divorciado		
Renda Familiar	Nível de Educação:	
1ª pessoa: ____	() Analfabeto () 1º grau () 2º grau () 3º grau	
2ª pessoa: ____	() Completo () Incompleto	
3ª pessoa: ____	N° de cômodos na casa:	
4ª pessoa: ____	Água encanada na residência: () sim () não	
Renda Total: ____	Tratamento de esgoto: () sim () não	
HÁBITOS DE VIDA		
Tabagismo:	Etilismo:	Higiene da região genital:
() sim.	() sim.	() Não realiza
Tempo de tabagismo: _____	Frequência/sem: _____	() Água e sabão
() não	() não	() Expõe a glândula:
() Ex-Tabagista	() Ex-Etilista	() parcial
Há quanto tempo parou: _____	Há quanto tempo parou: _____	() total
() Passivo	Tipo: _____	
Tipo: _____	Doses/dia: _____	
Cigarros/dia: _____		
HÁBITOS SEXUAIS		
Idade da 1ª relação: ____	Atividade Sexual Atual: () Sim () Não	N° de parceiros durante a vida:
Parceiros Fixos: () Sim () Não	Circuncisão: () sim () não	Idade da circuncisão:
Orientação Sexual: () Homossexual () Heterossexual () Bissexual () Zoofilia		
Já teve relação homossexual:	Penetração Anal: () Sim () Não	
Frequência do uso de camisinha:	Usou camisinha na última relação vaginal: () Sim () Não	
() nunca	Usou camisinha na última relação anal: () Sim () Não	
() às vezes	Usa camisinha com a parceira fixa: () Sim () Não	
() sempre	Usa camisinha com parceiras extraconjugais: () Sim () Não	
Lava-se após as relações sexuais: () sim () não	Higiene da região genital: () Sim () Não	

ANTECEDENTES MÓRBIDOS PESSOAIS E FAMILIARES		
Verrugas genitais: () sim () não		Idade de aparecimento:
HPV diagnosticado () não () sim, quando: _____		Tratamento: () não () sim, quando: _____
Parceira c/ HPV diagnóst. () não () sim, quando: _____		Tratamento: () não () sim, quando: _____
DST prévia: () não () sim		Idade de aparecimento: _____
Tipo de DST: () cancro mole () condiloma acuminado () gonorréia (esquentamento) () clamídia () herpes () linfogranuloma venéreo () sífilis () outras _____		
Tratamento da(s) DST'(s): () não () sim. Qual:		
Balanite: () não () sim Quando:		Trauma no pênis anteriormente: () não () sim Quando:
Câncer prévio: () não () sim, Local:		
Câncer na família: () não () sim, Local:		Grau de parentesco:
HISTÓRIA DA DOENÇA ATUAL		
Data do aparecimento da lesão inicial: ____/____/____		Tipo de lesão inicial: () perda de pigmentação ou manchas esbranquiçadas () feridas e caroços no pênis () tumoração no pênis e/ou virilha () inflamações de longo período com vermelhidão e coceira () secreções e odor fétido
Local do aparecimento da lesão inicial: () glândula () prepúcio () haste do pênis () base do pênis		
Auto conduta prévia: () não () sim, qual:		Evolução: () piora () melhora () inalterado
Tratamento prévio: () sim () não qual:		Evolução: () piora () melhora () inalterada
Procura ao centro de saúde: ____/____/____	Data do diagnóstico: ____/____/____	Tipo de atendimento: () público () privado
Estadiamento ao diagnóstico:		Grau histológico:
Tratamento: () Penectomia () Quimioterapia () Radioterapia () Outros:		
Data do início do tratamento: ____/____/____		Depressão: () sim () não
Recidiva: () Não () Local () Regional () À distância		Data da recidiva: ____/____/____
Entrevistador: _____		

Anexo C – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO - UFMA 
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA
Título da Pesquisa: Interação da via de sinalização ROBO/SLIT na co-infecção com HPV em tumores penianos e sua correlação com a carcinogênese
Pesquisador: Luciane Maria Oliveira Brito
Área Temática:
Versão: 1
CAAE: 39887120.4.0000.5087
Instituição Proponente: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
DADOS DO PARECER
Número do Parecer: 4.487.133
Apresentação do Projeto:
Introdução: O câncer peniano ocorre principalmente em homens após a sexta década de vida e está associado a um alto risco de metástase e morbidades. O câncer de pênis representa cerca de 0.3% a 0.5% dos tumores malignos do homem em países desenvolvidos. Por outro lado, em países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos, como os da Ásia, África e América do Sul, a doença chega a representar de 10% a 20% dos tumores urogenitais masculinos. Método: Trata-se de um estudo quantitativo com recorte transversal. Será feita também a análise dos prontuários dos pacientes vinculados as amostras nos hospitais de referência em Oncologia no Estado do Maranhão. Os dados clínicos e patológicos do paciente e do tumor (regiões acometidas, estadiamento clínico, tipo histológico, presença ou ausência de comprometimento linfonodal e evolução clínica) serão obtidas diretamente do prontuário médico dos pacientes. Resultado: Os resultados parciais e finais obtidos no projeto serão divulgados por meio de apresentação em congressos científicos, publicação em anais de eventos científicos e periódicos especializados. Conclusão: Nenhum estudo até o presente momento, investigou o envolvimento da interação desta via de sinalização de carcinoma, em outro órgão reprodutor masculino, como o pênis. É provável que a interação Slit/Robo desempenhe papel crucial na regulação da função fisiológica das células adultas em tecidos reprodutivos. Os resultados parciais e finais obtidos no estudo serão divulgados por meio de apresentação em congressos científicos, publicação em anais de eventos científicos e
Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho Bairro: Bacanga CEP: 65.080-906 UF: MA Município: SÃO LUIS Telefone: (98)3272-8708 Fax: (98)3272-8708 E-mail: cepufma@ufma.br

Anexo D – Financiamento

		ESTADO DO MARANHÃO FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA E AO DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO DO MARANHÃO TERMO DE OUTORGA E ACEITAÇÃO DE AUXÍLIO		Processo UNIVERSAL-01285/17	
IDENTIFICAÇÃO DO OUTORGANTE					
NOME: FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA E AO DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO DO MARANHÃO (www.fapema.br)					
LEGISLAÇÃO: LEI COMPLEMENTAR Nº 060 DE 31 DE JANEIRO DE 2003.					
ENDEREÇO: Rua Perdizes, nº 05, Qd 37,			BAIRRO / CEP: Jardim Renascença / 65075-340		
RESPONSÁVEL: Alex Oliveira de Souza			CARGO: DIRETOR-PRESIDENTE		
IDENTIFICAÇÃO DO OUTORGADO					
NOME: LUCIANE MARIA OLIVEIRA BRITO					
CPF: 042.071.493-68		IDENTIDADE: 0000799631973			
BANCO Brasil		Nº AGÊNCIA: 1878-3		Nº CONTA: 6.653-2	
INSTITUIÇÃO: UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO					
DEPARTAMENTO: BIOBANCO DE TUMORES DO ESTADO DO MARANHÃO					
ENDEREÇO: RUA DAS GARDÊNIAS 07 APTO 1002 TORRE ATHENA EDIFÍCIO MONTE OLIMPO			BAIRRO: PONTA DA ARÉIA		CIDADE: SÃO LUÍS
CEP: 65077-440			U.F.: MARANHÃO		FONE FIXO (98)32278238
ENDEREÇO ELETRÔNICO: luciane2406@yahoo.com.br					
IDENTIFICAÇÃO DO AUXÍLIO					
SOLICITAÇÃO: UNIVERSAL-01285/17			VIGÊNCIA: 11/09/2017 a 11/09/2019		
MODALIDADE: UNIVERSAL - APOIO A PROJETO DE PESQUISA - UNIVERSAL			EDITAL: EDITAL FAPEMA Nº 31/2016 - UNIVERSAL		
TÍTULO DO PROJETO: INFLUÊNCIA DO TABAGISMO NA INFECÇÃO POR HPV NO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER DE PÊNIS: ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS E CLÍNICOS					
ÁREA / SUBÁREA : Ciências da Saúde / SAÚDE DO ADULTO					
VALOR DO AUXÍLIO A SER PAGO					
DATA LIMITE - RELATÓRIO TÉCNICO / PRESTAÇÃO DE CONTAS		NÚMERO DE PARCELA(S)		VALOR TOTAL	
11/10/2019		02		R\$ 39.488,00	

TERMO: 015830/2017

ARTIGO

The Robo/Slit signaling axis: a key player in HPV-induced cancers

Maria de Lourdes Figueiredo Santos^a, Amanda Teles^a, Natalino Salgado Filho^a, Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento^a, Haissa Oliveira Brito^a, Rui M. Gil da Costa^{a,b},

A - Tumor and DNA Biobank, Post-graduate Programme in Adult Health (PPGSAD), Federal University of Maranhão (UFMA), São Luís, Maranhão, Brazil.

B - Molecular Oncology and Viral Pathology Group, Portuguese Institute of Oncology Research Centre, Porto, Portugal.

Corresponding author: Prof. Rui M. Gil da Costa

Mailing address: Av. dos Portugueses, 1966 - Vila Bacanga, São Luís, Maranhão, Brasil. CEP: 65080-805

Telephone: +55 (98) 98339-9191

E-mail address: rui.costa@ufma.br

Abstract

Introduction: The Robo/Slit Signaling pathway is a complex pathway, where the Roundabout receptor participates in the super family of immunoglobulins that are part of a group of adhesion molecules, in turn, the Slit is constituted by a glycoprotein secreted in the extracellular matrix that binds to its Robo receptor. **Aims:** To describe the Robo/Slit signaling pathway in cancer according to the findings in the literature. **Main methods:** this is a descriptive / exploratory and retrospective study, of the systematic review type. A survey of the studies was carried out in the following databases: Scientific Eletronic Library Online (SCIELO), Latin American and Caribbean Literature in Health Sciences (LILACS), Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (MEDLINE), PUBMED. **Key findings:** The Robo/Slit pathway demonstrated in several studies the participation in axonal repulsion, axonal and neuronal orientation, in the migration of the central nervous system and formation of the vascular system. However, the Robo/Slit pathway has not been completely clarified in the development of the tumor and remains a reason for speculation as a therapy for the various types of cancer. **Significance:** It is hoped that this study can contribute to improving the study of this pathway in various types of cancer, as well as contributing to the scientific society, serving as a basis for future studies.

Keywords: Cancer. Angiogenesis. Migration. Therapy.

Introduction

Rondabout Receptors (Robo) are members of the immunoglobulin superfamily of adhesion molecules (ICAMs), being able to perform homophilic and heterophilic interactions, suggesting that they have functions independent of the Robo [1]. However, these transmembrane proteins are single-pass, with no enzyme activity, which suggests that these receptors depend on the current of signaling molecules. In the central nervous system (CNS), organisms that have bilateral symmetry have connections in their tracts that enable communication between the two sides of the body. In the 90s, the first study was carried out in *Drosophila*, where it was possible to verify that the glycoprotein called Slit secreted in the extracellular matrix acted as a suggestion for the midline response [2,3].

Currently it is known that the Robo Receptor and its ligand Slit are involved in several types of cancer that help to control cell differentiation and mobility. Therefore, studies address that high levels of Slit and Robo are expressed in several types of tissues, including tumor tissues, and Robo/Slit signaling has shown positive results in tumor growth [4]. In a study carried out by Grone et al. [5], the Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed, where it showed that Robo1 and Robo4 expressed themselves in high levels in colorectal carcinoma compared to healthy tissue, while Slit2 showed no differential expression between colorectal carcinoma and healthy tissue. The expression of Robo1 was more present in tumor cells, whereas Robo4 was more expressed in cells of the tumor endothelium.

In the study by Reichert et al. [6], the expression of Slit2 and Robo1 was significantly associated with an increased risk of metastasis, which suggests worse survival for patients with colorectal carcinoma [7]. Increased expression of Robo1 and Slit2 were detected in breast tissues when compared to normal breast epithelial tissues, there was also an increase in Slit1 in the prostate [8]. Robo/Slit signaling generally contributes to the suppression of tumors, as in many types of cancer it shows the specific reexpression of Slit or Robo proteins, contributing to metastatic progression [8].

Another type of cancer increasingly common and with high incidence that affects young women is breast cancer. According to a study by Gu et al. [9], it suggests that approximately 180.000 are diagnosed with breast cancer and 40.000 die from the disease in America. In addition, it reports that 6% to 10% of patients have metastasis. It is known that metastasis can be induced by several factors, among which the activation of promoter genes, as well as the inactivation of tumor suppressor genes. As seen in other studies, cleft proteins and their receptors, Robo1, are expressed abnormally in tumor tissues such as breast cancer [9].

In light of the above, this review brings together current knowledge about the role of Robo/Slit signaling in HPV-induced cancers and the mechanisms by which HPV modulates Robo/Slit signaling.

The Slit/ROBO signaling axis

Three slit genes (Slit1, Slit2, Slit3) have been identified in mammals [10]. Slit1 and Slit2 are known to function as chemorepellents [11]. Slit3 is presumed to act similarly, but as it exhibits a different neuronal expression pattern and has been shown to be non-repulsive to motor axons [12], this remains to be determined. Slits are large glycosylated proteins secreted by midline glial cells, but are often found associated

with the extracellular matrix [10]. The slits are usually composed of four domains of repetition rich in N-terminal leucine (LRR) (LRR1-4) followed by six domains similar to epidermal growth factor (EGF) (EGF1-6), a domain similar to laminin G (Lam), another three EGF domains (EGF7-9) and a C-terminal cysteine node (CTCK) domain.

The roundabout gene, Robo, was first identified in *Drosophila* genetic screens for midline crossing defects of commissural axons [6,13]. The name 'Robo' originates from commissural axons paralyzed in the midline, creating a 'ROundaBOut' or Robo phenotype [7,14]. Many counterparts have already been identified in other species [15]. After their discovery, Robo receptors were shown to act as cognate receptors for the secreted orientation factor Slit [10]. Subsequently, the Slit-Robo signaling pathway proved to be important for many other developmental processes, including organogenesis of the kidney, lungs and heart [16]. Given to its importance during development, Robo receptors have also been implicated in various types of cancer and chronic diseases such as kidney disease and liver fibrosis [3,17]. As such, they are now considered attractive therapeutic targets.

The creation of a complex network of neurons depends on the ligand-receptor interaction, which has the function of mediating attraction or repulsion in relation to the specific target, that is, the action that this interaction will perform at the level of the nervous system [18].

Robo receptors are evolutionarily conserved in bilateral anatomical species. Three robo genes have been identified in *Drosophila*, Zebrafish and chick while *C. elegans* contains a single orthologous robot, SAX-3 [15,16,19]. In mammals, four Robo receptors (Robo1, Robo2, Robo3 and Robo4) have been identified. Robo1, Robo3 and Robo4 are sometimes referred to as Excluded in U twenty twenty retinoblastoma inhibition gene 1 (Rig-1) and Magic Robo, respectively, in older manuscripts [16,20,21].

The ROBO1 and ROBO2 genes are located on human chromosome 3, while the ROBO3 and ROBO4 genes are located on chromosome 11, both in a similar head-to-head configuration. This closely linked chromosomal organization suggests that Robo receptors emerged from a single ancestral vertebrate ROBO gene by a tandem duplication that was followed by two duplications of the entire genome and losses before vertebrate radiation [20]. Two copies of tandem duplication exist in the genomes of most vertebrates today. To add even more complexity, alternative splicing of mammalian ROBO genes with varying expression patterns and different guidance responses has also been reported. This mechanism proved to be particularly important for the Robo3 function [7,12,16].

In the last decade, studies have demonstrated the dual functions of SLITs and ROBOs as axon orientation, being clues in the development of the nervous system, where both attract and repel neuronal migration. This bifunctionality is also seen in cancers such as oncogenes and tumor suppressor genes. [4]

The expression of SLIT and ROBO is altered in a wide variety of cancer types, identifying them as potential therapeutic targets. Previous studies have shown that high levels of SLITs and ROBOs are expressed in many types of tumors and SLIT / ROBO signaling has a positive effect on tumor growth. For example, through microarray and polymerase analysis in real time chain reaction (PCR), Groene et al. showed that the expression of ROBO1 and ROBO4 was significantly up-regulated in colorectal carcinoma compared to normal tissue, while SLIT2 showed without differential expression between colorectal carcinoma and normal tissue [2,3,20].

Expression ROBO1 it was mainly in tumor cells, while ROBO4 was located mainly in tumor endothelial cells. Zhou et al. [7] demonstrated that the expression of SLIT2 and ROBO1 was significantly associated with an increased metastatic risk and worse overall survival in patients with colorectal carcinoma. ROBO1 and SLIT2 mRNAs were detected in breast cancer cell lines and breast cancer tissues, and ROBO1 expression was elevated in breast carcinoma compared to normal breast mammary epithelial cells, and there was also a notable increase in SLIT1 expression in the prostate tumors. Due to overexpression of ROBO1 in hepatocellular carcinoma and the elimination of ROBO1 in human serum, this receptor of SLITs are considered a new potential serological marker for hepatocellular carcinoma. In addition, SLIT2 and ROBO1 were overexpressed in Mc3 cells of human mucoepidermoid carcinoma. The SLIT2 / ROBO1 pathway promoted Mc3 cells proliferation and the treatment of Mc3 cells with monoclonal antibody R5 that can interrupt the SLIT2 / ROBO1 path that caused significantly so that suppressed cell growth and proliferation and significantly reduced the expression of PCNA.

In addition, the expression SLIT2 was correlated with the loss of the basement membrane in the samples of squamous cell carcinoma of human skin at different stages of disease progression. SLIT2-Tg mice have been found to develop significantly more skin tumors than wild type mice. The skin tumors that occurred in SLIT2-Tg mice were significantly larger than those in wild type mice after 7,12-dimethylbenz anthracene initiation until the end of the experiment. SLIT2 it can also promote the invasive ability of squamous cell carcinoma cell line and this effect can be significantly suppressed by the R5 antibody [16,17].

Tumor metastasis occurs when tumor cells migrate to other distant organs, invading blood and lymphatic vessels and leading to tumor formation, which is important for the development of cancer. Recent studies have indicated that the SLIT / ROBO signaling pathway plays an important role in the promotion and migration of tumor cells and, thus, the tumor promotes metastasis. It is important to remember that, SLIT2 works as a potent chemoattract for breast cancer cells, inducing the migration of cells that express ROBO1. In addition, SLIT2 / ROBO1 signaling has been shown to be upregulated in MMP-9 to increase breast cancer cell invasion [18,20].

The low expression of ROBO2 mRNA was associated with low patient survival, while high expression of ROBO3 mRNA, a known inhibitor of ROBO2 signaling, demonstrated an appropriate reciprocal inverse association with poor survival in pancreatic cancer. The expression of ROBO3 is up-regulated in pancreatic cancer tissue samples.

Slit/Robo in cancer: oncogenes or tumor suppressor genes?

The most recent studies show that Slit and Robo are tumor suppressor genes, since silencing or even loss of Slit occurs during tumorigenesis. However, it was possible to observe in breast cancer tumors that Slit2 or Slit3 when expressed in the breast tumor samples, lost or even lost expression. The expression Slit2 or Slit3 is silenced in approximately 50% of human breast tumor samples [3,12].

The Slit and Robo genes are mainly inactivated through loss of heterozygosity (LOH) and promoter region hypermethylation [22]. Therefore, When the promoter region of the Slit / Robo genes is analyzed. it was possible to observe the presence of

hypermethylation in the cytokine-guanine line in cervical cancer, breast cancer, lung cancer [9].

Hypermethylation of the Slit2 promoter in the tissue of serum samples from breast cancer patients suggests to be a possible marker for the early detection of the disease. The Slit2 gene was mapped to 4p15.2 and the chromosome 4p15.1-15.3 region showed frequent loss of alleles in approximately 63% of breast tumors. The putative Robo1 receptor is methylated in <20% of breast tumors; however, Robo1's LOH occurs frequently in lung, breast and kidney tumors. Therefore, Slit and Robo possibly function as new tumor suppressor genes [3,22]. What draws a lot of attention to the study is that the hypermethylation of the SLIT2 promoter varied in frequency between 25 and 72% and was reported in a wide spectrum of tumors such as colon, glioma, lung, breast, kidney cell cancer, tumor of Wilms and neuroblastoma [23].

The cells of breast cancer that overexpress Slit 2 causes a decrease in Akt activity. This pathway in turn contributes to the reduction of glycogen syntax kinase phosphoralization 3β (GST- 3β). The defopharylization of GSK - 3β favors the increase of betha catenin, thus leaving Beta catenin reduced in the cytoplasm and increased in the cell membrane. This increase in β catenin in the cell membrane known as the ubiquitin ligase complex, promotes intercellular adhesion, a process mediated by E-caterin and catenin that participate in the development of breast cancer. Thus, the increase in slit 2 inhibits the invasion of malignant breast cells, which may be explained by the regulation of the expression and distribution of β catenin that interacts with the skeletal system E-cardin / actin during cell adhesion. [22].

It is known that the Slit/Robo genes have variations or mutations in their structure and approximately 2/3 of the patients present this altered gene, that is, silenced by methylation [24]. In the same study, the authors reported that in the cells of the tissues of the animals that had ductal pancreatic adenocarcinoma (PDAC) in mice, there was a progressive loss of Robo2, a progressive increase in Robo1 and no expression of Robo 3 mRNA. However, we can say that there was a silencing of the Slit / Robo path in the PDAC [24].

Loss of function in tumor cells shows that the Robo1 and Robo3 receptors are involved in pancreatic cancer, favoring cell migration and consequently leading to metastasis. Therefore, the low expression of Robo 2 is associated with low survival of patients who had PDAC [24].

Comparing with several studies on promotion and tumor progression, SLITs and ROBOs are suppressor genes in some special tumors. therefore, as in the study by Jiang et al 2019 It has been shown that the SLIT / ROBO pathway is frequently inactivated by the promoter hypermethylation of the region, resulting in negatively regulated gene expression in many human cancers [8,12].

SLIT2 was methylated in 71% (5/7) glioma cell lines and 59% (37/63) of other tumors and SLIT2 expression was downregulated in tumor samples of methylated gliomas, which indicated that SLIT2 was often inactivated by the CpG island promoter region hypermethylation in gliomas and can be a good candidate for a glioma tumor suppressor gene [9].

SLIT2 expression was reduced in CRC tissues because of the hypermethylation of the SLIT2 gene in CRC cells, and SLIT2 could inhibit the migration of CRC cells that required USP33 unubiquitinating and stabilizing ROBO 1. Another study also showed that USP33 was down-regulated in lung cancer patients and that low expression of

USP33 was associated with poor prognosis, which may be associated with reduced ROBO1 protein stability in the lung cancer cells [13].

Angiogenesis

Angiogenesis is a cellular process that involves neovascularization, which in turn is part of the embryonic process, healing, granulation tissue. Thus, it is an important factor in the transition from benign tissue to the state of malignant tissue. Today we know that there is evidence of similarity between migration and formation of new blood vessels, because for this step to occur, it is necessary that the adhesion molecules act in the conduction in the migration of the axon in the central nervous system [25].

Another class of molecules, as already mentioned, are axon-oriented molecules where ligands and their receptors are involved in the inflammatory process and in tumor cells. The tumor expands from the formation of new blood vessels, thus organizing the tumor microenvironment. therefore, there is an intimate relationship between tumor cells and endothelial cells, since, for the metastasis process to occur, malignant cells must invade endothelial cells. In view of the explanation, the studies report that angiogenic factors, such as vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF) and cell adhesion molecules such as cadherin and integrin are fundamental processes for carcinogenesis to occur [25].

Role of Slit/ROBO signaling in perineural invasion

Perineural invasion (PNI) is considered a alternative route for the metastatic spread of pancreatic cancer cells; however, the molecular changes that lead to PNI are still poorly studied. Disturbances in the SLIT2-ROBO signaling pathway in acute ductal pancreatitis carcinoma may improve metastasis and PDAC cells to neural invasion. Therefore It was found that a reduction in the expression of SLIT2-ROBO activity in the PDAC deficient in SLIT2 and SLIT3 leads to bidirectional adjustment of angiogenesis. Through the modulation of the activity of ROBO1, ROBO2, ROBO4, vascular endothelium, via the endothelial growth factor (VEGF), endothelial cell behaviors, could be regulated [26].

Therapeutic advances in medical oncology inhibited bidirectional chemoattraction with neural cells. However, another group showed that SLIT2 was expressed by fibroblasts associated with cancer, increasing neuritis. The inhibition of SLIT2 / ROBO signaling interrupted this stroma / neural connection. The controversial effects of SLIT / ROBO on the tumor of neural invasion reflects its complicated role in tumor progression and need to be further explored [22].

The Slit / Robo pathway has shown in several studies to participate in axonal repulsion, axonal and neuronal orientation, migration in the nervous system and formation of the vascular system. However, the role the SLIT / ROBO pathway has not been completely clarified in the development of the tumor. So it is important to discuss the roles of tumor promotion and suppression of the SLIT / ROBO pathway in tumor growth, angiogenesis, migration and tumor microenvironment, in order to understand that these roles will help us to develop more effective cancer therapies [4].

Perineural invasion (PNI) is considered as an alternative route for the metastatic spread of pancreatic cancer cells, however, as molecular changes that lead to PNI are still poorly understood. Andreas and colleagues that by disturbing SLIT2-ROBO

Signaling in PDAC can improve metastases and PDAC cells to neural invasion. This was found that a reduction in SLIT2-ROBO pathway activity existing in PDAC and restoring SLIT2 expression in PDAC deficient in SLIT2 cells inhibited their bidirectional chemoattraction with neural cells. However, another group showed that a SLIT2 was expressed by cancer-associated fibroblasts (CAFs), increasing the growth of neurites in the neurons of the dorsal root ganglia, as well as the migration or proliferation of Schwann cells [14,24,26].

The inhibition of SLIT2 / ROBO signaling interrupted this stromal / neural connection. For the controversial effects of SLIT / ROBO on neural tumor invasion reflect its complicated role in tumor progression and need to be explored later. Therefore, there is a close relationship between abnormal signaling and tumor development. To develop effective efficacy against cancer, it is useful to understand how SLIT / ROBO signaling affects tumor formation and angiogenesis and the mechanisms by which SLIT / ROBO signaling exerts these effects. To develop an effective approach to cancer treatment, additional studies are included, also taking into account the significant reduction mediated by SLIT / ROBO [1,3,14].

HPV-associated cancers

Human Papillomavirus (HPV) includes more than 200 types, some are known to be at high risk like HPV 16 and 18 and low risk ones like 6 and 11 that are associated with the emergence of various types of cancers like uterus, anogenital, head and neck [27,28].

High-risk human papillomavirus infection (HPV) is known to be the leading cause of cervical cancer (CC). At the In the study by Narayan et al. [23], it was not possible to find any significant correlation between the frequency of methylation and various types of HPV in CC However, a controlled study comprising a large number of HPV negative tumors is necessary to rule out the role of HPV in methylation of the gene in the Slit-Robo pathway [23,29].

Targeting the Slit/ROBO pathway

It is known in the literature that Slit interact with the Robo and, later, play an important role in the formation of muscle cells, migration, stem cell growth, angiogenesis, and tumor formation that recruit different molecules or adapter proteins to cause a cascade of signaling pathways, although little is known about exactly how the Slit / Robo link is transmitted across the cell membrane [30].

Recently it has been found in other studies that Slit / Robo can link and recruit to promote cancer cells migration and weaken the adhesion of cancer cells, as ubiquitin kinase Hakai, which leads to the ubiquitination of E-cadherin, and Myo9b (or myosin IXB), which inhibits the growth and migration of lung cancer cells by inhibiting the RhoA protein. In total, it is well estimated that these such as Abl, Ena, GTPases and other Slit / Robo targets regulate cell motility and migration. Therefore, Slit / Robo may be a potential therapeutic target to prevent development of diseases such as tumor [30].

References

1. Gara RK, Kumari S, Ganju A, Yallapu MM, Jaggi M, Chauhan SC. Slit/Robo pathway: a promising therapeutic target for cancer. *Drug Discovery Today* 2015;20(1):156-164. DOI: 10.1016/j.drudis.2014.09.008.
2. Dickinson RE, Fegan KS, Ren X, Hillier SG, Duncan WC. (2011). Glucocorticoid regulation of SLIT/ROBO tumour suppressor genes in the ovarian surface epithelium and ovarian cancer cells. *PloS one* 2011;6(11):e27792. DOI: 10.1371/journal.pone.0027792.
3. Ballard MS, Hinck L. A roundabout way to cancer. *Advances in Cancer Research* 2012;114:187-235. DOI: 10.1016/B978-0-12-386503-8.00005-3.
4. Jiang Z, et al. Targeting the SLIT/ROBO pathway in tumor progression: molecular mechanisms and therapeutic perspectives. *Therapeutic Advances in Medical Oncology* 2019;11:1-14. DOI: 10.1177/1758835919855238.
5. Gröne J, Doeblner O, Loddenkemper C, Hotz B, Buhr HJ, Bhargava S. Robo1/Robo4: differential expression of angiogenic markers in colorectal cancer. *Oncology Reports* 2006;15(6):1437-1443. DOI: 10.3892/or.15.6.1437.
6. Reichert MC, Brown HE, Evans TA. In vivo functional analysis of Drosophila Robo1 immunoglobulin-like domains. *Neural Development* 2016;11(15):1-11. DOI: 10.1186/s13064-016-0071-0.
7. Zhou WJ, et al. Slit-Robo signaling induces malignant transformation through Hakai-mediated E-cadherin degradation during colorectal epithelial cell carcinogenesis. *Cell Research* 2011;21:609-626. DOI: 10.1038/cr.2011.17.
8. Han B, Wang L, Wang J, Zhang J, Zhao Y, Qi C. Role of Slit-Robo signaling in the proliferation of human mucoepidermoid carcinoma Mc3 cells. *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University* 2012;32(1):37-39. PMID: 22366001.
9. Gu F, Ma Y, Zhang J, Qin F, Fu L. Function of Slit/Robo signaling in breast cancer. *Frontiers of Medicine* 2015;9(4):431-436. DOI: 10.1007/s11684-015-0416-9.
10. Brose K, Tessier-Lavigne M. Slit proteins: key regulators of axon guidance, axonal branching and cell migration. *Current Opinion in Neurobiology* 2000;10(1):95-102. DOI: 10.1016/S0959-4388(99)00066-5.
11. Nguyen C, Leslie S, Gross J, Dietz N, Lele SM, Sirineni G. Penile cancer with positive nodes: A case of HPV p16-positivity and its significance, implication of data from head and neck cancer. *Urology Case Reports* 2019;27:101009. DOI: 10.1016/j.eucr.2019.101009.
12. Ding C, Li Y, Xing C, Zhang H, Wang S, Dai M. Research Progress on Slit/Robo Pathway in Pancreatic Cancer: Emerging and Promising. *Journal of Oncology* 2020; 2020:1-7. DOI: doi.org/10.1155/2020/2845906.
13. Bianchi G, et al. Robo1 promotes homing, dissemination, and survival of multiple myeloma within the bone marrow microenvironment. *Blood Cancer Discovery* 2021;2(4):338-353. DOI: 10.1158/2643-3230.BCD-20-0164.
14. Pircher A, et al. Robo 4-the double-edged sword in prostate cancer: impact on cancer cell aggressiveness and tumor vasculature. *International Journal of Medical Sciences* 2019;16(1):115-124. DOI: 10.7150/ijms.28735.
15. Blockus H, Chédotal A. Slit-Robo signaling. *Development* 2016;143(17):3037-3044. DOI: 10.1242/dev.132829.
16. Cazares O, et al. Alveolar progenitor differentiation and lactation depends on paracrine inhibition of notch via ROBO1/CTNBB1/JAG1. *Development* 2021;148(21):dev199940. DOI: 10.1242/dev.199940.
17. Huang G, et al. (2021). Depression-/anxiety-like behavior alterations in adult Slit2 transgenic mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 2021;14:622257. DOI: 10.3389/fnbeh.2020.622257.
18. Curry RN, Glasgow SM. The role of neurodevelopmental pathways in brain tumors. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2021;9:659055. DOI: 10.3389/fcell.2021.659055.

19. Farinella F, Merone M, Bacco L, Capirchio A, Ciccozzi M, Caligiore D. Machine Learning analysis of high-grade serous ovarian cancer proteomic dataset reveals novel candidate biomarkers. *Scientific Reports* 2022;12(3041):1-12. DOI: 10.1038/s41598-022-06788-2
20. Latil A, Chêne L, Cochant-Priollet B, Mangin P, Fournier G, Berthon P, Cussenot O. Quantification of expression of netrins, slits and their receptors in human prostate tumors. *International Journal of Cancer* 2003;103(3):306-315. DOI: 10.1002/ijc.10821.
21. Mestre VF, et al. HPV16 is sufficient to induce squamous cell carcinoma specifically in the tongue base in transgenic mice. *The Journal of Pathology* 2020;251(1):4-11. DOI: 10.1002/path.5387.
22. Feng Y, Feng L, Yu D, Zou J, Huang Z. srGAP1 mediates the migration inhibition effect of Slit2-Robo1 in colorectal cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2016;35(1):1-10. DOI: 10.1186/s13046-016-0469-x.
23. Narayan G, et al. Promoter hypermethylation-mediated inactivation of multiple Slit-Robo pathway genes in cervical cancer progression. *Molecular Cancer* 2006; 5(16): 1-10. DOI: 10.1186/1476-4598-5-16.
24. Pinho AV, et al. ROBO2 is a stroma suppressor gene in the pancreas and acts via TGF- β signalling. *Nature Communications* 2018;9(1):1-14. DOI: 10.1038/s41467-018-07497-z.
25. Koohini Z, Koohini Z, Teimourian S. Slit/Robo signaling pathway in cancer; a new stand point for cancer treatment. *Pathology & Oncology Research* 2019;25(4):1285-1293. DOI: 10.1007/s12253-018-00568-y.
26. Barzon L, et al. Profiling of expression of human papillomavirus–related cancer miRNAs in penile squamous cell carcinomas. *The American Journal of Pathology* 2014;184(12), 3376-3383. DOI: 10.1016/j.ajpath.2014.08.004.
27. Santos JM, Silva SP, Costa NR, Gil da Costa RM, Medeiros R. The role of microRNAs in the metastatic process of high-risk HPV-induced cancers. *Cancers* 2018;10(12):493. DOI: 10.3390/cancers10120493.
28. Lima MAP, Silva CGL, Rabenhorst SHB. Papel das proteínas precoces do papilomavírus humano na carcinogênese. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2013;59(4):565-573. DOI: 10.32635/2176-9745.RBC.2013v59n4.983.
29. Leto MDGP, Santos Júnior GFD, Porro AM, Tomimori J. Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 2011;86(2):306-317.
30. Tong M, et al. The role of the Slit/Robo signaling pathway. *Journal of Cancer* 2019;10(12):2694. DOI: 10.7150/jca.31877.