

**ALTERAÇÃO NO NÚMERO DE CÓPIAS GENÔMICAS
E EXPRESSÃO GÊNICA EM LARGA ESCALA
EM CARCINOMAS DE PÊNIS**

ARIANE FIDELIS BUSSO

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente
para a obtenção do Título de Doutora em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Regina Rogatto

São Paulo

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Busso, Ariane Fidelis

Alteração no número de cópias genômicas e expressão gênica em larga escala em carcinomas de pênis / Ariane Fidelis Busso - São Paulo, 2013.
201p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Silvia Regina Rogatto

Descritores: 1. CÂNCER DE PÊNIS. 2. BIOLOGIA MOLECULAR. 3. MARCADORES MOLECULARES. 4. EXPRESSÃO GÊNICA. 5. ALTERAÇÃO NO NÚMERO DE E CÓPIAS DE DNA. 6. ANÁLISE INTEGRADA. 7. PAPILOMAVÍRUS HUMANO.



Dedicatória

*Aos meus pais Mauro e Rosa e minha irmã Layane
por serem a base da minha vida. Ao meu marido
Alexandre pelo amor e companheirismo absolutos*

Dedico



Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora **Dra. Silvia Regina Rogatto**. Não tenho palavras para dizer obrigada pela compreensão e por nunca ter me abandonado quando precisei. Pelos e-mails, pelas conversas, por ter me ensinado muito mais do que o conhecimento acadêmico, te agradeço imensamente. Se hoje me sinto preparada para o início de uma carreira e para enfrentar qualquer barreira, posso dizer que devo grande parte disso ao que vejo em você. Só posso te agradecer pelo que me proporcionou e me ensinou nesses quatro anos juntas. Nada disso tem preço!

Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes.

Isaac Newton

A sabedoria não nos é dada. É preciso descobri-la por nós mesmos, depois de uma viagem que ninguém nos pode poupar ou fazer por nós.

Marcel Proust

Aos pesquisadores e professores do Hospital AC Camargo **Dra. Isabela Werneck da Cunha, Dr. Fernando Augusto Soares, Dr. José Vassallo e Dr. Gustavo Guimarães**, do Hospital do Câncer de Barretos **Dr. Cristovam Scapulatempo e Dr. André Lopes de Carvalho** e da UNESP/Botucatu **Dra. Cláudia Rainho e Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues**, agradeço por todo o auxílio e disponibilidade. Obrigada por terem dedicado parte do seu tempo para que esse projeto pudesse ser concluído.

Aos amigos integrantes e ex-integrantes do Laboratório Neogene **Sara, Hellen, Mateus, Fernanda, Júlia, Carol, Fábio, Livia, Miriam, Priscila, Cássia, Renata, Sandra Drigo, Sandra, André, Márcia, Deborah, Juan, Fabíola, Renee, Francine, Ana, Graziela, Rogério, Anderson.** Sem vocês os dias não teriam sido tão alegres... Obrigada pelas conversas e por toda a ajuda imprescindível. Tenho certeza que fiz verdadeiros amigos durante essa caminhada.

Aqueles que passam por nós não vão sós, não nos deixam sós.

Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.

Antoine de Saint-Exupéry

Só existe uma coisa melhor do que fazer novos amigos: conservar os velhos.

Elmer Letterman

À **biblioteca e pós-graduação** do Hospital AC Camargo. Por estarem sempre prontos a ajudar, muito obrigada!

A todos os integrantes do **CIPE**, agradeço pelo auxílio.

À **FAPESP** e ao **CNPq** pelo suporte financeiro.

Aos meus pais **Mauro** e **Rosa**. Agradeço por toda a dedicação para que eu me tornasse o que sou hoje. Vocês são essenciais em minha vida e meus maiores exemplos. Amo vocês...

Pais e filhos, o maior e mais belo encontro da vida, cúmplices no aprender a desvendar os mistérios de cada um.

Roberto Shinyashiki

À minha irmã **Layane**. Como posso te agradecer por me “aguentar” todos esses anos e por toda a paciência? Em resumo, obrigada por ser minha irmã! Amo você...

Ter um irmão é ter, pra sempre, uma infância lembrada com segurança em outro coração.

Autor desconhecido

Ao meu marido **Alexandre**. Meu amor... Agradeço a você por estar ao meu lado em todos os momentos pelos últimos onze anos. Sem sua companhia, compreensão e amor, nada seria tão especial e os caminhos seriam mais difíceis. Obrigada por me fazer a pessoa mais feliz do mundo. Te amo!!!

Um sonho que se sonha só é apenas um sonho; um sonho que se sonha a dois é uma realidade.

Raul Seixas



Resumo

RESUMO

Busso AF. **Alteração no número de cópias genômicas e expressão gênica em larga escala em carcinomas de pênis.** São Paulo; 2013. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

O câncer de pênis (CaPe) é uma neoplasia rara que ocorre em homens preferencialmente a partir da sexta década de vida. Análises utilizando métodos em genética molecular são extremamente limitadas nesses tumores. Esse projeto teve como objetivos identificar alterações no número de cópias genômicas e no padrão de expressão gênica, bem como o perfil integrado dos dados genômicos e transcriptômicos, para determinar biomarcadores relevantes em tumores de pênis. Foram obtidas 48 lesões penianas, sendo 43 carcinomas de células escamosas (CEC) primários, dois carcinomas *in situ* (CIS), uma hiperplasia (HP), uma metástase e uma recidiva. A genotipagem do HPV foi realizada para 47 amostras utilizando o kit *Linear Array HPV Test Genotyping* (Roche, CA, USA). A plataforma 4x44K (Agilent Technologies, CA, USA) foi utilizada para análises de alterações no número de cópias genômicas (n=43) e na expressão de transcritos (n=42). A análise dos dados genômicos foi realizada no programa *Nexus 6.0* (Biodiscovery, CA, USA) e dos dados de expressão pelo *software TMeV 4.5* (<http://www.tm4.org>). A integração dos dados foi realizada em 37 casos com dados disponíveis para as duas metodologias usando a correlação de *Pearson*. A análise funcional *in silico* dos genes alterados foi realizada com o *software Ingenuity Pathway Analysis* (IPA - Ingenuity® Systems, <http://www.ingenuity.com>). A confirmação dos dados ocorreu por qPCR e FISH para as alterações genômicas e RT-qPCR para a expressão dos transcritos. A genotipagem para o HPV revelou positividade em 14/42 CaPe avaliados (33,3%), dois CIS, uma HP e uma metástase. As análises de aCGH mostraram um perfil genômico distinto para carcinomas verrucosos em relação aos outros subtipos histológicos de CEC. Entre os tumores, foram encontradas 1.074 alterações no número de cópias (média de $28,3 \pm 17,8$ CNAs/indivíduo). Os ganhos genômicos mais comuns foram detectados em 3q, 5p, 8q, 9p, 9q, 20p e 21p,

enquanto as perdas ocorreram em 3p, 8p, 9p, 21p e Y. Alterações nos cromossomos 3 e 8 foram associadas a características de pior prognóstico e sobrevida diminuída. A comparação de ganhos e perdas segundo a infecção pelo HPV revelou 19 regiões diferenciais. A análise de expressão gênica em larga escala mostrou 875 genes diferencialmente expressos entre amostras normais e tumorais relacionados principalmente ao câncer, movimentação celular e duplicação, recombinação e reparo do DNA. Essa análise permitiu a predição da ativação de reguladores transcricionais. Trezentos e oitenta e um genes apresentaram expressão diferencial de transcritos na comparação entre tumores HPV positivos e negativos. A análise de agrupamento hierárquica supervisionada mostrou um grupo com predominância de casos positivos para infecção. Foram verificadas alterações recorrentes em vias canônicas relacionadas ao ciclo celular e resposta inflamatória, demonstrando um mecanismo de oncogênese viral em CaPe. A integração dos dados genômicos e transcriptômicos revelou 187 genes cuja expressão gênica é dirigida por alterações no número de cópias localizados principalmente nos cromossomos 3 e 8. Esses genes podem alterar as via de sinalização do PTEN e do mTOR. Alterações detectadas em larga escala para o cromossomo Y, gene *MYC*, moléculas localizados em regiões de pior prognóstico (*DLC1*, *LAMP3*, *PPARG*, *TNFSF10*), genes da via de reparo a erros de pareamento em eucariotos (*MSH6*, *RFC4*, *PCNA*) e reguladores transcricionais (*FOXO1*, *JUN*, *TP53*) foram selecionadas para confirmação dos achados. Outros genes associados ao câncer descritos previamente foram também avaliados (*CAVI*, *FLI1*, *MMP1*, *IFIT2*, *PI3*, *SBF1*, *STAT1*). Sete CaPe avaliados por FISH apresentaram perdas de Y ou ganhos de *MYC* concordantes com os dados de aCGH. A comparação entre CaPe e amostras normais revelou expressão gênica diferencial para 12 dos 17 genes avaliados; quatro genes apresentaram alteração no níveis de transcrito entre casos positivos e negativos para o HPV. 66,6% das regiões genômicas avaliadas por qPCR mostraram dados concordantes com aCGH. Em particular, a diminuição nos níveis transcricionais dos gene *PI3* e *MSH6*, além de perdas exônicas em *DLC1*, relacionaram-se a características de pior prognóstico. Essas análises confirmaram o envolvimento destes genes nos cânceres de pênis, revelando marcadores moleculares e alvos terapêuticos que podem levar a redução da morbidade e mortalidade causada por este carcinoma.



Summary

SUMMARY

Busso AF. [**Copy number alterations and gene expression profiling by large-scale analysis in penile carcinomas**]. São Paulo; 2013. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Penile cancer is a rare malignancy that occurs predominantly in men after the sixth decade of life. Molecular genetic data in penile cancer are extremely limited. In this study, it was evaluated copy number alterations and global gene expression by large-scale analysis in penile carcinomas, as well as the integrative profile between genomic and transcriptomic data, in order to uncover the main biomarkers in penile tumors. Forty-eight penile lesions were obtained: 43 squamous cell carcinomas (CEC), two *in situ* carcinoma (CIS), one hyperplasia (HP), one metastasis and one recurrence. HPV genotyping was performed for 47 samples using Linear Array HPV Test Genotyping kit (Roche, CA, USA). Genomic copy number alterations (n=43) and gene expression analysis (n=42) were assessed by 4x44K platforms (Agilent Technologies, CA, USA). Genomic data were analyzed by *Nexus 6.0* (Biodiscovery, CA, USA) and gene expression by using TMeV 4.5 *software* (<http://www.tm4.org>). Integrative analysis was carried out for 37 penile tumors with both genomic and transcriptomic available data using *Pearson* correlation. *In silico* functional analysis of altered genes was performed by *Ingenuity Pathway Analysis software* (IPA, Ingenuity® Systems, <http://www.ingenuity.com>). Data confirmation was performed using qPCR and FISH for copy number alterations, and RT-qPCR for transcript expression results. Fourteen out of 42 penile cancers evaluated (33.3%) were positive for HPV infection, as well as two CIS, one HP and one metastasis. In comparison to other CEC subtypes, aCGH analysis showed differential genomic profile for verrucous carcinomas. Considering tumors, it was found 1.074 copy number alterations (in average, 28.3 ± 17.8 CNA/individual). The most common copy number gains were detected in 3q, 5p, 8q, 9p, 9q, 20p and 21p. Chromosomal losses were found in 3p, 8p, 9p, 21p and Y. Specific alterations on chromosomes 3 and 8 were related to worse outcome and shorter survival. Nineteen differential genomic regions

were obtained according to HPV status. Gene expression analysis showed 875 differentially expressed genes between tumor and normal samples mainly related with cancer, cellular movement, DNA replication, recombination and repair and cellular development. This analysis also predicted the activation status of transcription regulators. Three hundred eighty one genes had differential transcript expression for HPV positive in comparison to HPV negative tumors. The hierarchical clustering analysis showed two groups nearly classified according to viral infection. Recurrent alterations in pathways related to cell cycle and inflammatory response were verified and demonstrated a mechanism of viral oncogenesis in penile tumors. The integrative genomic and transcriptomic analysis revealed 187 copy number driven genes mainly located on chromosomes 3 and 8. These molecules are able to disrupt PTEN and mTOR pathways. Alterations detected by large scale analysis for Y chromosome, *MYC* gene, poor prognosis regions genes (*DLC1*, *LAMP3*, *PPARG*, *TNFSF10*), mismatch repair in eukaryotes pathway molecules (*MSH6*, *RFC4*, *PCNA*) and transcription regulators (*FOXO1*, *JUN*, *TP53*) were selected and submitted for data confirmation. Genes previously related with cancer were also evaluated (*CAVI*, *FLI1*, *MMP1*, *IFIT2*, *PI3*, *SBF1*, *STAT1*). Seven penile tumors evaluated by FISH showed agreement between Y losses or *MYC* gains and aCGH data. The comparison between tumors and normal samples detected differential gene expression for 12 of 17 genes evaluated; four molecules showed transcript levels alterations between HPV positive and negative tumors. 66.6% of genomic regions evaluated by qPCR demonstrated concordance with aCGH. In addition, lower levels of *PI3* and *MSH6* transcripts, as well as exonic losses on *DLC1* gene, were associated with poor prognosis. By this analysis, it was possible to confirm the involvement of several genes in penile cancer and identify molecular markers, as well as therapeutic targets, that may be useful to reduce the mortality and morbidity caused by penile tumors.



*Lista de
Figuras*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fluxograma ilustrando metodologias e casuística empregadas no presente estudo.....	26
Figura 2	Representação esquemática dos quatro genes selecionados para validação por qPCR (<i>DLCL1</i> , <i>LAMP3</i> , <i>PPARG</i> , <i>TNFSF10</i>).....	44
Figura 3	Caracterização genômica dos 38 CECs de pênis avaliados quanto a ganhos e perdas genômicas.....	57
Figura 4	Representação esquemática dos cromossomos com alterações presentes em mais que 20% dos CaPe avaliados (cromossomos 3, 5, 8, 9, 20, 21 e Y).....	60
Figura 5	Agrupamento hierárquico com base no perfil genômico realizado para os 38 CaPe avaliados por aCGH.....	62
Figura 6	Comparação do perfil genômico de acordo com características clínicas e patológicas.....	69
Figura 7	Perfil de expressão gênica em larga escala para 39 CaPe avaliados.....	71
Figura 8	Caracterização funcional do grupo de genes obtidos após análise de expressão gênica para 39 CaPe.....	72
Figura 9	Perfil de expressão gênica em larga escala para dois grupos classificados quanto à infecção pelo HPV.....	75
Figura 10	Agrupamento hierárquico supervisionado quanto à presença (n=11) ou ausência (n=25) de infecção pelo HPV.....	75

Figura 11	Caracterização funcional do grupo de genes obtidos após análises de expressão gênica realizadas para dois grupos classificados quanto à infecção pelo HPV (n=36).....	77
Figura 12	Representação esquemática da via de reparo a erros de pareamento (<i>mismatch repair</i>) em eucariotos.....	78
Figura 13	Diagrama obtido após análise integrada dos dados genômicos e transcriptômicos para 37 CaPe.....	81
Figura 14	Distribuição do coeficiente de correlação de <i>Pearson</i> (<i>r</i>) entre os 1.076 genes com alteração no número de cópias e expressão gênica em CaPe.....	81
Figura 15	Representação gráfica da localização cromossômica dos genes com ganho/aumento de expressão ou perda/diminuição de expressão gênica e $r \geq 0,5$ em CaPe.....	83
Figura 16	Caracterização funcional do grupo de genes obtidos após análise integrada dos dados genômicos e transcriptômicos para CaPe.....	83
Figura 17	Expressão gênica de reguladores transcricionais em CaPe.....	92
Figura 18	Expressão de genes da via de reparo a erros de pareamento (<i>mismatch repair</i>) em eucariotos de acordo com a infecção pelo HPV em CaPe.....	93
Figura 19	Expressão gênica para genes <i>drivers</i> detectados pela análise integrada em CaPe.....	96
Figura 20	Níveis de transcritos em CaPe para genes selecionados com base em sua relevância no câncer.....	98
Figura 21	Associação entre a expressão gênica e características clínicas e patológicas em CaPe.....	100



*Lista de
Tabelas*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características clínicas e histopatológicas das 48 amostras avaliadas no presente estudo.....	27
Tabela 2	Detalhes dos subtipos do HPV detectados nesse estudo de acordo com a classificação histológica das lesões penianas.....	53
Tabela 3	Alterações genômicas encontradas em mais de 20% dos 38 casos de CaPe avaliados.....	58
Tabela 4	Características clínicas e patológicas associadas com as alterações detectadas em mais de 20% dos CaPe avaliados.....	64
Tabela 5	Alterações genômicas que diferenciaram os casos positivos (n=13) e negativos para o HPV (n=25) avaliados por aCGH.....	66
Tabela 6	Frequência e tipo de alteração genômica (ganho/perda) observados para os genes selecionados para validação por qPCR em 34 CaPe.....	95
Tabela 7	Correlação entre resultados obtidos por qPCR e características clínicas e patológicas de 34 pacientes com CaPe.....	99



*Lista de
Quadros*

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Classificação e estadiamento TNM utilizado na classificação dos tumores de pênis.....	6
Quadro 2	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na qPCR.....	43
Quadro 3	Genes descritos na literatura como relacionados ao câncer e com alteração detectada em larga escala selecionados para validação.....	47
Quadro 4	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas análises de expressão dos transcritos por RT-qPCR.....	50
Quadro 5	Relação dos genes diferencialmente expressos presentes nas 10 vias canônicas com maiores <i>scores</i> [-Log(P-valor)].....	73
Quadro 6	Relação dos genes diferencialmente expressos entre dois grupos classificados quanto à infecção pelo HPV presentes nas 10 vias canônicas com maiores <i>scores</i> [-Log(P-valor)].....	77
Quadro 7	Relação dos genes com alteração na expressão gênica determinada por variações genômicas presentes nas 10 vias canônicas com maiores <i>scores</i> [-Log(P-valor)].....	84
Quadro 8	Genes com alterações nos níveis de expressão dos transcritos devido a alterações genômicas em CaPe identificados como potenciais biomarcadores de acordo com o banco de dados do <i>software</i> IPA.....	85

Quadro 9	miRNAs com alterações no número de cópias em mais de 15% dos casos avaliados por aCGH.....	88
Quadro 10	Alterações genômicas para o cromossomo Y e gene <i>MYC</i> detectadas por aCGH e FISH em oito CaPe.....	90
Quadro 11	Combinação entre os resultados de aCGH e expressão gênica em larga escala após análise integrada e possíveis explicações para os eventos encontrados.....	144



*Lista de
Síglas e
Abreviaturas*

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

aCGH*	<i>Array-comparative genomic hybridization</i>
ASCUS*	<i>Atypical squamous cells of undetermined significance</i>
BAC*	<i>Bacterial artificial chromosome</i>
CaPe	Câncer de pênis
cDNA*	<i>Complementary deoxiribonucleic acid</i>
CEC	Carcinoma de células escamosas
CEN	Centrômero
CGH*	<i>Comparative genomic hybridization</i>
Chr	Cromossomo
CIS	Carcinoma in situ
CNA*	<i>Copy number alteration</i>
CNV*	<i>Copy number variation</i>
Cq	Ciclo de quantificação
cRNA*	<i>Complementary ribonucleic acid</i>
CSS*	<i>Cancer specific survival</i>
Cy3*	<i>Cyanine 3</i>
Cy5*	<i>Cyanine 5</i>
DAPI*	<i>4',6'-diamidino-2-phenylindole</i>
dCTP*	<i>Deoxycytidine triphosphate</i>
DFS*	<i>Disease-free survival</i>
DGV*	<i>Database of Genomic Variants</i>
DNA*	<i>Deoxiribonucleic acid</i>
dNTP*	<i>Deoxynucleotide triphosphate</i>
dUTP*	<i>Deoxyuridine triphosphate</i>
EBV*	<i>Epstein-Barr vírus</i>
ECM*	<i>Extracellular matrix</i>
ELISA*	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FDA*	<i>Food and Drug Administration</i>
FDR*	<i>False discovery rate</i>
FGF*	<i>Fibroblast growth factor</i>

FISH*	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
HBV*	<i>Hepatitis B virus</i>
HCl	Ácido clorídrico
HP	Hiperplasia
HPV*	<i>Human papillomavirus</i>
HSIL*	<i>High-grade squamous intraepithelial lesion</i>
IARC*	<i>International Agency for Cancer Research</i>
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IPA*	<i>Ingenuity Pathways Analysis</i>
Kb	kilo pares de bases
KCl	Cloreto de Potássio
Labnet*	<i>HPV Laboratory Network</i>
lncRNA*	<i>Long ncRNA</i>
LOH*	<i>Loss of heterozygosis</i>
LSIL*	<i>Low-grade squamous intraepithelial lesion</i>
Mb	Mega pares de bases
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
miRNA	Micro RNA
MMP	Metaloproteinase
MMR*	<i>Mismatch repair</i>
mRNA*	<i>Messenger RNA</i>
ncRNAs*	<i>Noncoding RNA</i>
na	Não se aplica
nd	Não disponível
NTP*	<i>Nucleoside triphosphate</i>
ORF*	<i>Open reading frame</i>
OS*	<i>Overall survival</i>
pb	Pares de bases
PCR*	<i>Polymerase chain reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PIN*	<i>Penile intraepithelial neoplasia</i>
qPCR*	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>

RBP*	<i>RNA-binding protein</i>
RFLP *	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RNA*	<i>Ribonucleic acid</i>
RNase*	<i>Ribonuclease</i>
RT	Regulador transcricional
RT-qPCR*	<i>Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
SAM*	<i>Significance Analysis of Microarrays</i>
SF	Sítio frágil
sncRNA *	<i>Small ncRNA</i>
snoRNA *	<i>Small nucleolar RNA</i>
SSC*	<i>Saline sodium citrate</i>
TE	Tris-EDTA
TGFB*	<i>Transforming growth factor beta</i>
TNF*	<i>Tumor necrosis factor</i>
UNG*	<i>AmpErase uracil-N-glicosilase</i>
URR*	<i>Upstream regulatory region</i>
VLP*	<i>Virus like particle</i>

** siglas ou abreviaturas derivadas do inglês*



Índice

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Fatores prognósticos	4
1.2	Fatores de risco	7
1.3	Aspectos relacionados ao Papilomavírus Humano (HPV)	10
1.4	Características genéticas do CaPe.....	18
2	JUSTIFICATIVA.....	20
3	OBJETIVOS.....	22
3.1	Geral.....	23
3.2	Específicos	23
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1	Casuística.	25
4.2	Obtenção de ácidos nucleicos	28
4.3	Genotipagem do HPV	29
4.4	Hibridação genômica comparativa baseada em <i>arrays</i> (aCGH).....	30
4.5	Expressão gênica em larga escala	32
4.6	Integração dos dados genômicos e transcriptômicos	35
4.7	Análise da interpretação biológica dos dados utilizando o <i>Ingenuity Pathways Analysis</i> (IPA).....	36
4.8	Validação dos achados	37
4.8.1	Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	37
4.8.2	PCR quantitativa em tempo real (qPCR)	39
4.8.3	RT-PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)	45
5	RESULTADOS.....	51
5.1	Genotipagem do HPV	52
5.2	Experimentos globais de análises genômicas e transcriptômicas	53

5.2.1	Avaliação de ganhos e perdas genômicas	53
5.2.2	Avaliação de alteração na expressão de transcritos	70
5.3	Integração dos dados genômicos e transcriptômicos	79
5.4	Confirmação e validação dos achados obtidos pelas análises de aCGH e expressão gênica global	89
5.4.1	Avaliação de ganhos e perdas genômicas por FISH	89
5.4.2	Avaliação de alterações genômicas e transcriptômicas por PCR quantitativa em tempo real.....	90
6	DISCUSSÃO.....	101
7	CONCLUSÕES	162
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	165

ANEXO

Anexo 1 Detalhe das metodologias aplicadas para a genotipagem do HPV e avaliação das alterações moleculares para cada amostra obtida no presente estudo.



Introdução

1 INTRODUÇÃO

O câncer de pênis (CaPe) é uma neoplasia rara nos países desenvolvidos e possui maior incidência nos países em desenvolvimento. Esse tumor corresponde a até 10% das doenças malignas masculinas em alguns países da África, Ásia e América do Sul e afeta até 20:100.000 homens em certas regiões africanas (MICALI et al. 2006). No Brasil, o CaPe ocorre em 2,9-6,8:100.000 homens, com maiores índices nas regiões Norte e Nordeste (FAVORITO et al. 2008). Nos países desenvolvidos como Estados Unidos e na Europa ocidental a doença ocorre em 0,3-1,0:100.000 homens e corresponde a 0,4-0,6% de todas as doenças malignas masculinas (JEMAL et al. 2007; HARTWIG et al. 2012).

O CaPe afeta homens entre 50 e 70 anos (POW-SANG et al. 2010). Esses tumores podem ocorrer ocasionalmente em homens mais jovens. No Brasil, cerca de 7% dos pacientes com CaPe apresentam idade inferior a 35 anos (FAVORITO et al. 2008; KOIFMAN et al. 2011).

O CaPe ocorre, na maioria das vezes, como carcinoma *in situ* ou invasivo. O carcinoma *in situ* pode estar presente sob duas formas, ambas apresentando um padrão histológico de células epiteliais malignas não invasivas (MICALI et al. 2006). Quando glândula, prepúcio ou haste do pênis são afetados, o carcinoma *in situ* recebe o nome de Eritroplasia de *Queyrat*, enquanto o envolvimento da pele da haste do pênis, escroto ou períneo é conhecido como doença de *Bowen*. A doença de *Bowen* progride para carcinoma invasivo em 5-10% dos casos (SCHELLHAMMER et al.

1992) e a Eritroplasia de *Queyrat* em 10 a 33% dos tumores (GROSSMAN 1992; WIELAND et al. 2000).

Os carcinomas de células escamosas (CEC) compreendem a 95% dos casos de CaPe. O principal subtipo histológico do CEC é conhecido como usual e está presente em aproximadamente 49% dos tumores. Outros subtipos de CEC incluem condilomatoso (17%), verrucoso (8%), papilífero (7%), basalóide (4%), entre outros. Estes tumores possuem padrões infiltrativos e de crescimento variados (CUBILLA et al. 2004; EBLE et al. 2004). Os casos restantes de CaPe (5%) podem estar presentes na forma de carcinoma de células de Merkel, carcinoma sebáceo e carcinoma de células basais (EBLE et al. 2004).

A maioria dos CaPe acomete o epitélio escamoso da glândula (34,8%), podendo também afetar o prepúcio e glândula (34,3%), toda a extensão do pênis (14,8%), prepúcio (6,5%), sulco balanoprepucial (4,8%) e haste do pênis (4,8%) (KOIFMAN et al. 2011).

O diagnóstico do CaPe ocorre, na maioria das vezes, mais tardiamente do que os demais tipos de câncer. Em 15-50% dos pacientes, o atraso do diagnóstico por mais de um ano ocorre como resultado de medo, vergonha, ignorância ou negação pessoal. Muitas vezes a ausência de tratamento adequado leva à morte precoce (MISRA et al. 2004). O diagnóstico inicial de CaPe é realizado por exames clínicos e histopatológicos. Outros procedimentos, tais como tomografia computadorizada e/ou ultrasonografia, podem ser utilizados para avaliação e estadiamento do tumor. O exame inguinal é imprescindível, uma vez que a sobrevivência está diretamente relacionada à presença ou ausência de metástases em nódulos linfáticos regionais (MOSCONI et al. 2005).

A rara incidência de CaPe contribui para a ausência de métodos de tratamento padronizados. Quando o tumor é diagnosticado nos estádios I-II, é observada uma evolução favorável e mais de 80% dos casos são considerados como curados da doença (PIZZOCARO et al. 2010). A ressecção cirúrgica é a principal forma de tratamento, sendo direcionada tanto para o tumor primário quanto para os nódulos linfáticos regionais. A linfadenectomia é frequentemente associada com alto risco de complicações e aumento da morbidade (30-86% dos casos) (LOPES et al. 1996). O diagnóstico preciso do comprometimento linfonodal e a detecção de marcadores confiáveis para a ocorrência de metástases pode resultar em um grande benefício para esses pacientes.

O principal sistema de estadiamento utilizado para CaPe é o TNM (T: tamanho e extensão tumoral, N: comprometimento de linfonodos; M: metástase à distância) (SOBIN e WITTEKIND 2002). Esse sistema descreve a profundidade de invasão e extensão de envoltimentos nodais, sendo por esse motivo utilizado com frequência na prática clínica. O estadiamento TNM para tumores de pênis está representado no **Quadro 1**.

1.1 FATORES PROGNÓSTICOS

O acometimento dos nódulos linfáticos é o principal fator prognóstico para pacientes portadores de CaPe. A presença de linfonodos palpáveis ao diagnóstico varia de 20 a 96% dos casos, sendo que aproximadamente 50% dos casos suspeitos à cirurgia não apresentam evidência de tumor na análise patológica (falso positivo) (GUIMARÃES et al. 2011). O aumento dos linfonodos pode ter como causa

processos inflamatórios resultantes de infecções geradas pelo tumor primário. O comprometimento linfonodal pélvico concomitante ao inguinal está presente em 22-56% dos casos (LEIJTE et al. 2008).

Pacientes com tumores N0 possuem uma sobrevida livre da doença em cinco anos de 75-93%; 40-70% para casos N1 (nódulos linfáticos inguinais solitários e superficiais), 33-50% para N2 (nódulos linfáticos inguinais superficiais múltiplos ou bilaterais) e 20-34% para N3 (nódulos linfáticos pélvicos ou inguinais profundos, unilaterais ou bilaterais) (NOVARA et al. 2007).

O prognóstico de pacientes portadores de metástases linfonodais varia de acordo com número de linfonodos afetados, presença de extensão inguinal uni ou bilateral, envolvimento de linfonodos pélvicos e extensão extranodal (PANDEY et al. 2006). Dados em literatura demonstraram uma correlação negativa entre o número de linfonodos metastáticos e sobrevida. Há significativa diminuição na sobrevida livre de doença em cinco anos quando mais de dois linfonodos regionais estão comprometidos por metástases (POW-SANG et al. 1990; HORENBLAS et al. 1993). Com relação à localização dos linfonodos comprometidos, geralmente em posição inguinal ou pélvica, foi demonstrada diminuição da sobrevida em cinco anos em pacientes portadores de CaPe com metástase em linfonodos pélvicos quando comparado a pacientes com doença inguinal (PANDEY et al. 2006).

O subtipo e o grau histológico dos tumores primários também são fatores preditivos de metástases linfonodais. As metástases linfonodais estão praticamente ausentes em CEC verrucoso de pênis, com índices que chegam a 30% de comprometimento em CEC usual e 100% em carcinoma do tipo basalóide (DAI et al. 2006). Além disso, tumores grau I possuem risco de metástase de 0-48%, 32-79%

para grau II e 47-100% para tumores grau III (LOPES et al. 1996; BEZERRA et al. 2001; FICARRA et al. 2005).

Além das características clínico-patológicas, diversos marcadores moleculares foram associados à predição de comprometimento linfonodal em tumores de pênis. Como exemplo podemos citar a expressão alterada das proteínas TP53, Ki-67 e PCNA, as quais foram correlacionadas positivamente com envolvimento linfonodal em pacientes com CaPe (LOPES et al. 2002; GUIMARÃES et al. 2006; PROTZEL et al. 2007).

Quadro 1 - Classificação e estadiamento TNM utilizado na classificação dos tumores de pênis.

Classificação			
T: tumor primário			
TX	Tumor primário não pode ser avaliado		
T0	Sem evidência de tumor primário		
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>		
Ta	Carcinoma verrucoso não-invasivo		
T1	Tumor invade tecido conjuntivo sub-epitelial		
T2	Tumor invade corpo esponjoso ou cavernoso		
T3	Tumor invade uretra ou próstata		
T4	Tumor invade outras estruturas adjacentes		
N: nódulos linfáticos regionais			
NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados		
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais		
N1	Metástase em um único linfonodo inguinal superficial		
N2	Metástase em linfonodos inguinais superficiais múltiplos ou bilaterais		
N3	Metástase em linfonodo(s) inguinal(ais) profundo(s) ou , pélvico(s), uni ou bilateral(ais)		
M: metástase à distância			
MX	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada		
M0	Ausência de metástase à distância		
M1	Metástase à distância		
Estadiamento			
Estadio 0	Tis	N0	M0
	Ta	N0	M0
Estadio I	T1	N0	M0
Estadio II	T1	N1	M0
	T2	N0, N1	M0
Estadio III	T1, T2	N2	M0
	T3	N0, N1, N2	M0
Estadio IV	T4	Qualquer N	M0
	Qualquer T	N3	M0
	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: adaptado de SOBIN e WITTEKIND (2002)

1.2 FATORES DE RISCO

Um dos principais fatores considerados de risco para o desenvolvimento do tumor é a ausência de circuncisão (remoção do prepúcio do pênis) em meninos durante a infância. É curioso o fato de que a incidência de tumores é alterada de acordo com o período em que a circuncisão é realizada. Na população de judeus, a circuncisão ocorre no período neonatal e esses indivíduos praticamente não desenvolvem CaPe (LICKLIDER 1961). Em estudos caso-controle na população em geral, foi observado risco aumentado para o desenvolvimento de tumores de pênis em indivíduos que não foram circuncidados durante a infância, grupo que inclui meninos com até 10 anos de idade (TSEN et al. 2001; DALING et al. 2005). Quando realizada durante a adolescência a circuncisão ainda possui efeito protetor; porém o mesmo se apresenta menos significativo. Isso pode ser observado entre os muçulmanos, população na qual os indivíduos são circuncidados após a puberdade e raramente possuem CaPe (GOEL e SINGH 1977). Em adultos, a circuncisão parece não oferecer proteção ao aparecimento de CaPe (TSEN et al. 2001; DALING et al. 2005).

O mecanismo pelo qual a presença/ausência de circuncisão interfere no desenvolvimento do CaPe ainda não está completamente elucidado e várias hipóteses foram formuladas. O desenvolvimento do tumor é muitas vezes atribuído aos efeitos inflamatórios e irritativos do esmegma, um bioproduto da ação bacteriana nas células epiteliais esfoliadas do pênis que vem sendo descrito como um agente carcinogênico na etiologia do CaPe (SOBEL e PLAUT 1949). Assim, homens não circuncidados possuiriam maior acúmulo do esmegma no pênis e estariam sob maior risco de

desenvolvimento do tumor. Além disso, alguns estudos sugerem que homens não submetidos à circuncisão estariam mais suscetíveis à infecção por vírus, entre eles o vírus do papiloma humano (HPV, do inglês, *Human papillomavirus*). BACKES et al. (2012) demonstraram maior prevalência de lesões penianas planas, as quais são causadas pelo HPV, em homens não circuncidados (26%) quando comparados a homens submetidos à retirada do prepúcio (0,7%), demonstrando uma clara relação entre infecção pelo HPV e circuncisão. A ausência de circuncisão é também muitas vezes associada à incapacidade de retração do prepúcio, doença conhecida como fimose, outro fator importante provavelmente envolvido na etiologia do CaPe (DALING et al. 2005).

A fimose é encontrada em 44-85% dos pacientes com CaPe e acredita-se que a incidência precisa da doença seja ainda maior, uma vez que não há informações precisas em muitos casos, nos quais o prepúcio foi extinto pelo tumor (DILLNER et al. 2000). Estudos caso-controle demonstram aumento substancial de até 65 vezes no risco relativo de desenvolvimento de tumores de pênis em homens com fimose (DILLNER et al. 2000; DALING et al. 2005). Os mecanismos pelos quais a fimose pode levar ao desenvolvimento de CaPe ainda são controversos. DALING et al. (2005) propuseram que em homens adultos a fimose seria responsável por episódios constantes de inflamação da glândula e do prepúcio, o que poderia predispor ao desenvolvimento de tumores. Já HELLBERG et al. (1987) sugeriram que indivíduos com fimose tendem a reter maior quantidade de esmegma no pênis, o que poderia levar a hiperplasia epitelial, assim como observado em experimentos envolvendo ratos.

Adicionalmente, o CaPe frequentemente está associado a homens que possuem baixo nível sócioeconômico, provavelmente devido à má higiene pessoal (PANDA e NAYAK 1980). TSEN et al. (2001) não encontraram relação entre características ligadas à higiene e risco de CaPe. Em um estudo caso-controle da população chinesa, BRINTON et al. (1991) relataram risco aumentado de desenvolvimento do tumor em homens que possuem somente acesso a banheiros comunitários quando comparados àqueles que se banham em sua própria casa.

O tabaco é outro fator que vem sendo amplamente associado ao desenvolvimento de tumores de pênis. O fumo é capaz de influenciar a carcinogênese não somente nos sítios em contato direto com a fumaça inalada, mas também em locais distantes via sistema circulatório (WINKELSTEIN 1977). A nicotina e a cotinina foram encontradas na mucosa cervical de mulheres fumantes e acredita-se que essas substâncias sejam capazes de se acumular também em secreções penianas e estar associada com o desenvolvimento de tumores no local (CASTONGUAY et al. 1983; SASSON et al. 1985). Diversos estudos demonstraram aumento na incidência de CaPe em homens fumantes quando comparados a homens que não fizeram uso do tabaco (HELLBERG et al. 1987; DALING et al. 1992; MADEN et al. 1993; TSEN et al. 2001; DALING et al. 2005).

Em um estudo recente, ZEQUI et al. (2012) propuseram a zoofilia como um novo fator associado com o desenvolvimento dos tumores de pênis. Baseados no fato da zoofilia ser uma prática masculina comum no meio rural, os autores realizaram um estudo caso-controle da população brasileira compreendendo 118 pacientes com CaPe e 374 homens sem a doença. Este hábito foi reportado por 44,9% dos indivíduos portadores de CaPe contra 31,6% para homens do grupo controle, sendo

confirmado como fator de risco nessa população após a análise multivariada. Os autores propuseram que o contato que ocorre entre o tecido peniano e a mucosa genital animal pode resultar em microtrauma e também na exposição a fluídos anogenitais animais, os quais podem ser antigênicos ou carcinogênicos em humanos.

Outros fatores de risco associados ao CaPe incluem o sedentarismo, condições inflamatórias crônicas, lesões penianas, história de tratamento prévio com psoralen ou ultravioleta A e contágio com o HPV (DILLNER et al. 2000).

1.3 ASPECTOS RELACIONADOS AO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

O HPV é composto por um DNA circular em dupla fita e pertence à família *Papillomaviridae* (DE VILLIERS et al. 2004). O vírus é comumente transmitido sexualmente (STANLEY 2010). Têm sido relatados 148 subtipos do HPV, os quais variam na composição genética e potencial oncogênico (POLJAK 2011). Alguns genótipos virais estão envolvidos em mecanismos carcinogênicos, os chamados HPV de alto risco (HPV16, 18, 31, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 59, 66, 68, 69, 73 e 82), enquanto outros praticamente não possuem associação com câncer e são chamados HPV de baixo risco (HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e CP6108) (MUÑOZ et al. 2003).

Apesar da relação causal bem estabelecida entre a infecção pelo HPV e o desenvolvimento de câncer cervical demonstrada por estudos epidemiológicos e moleculares, apenas uma fraca relação é observada entre o vírus e outros tipos de câncer, tais como de vulva, ânus e pênis (ZUR HAUSEN 2009). No entanto, a

Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (do inglês, *International Agency for Cancer Research – IARC*) concluiu haver evidência suficiente para comprovar o potencial carcinogênico do HPV em pênis, ânus, cavidade oral, orofaringe e tonsila (IARC 2009).

A prevalência da infecção por HPV em CaPe varia de acordo com o estudo realizado, os quais incluem desde um pequeno número de casos até mais de 170 pacientes. Para o nosso conhecimento, o maior estudo envolvendo genotipagem do HPV avaliou 171 CaPe fixados em formalina e em blocos de parafina, o qual levou a detecção do HPV em 29,2% (LONT et al. 2006). No entanto, alguns estudos menores descrevem infecções que ocorrem em mais que 60% dos casos avaliados (SALAZAR et al. 2005; PASCUAL et al. 2007, entre outros). Essa variação pode ser explicada, entre outros fatores, pela utilização de diferentes métodos de detecção (PCR, hibridação *in situ*, *Southern blot*), pela forma de preservação do tecido (congelado, a fresco ou em parafina), pequeno número de amostras, ou ainda devido à presença de diferentes subtipos histológicos em um mesmo grupo amostral. Isso porque, assim como bem estabelecido para carcinomas de vulva e cabeça e pescoço, os CECs dos subtipos basalóide ou condilomatoso possuem maior associação com a presença do HPV de alto risco, o que pode ser observado em 70 a 100% dos casos e torna a relação etiológica entre HPV e CaPe mais plausível (CUBILLA et al. 1998; RUBIN et al. 2001). Já os tumores verrucosos tendem a ser negativos para HPV (DIANZANI et al. 1998; STANKIEWICZ et al. 2009). Essa variação na incidência de CaPe levou à proposição de diferentes vias no desenvolvimento do CaPe: uma relacionada ao HPV e outra independente da infecção (RUBIN et al. 2001; GROSS e PFISTER 2004).

Apesar da grande variação descrita na prevalência dos CaPe, duas meta-análises apresentaram de forma resumida os dados mais significativos envolvendo CaPe e infecção pelo HPV (BACKES et al. 2009; MIRALLES-GURI et al. 2009). MIRALLES-GURI et al. (2009) avaliaram mais de 1.400 casos de CaPe, sendo a positividade para o HPV detectada em 47% dos casos, com maior prevalência nos casos basalóides (76%) e menores taxas de infecção no subtipo verrucoso (24,5%). O HPV16 foi detectado com maior frequência (60,2%), seguido pelo HPV18 (13,3%), independentemente do subtipo histológico avaliado.

Já na compilação de dados realizada por BACKES et al. (2009) foi relatado que pacientes com CEC peniano tinham uma prevalência do HPV que variava de 39,7% na América do Sul a 59,3% na Ásia. Quatro tipos predominantes do HPV foram encontrados: HPV16 (30,8%), HPV6 (6,7%), HPV18 (6,6%) e HPV5 (5,6%). As outras formas do HPV estudadas apresentaram uma prevalência inferior a 2%. Foi observada maior prevalência do HPV16 em indivíduos residentes na América do Norte (39,4%), Europa (32,9%) e América do Sul (20,3%), enquanto o HPV6 foi mais prevalente na Ásia (35,9%).

O genoma do HPV pode ser dividido em três domínios: a URR (do inglês, *Upstream regulatory region*) não-codificadora, uma região precoce com as ORFs (do inglês, *Open reading frame*) *E6*, *E7*, *E1*, *E2*, *E4* e *E5* e uma região tardia contendo os genes *L1* e *L2*, responsáveis por codificar proteínas do capsídeo. Embora ainda não esteja completamente elucidado, o mecanismo de indução e promoção do CaPe causado pelo HPV parece ser semelhante ao que ocorre para carcinoma do colo uterino. Nesses tumores, está bem caracterizado que os genes *E6* e *E7* mostram expressão aumentada quando o DNA viral se incorpora ao genoma humano. As

oncoproteínas E6 e E7 antagonizam as proteínas supressoras de tumor TP53 e RB1 humanas, respectivamente, o que leva a alterações nas vias p14^{ARF}/MDM2/TP53 e p16^{INK4a}/ciclina D/RB1 e interfere no controle da divisão celular e apoptose (SARKAR et al. 1992; ZUR HAUSEN 2002). A expressão das proteínas chave RB1 e p16^{INK4A} foram avaliadas recentemente em 188 CECs de pênis (STANKIEWICZ et al. 2011a). Foi observado que, assim como em carcinomas cervicais, infecções pelo HPV foram capazes de alterar a via do RB/p16^{INK4A} pela diminuição da expressão de RB1 e aumento nos níveis de p16^{INK4A}, o que se manifestou pelo acúmulo dessa proteína e consequente falha no bloqueio da progressão do ciclo celular nos tumores de pênis. Essas alterações foram recorrentes em tumores basalóides, que possuem alta relação com infecção por HPV, intermediárias em CECs usuais (cerca de 50%) e praticamente ausentes em CECs verrucosos.

A relação entre a infecção pelo HPV e alterações genômicas em *TP53* e em seu produto protéico foram descritas para CaPe em alguns estudos. YANAGAWA et al. (2008) descreveram mutações em *TP53* somente em casos negativos para o HPV, sugerindo que essa alteração genética adicional deve ser necessária à patogênese dos CaPe em casos sem infecção viral. Além disso, altos níveis de expressão da proteína TP53 em tumores de pênis positivos para HPV foram relatados em 24-100% dos casos (LAM et al. 1995; LAM e CHAN 1999; GENTILE et al. 2006; YANAGAWA et al. 2008). Esses dados demonstram que pelo menos uma parte dos CaPe apresenta mecanismos de oncogênese relacionados ao HPV, semelhante ao que ocorre nos carcinomas cervicais.

A integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro é amplamente relatada em carcinomas, principalmente em tumores da região cervical, sendo um evento

crucial na oncogênese (JEON e LAMBERT 1995; KALANTARI et al. 2001; DALL et al. 2008). Esta integração pode levar tanto a ativação como a inativação de genes celulares envolvidos no processo tumoral. Apesar de uma série de sítios de integração para o HPV terem sido descritos, a região cromossômica envolvendo o gene *MYC*, localizado em 8q24, é um dos principais locais de inserção do vírus e ocorre em aproximadamente 10% das neoplasias genitais (PETER et al. 2006).

Os efeitos da integração do HPV na estrutura gênica e nível dos transcritos das células hospedeiras humanas foram avaliados em cinco linhagens celulares com integração viral em *MYC*, sendo quatro obtidas a partir de células de carcinomas cervicais e uma proveniente de CaPe (PETER et al. 2006). Os autores relataram ampliações e aumento da expressão do gene *MYC* na linhagem de CaPe (12-17 cópias, 3-10 vezes com aumento da expressão do transcrito). Foi também encontrada amplificação das regiões adjacentes ao *MYC* com amplicons que variaram de menos de 50 a 800Kb. Entretanto, um estudo recente avaliou 79 tumores de pênis (11 carcinomas *in situ* e 68 invasivos) e não encontrou associação entre a amplificação do *MYC* e infecção pelo HPV (MASFERRER et al. 2012). No entanto, foi observada uma correlação entre a infecção viral e o aumento nos níveis protéicos de MYC, o que refletiria a ativação da proteína como um mecanismo associado a oncogênese dos CaPe mediados pelo HPV. Embora análises adicionais sejam necessárias para elucidar a relação entre o HPV e alterações em *MYC*, esses estudos demonstram uma influência da infecção viral no número de cópias e expressão gênica e protéica desse gene, o que contribui para o desenvolvimento e/ou progressão dos tumores.

Acredita-se ainda que outras alterações genéticas e epigenéticas subsequentes à integração do HPV estejam envolvidos na carcinogênese relacionada ao vírus em

CaPe. LEIS et al. (1998) avaliaram a presença do HPV e mutações nos genes *TP53* e *HRAS* em um CEC de pênis e em duas metástases inguinais desenvolvidas pelo mesmo paciente cinco e sete anos após a cirurgia para a retirada do tumor primário. Foi observada infecção por HPV18 no tumor primário e nas duas metástases e alterações em *HRAS* somente na metástase detectada sete anos após a retirada do tumor primário. A presença de mutações em *HRAS* somente na segunda metástase do paciente sugere que a ativação desse gene corresponde a um evento tardio na progressão maligna associada ao HPV18 em CEC de pênis. STANKIEWICZ et al. (2011b) demonstraram alterações na via HER/PTEN/AKT devido à infecção pelo HPV em CEC de pênis. Foram avaliadas as proteínas EGFR fosforilada (pEGFR), HER2, HER3, HER4, AKT fosforilada (pAkt), AKT1 e PTEN e observou-se maior frequência de expressão de HER3 e menor positividade para pEGFR em casos positivos quando comparados a casos negativos para infecção viral. Esses dados demonstraram o envolvimento de membros dos receptores de fatores de crescimento da família HER na carcinogênese de pênis mediada pelo HPV e sugeriram que terapias direcionadas a esses alvos podem beneficiar pacientes com CaPe.

A infecção por HPV e sua relação com o prognóstico de pacientes com CaPe é ainda controversa. Em um estudo realizado por GREGOIRE et al. (1995), o DNA do HPV foi detectado com maior frequência em pacientes com tumores de pênis mais agressivos, os quais possuíam maior infiltração e elevado grau tumoral. BEZERRA et al. (2001) encontraram DNA do vírus com maior abundância em tumores de grau histológico I. Os autores não relataram qualquer associação entre a presença do vírus e metástases linfonodais ou sobrevida. Entretanto, LONT et al. (2006) indicaram um aumento na sobrevida de pacientes com CaPe HPV positivos

quando comparados a pacientes em que o vírus estava ausente. Segundo os autores, a sobrevida aumentada desses indivíduos pode estar associada a um menor número de alterações genéticas na presença do vírus, semelhante ao observado em CEC de cabeça e pescoço (BRAAKHUIS et al. 2004).

Atualmente há duas vacinas profiláticas contra HPV aprovadas em 2009 pelo *Food and Drug Administration* (FDA), sendo uma bivalente (HPV16/18), desenvolvida para a prevenção de carcinoma cervical em mulheres de 10-25 anos, e outra quadrivalente (HPV16/18/6/11), aprovada para uso em mulheres e contra verrugas genitais em homens. As vacinas são baseadas no uso de VLPs (do inglês, *Virus like particles*), as quais são derivadas da proteína estrutural do capsídeo L1 do HPV. Como as VLPs não possuem DNA viral, elas não são capazes de induzir câncer.

Embora a indicação masculina da vacina esteja relacionada à prevenção de verrugas genitais, acredita-se que cânceres anais, penianos e de orofaringe possam também ser evitados (MARKOWITZ et al. 2007; SASLOW et al. 2007). Mesmo com indicação da vacina quadrivalente tanto para homens quanto para mulheres, o público feminino têm sido o principal alvo para vacinação devido à alta prevalência de carcinomas cervicais.

A importância da imunização em homens foi demonstrada em um trabalho de LU B et al. (2011). Os autores avaliaram por ELISA a soro-prevalência dos HPV6, 11, 16 e 18, todos presentes na vacina quadrivalente, em 1.477 homens residindo no Brasil, México e Estados Unidos. A infecção por pelo menos um dos quatro subtipos virais foi detectada em 499 homens (33,8% do total avaliado), com risco aumentado para aqueles que praticam sexo com homens (65,6%) e com ambos os sexos (59,4%).

A soro-prevalência dos HPVs avaliados aumentou de acordo com a idade dos indivíduos. Esses dados demonstram alta frequência de exposição ao HPV em homens e revela a importância da imunização nesse grupo de indivíduos.

Alguns *clinical trials* avaliaram a imunogenicidade e a tolerância da vacina profilática quadrivalente no sexo masculino, demonstrando bons resultados (REISINGER et al. 2007; VESIKARI et al. 2010). REISINGER et al. (2007) avaliaram 1.781 crianças entre 9-15 anos que utilizaram a vacina quadrivalente e detectaram soropositividade (presença do anticorpo contra HPV) em 99,5% dos indivíduos no mês sete e 91,5% de positividade do anticorpo no mês 18. As taxas foram similares para meninos e meninas. Já VESIKARI et al. (2010) avaliaram mais de 1.100 homens de 9-26 anos, sendo que aproximadamente 100% dos indivíduos tornaram-se soropositivos após as três doses da vacina e >92,5% continuaram soropositivos um ano após a aplicação.

A avaliação quanto ao aparecimento de verrugas genitais foi realizada por HILLMAN et al. (2012). Esse *clinical trial* fase III avaliou aproximadamente 3.400 homens heterossexuais entre 16-23 anos e 600 homossexuais com idade entre 16-26 anos divididos em dois grupos (vacina quadrivalente e placebo). As análises revelaram redução de 90,4% de aparecimento de verrugas genitais no grupo que recebeu a vacina em relação aos pacientes placebo (três casos no grupo com vacina *versus* 31 no grupo placebo). Quanto à neoplasia intraepitelial, foram verificadas três casos de PIN (do inglês, *Penile intraepithelial neoplasia*) no grupo placebo contra nenhum caso no grupo vacinado. Não foram observados casos de câncer genitais (pênis, perineal ou perianal) em nenhum dos grupos avaliados. Esses dados demonstram que a vacina se apresentou eficaz contra o aparecimento de verrugas

genitais e, embora dados relacionados a câncer ainda sejam escassos, os resultados preliminares indicam segurança e eficácia da vacina em homens para prevenção de tumores.

1.4 CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS DO CAPE

O conhecimento sobre marcadores genéticos relacionados ao CaPe é extremamente limitado, principalmente quando comparado a outros tipos de carcinomas. Os relatos são geralmente limitados a genes específicos sem uma abordagem de triagem de alterações em larga escala. Em uma recente revisão, CALMON et al. (2011) salientaram a importância de estudos moleculares para se identificar marcadores diagnósticos e prognósticos para este tipo de tumor a fim de se obter melhorias tanto nas taxas de mortalidade como em novas estratégias de tratamento.

Até o momento, foram descritas inativação por metilação para os genes *FHIT*, *RUNX3* e *CDKN2A* (FERREUX et al. 2003; YANAGAWA et al. 2008), mutações em *PIK3CA*, *HRAS*, *KRAS*, *TP53* e *CDKN2A* (ANDERSSON et al. 2008), perda de heterozigose (do inglês, *Loss of heterozygosis* - LOH) em marcadores localizados nas regiões 2q, 6p, 8q, 9p, 12q e 17p13 (POETSCH et al. 2007), assim como alteração no perfil de expressão para diversas proteínas avaliadas por imunohistoquímica (MARTINS et al. 2002; GOLIJANIN et al. 2004; SAEED et al. 2005; CAMPOS et al. 2006; GUIMARÃES et al. 2006; SOARES et al. 2006; PROTZEL et al. 2008).

Há um número limitado de estudos utilizando métodos de triagem em larga escala em CaPe. ALVES et al. (2001) utilizaram CGH (do inglês, *Comparative*

genomic hybridization) cromossômico em 26 casos de CEC de pênis. Foram observados ganhos em 8q24, 16p11-12, 20q11-13, 22q, 19q13 e 5p15 e perdas em 13q21-22, 4q21-32 e cromossomo X. Este padrão de perdas e ganhos foi concordante ao observado em outros CECs, sugerindo aos autores que os tumores de diferentes localizações se desenvolvem por mecanismos moleculares similares (LIEHR et al. 1998; WOLFF et al. 1998). Não foi observada associação entre alterações cromossômicas e grau ou estadió tumoral, embora houvesse uma tendência a menor sobrevida em casos que apresentavam um número menor de alterações genômicas.

Para o nosso conhecimento, há apenas um relato em literatura que descreveu os resultados da análise de *microarray* em CaPe. KROON et al. (2008) avaliaram o perfil de expressão gênica como possível fator preditivo para o desenvolvimento de metástases linfonodais em pacientes com tumores de pênis. Amostras tumorais de 56 pacientes com CEC de pênis (36 com metástases linfonodais) foram avaliadas em plataformas de expressão gênica de 35K. Os 56 pacientes foram divididos em dois grupos: treinamento e validação. Um classificador gênico foi construído para prever o envolvimento linfonodal baseado no padrão de expressão gênica global entre indivíduos linfonodo-positivos e negativos no grupo de treinamento. O classificador construído separou corretamente 29/30 casos (96%) no grupo de treinamento, enquanto para o grupo de validação foram classificados de forma correta somente 14/26 amostras (56%). Dessa forma, o perfil de expressão gênica global não produziu um classificador preciso para prever o envolvimento de linfonodos em pacientes portadores de CaPe. Assim, a busca por fatores preditivos precisos e não-invasivos para esse tipo tumoral é ainda uma área de pesquisa importante, porém pouco explorada.



Justificativa

2 JUSTIFICATIVA

O conhecimento das alterações genéticas relacionadas ao desenvolvimento de CaPe é bem limitado, devido principalmente a sua rara incidência. Entretanto, o tratamento por procedimento cirúrgico, processo mais frequentemente utilizado para controle local da doença, pode levar a amputação parcial ou total do órgão, com subsequente morbidade psicosexual. Assim, a caracterização genética dos CaPe é de extrema importância para aumentar o conhecimento da biologia tumoral na tentativa de desvendar marcadores moleculares e alvos terapêuticos, minimizando as consequências físicas, sexuais e psicológicas que são geradas nestes pacientes.

A maioria das pesquisas tem avaliado o envolvimento do HPV em CaPe e a relação entre expressão diferencial de alguns genes e proteínas e o desenvolvimento tumoral. No presente estudo, foram avaliadas amostras tumorais (n=43), carcinoma *in situ* (n=2), hiperplasia (n=1), metástase (n=1) e recidiva (n=1) por metodologias em larga escala. Após a obtenção dos dados genômicos e transcriptômicos foi realizada a integração destes resultados em um grupo contendo informações disponíveis para as duas metodologias. Os dados moleculares foram comparados a características clínicas e patológicas e de acordo com a genotipagem para o HPV. Com essas análises, foi possível a identificação de genes *drivers* relacionados à biologia dos tumores de pênis, bem como moléculas que poderão ser utilizadas como alvos terapêuticos e fatores prognósticos.



Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

- Identificar alterações no número de cópias genômicas (ganhos e perdas) e no padrão de expressão gênica, bem como o perfil integrado dos dados genômicos e transcriptômicos, para identificar candidatos a biomarcadores em tumores de pênis.

3.2 ESPECÍFICOS

- Caracterizar genes ou sequências alteradas por métodos funcionais *in silico*;
- Confirmar os ganhos e as perdas genômicas pelas metodologias de qPCR e FISH e compará-los com os obtidos na análise de aCGH;
- Confirmar o padrão de expressão de transcritos por RT-qPCR e compará-los com resultados obtidos na análise de expressão gênica por *microarrays*;
- Comparar os resultados entre dois grupos classificados quanto à infecção pelo HPV;
- Correlacionar os dados com características clínicas e histopatológicas (idade, raça, história familiar de câncer, fimose, tabagismo, elitismo, estadió clínico, grau histológico, estadió T, metástase linfonodal, recidiva, metástase à distância, segundo tumor primário, invasão perineural e angiolinfática e comprometimento de margens cirúrgicas).



*Material e
Métodos*

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

Foram obtidas 48 lesões penianas, sendo 22 provenientes do Hospital do Câncer de Barretos/SP e 26 do Banco de Tumores do Hospital A.C. Camargo/SP. Todos os casos preencheram os critérios de inclusão (ausência de tratamentos quimio ou radioterápico prévios à cirurgia) e exclusão (metástase à distância ao diagnóstico).

Entre os 48 casos, 43 eram CECs primários (ver subtipos na **Tabela 1**), dois carcinomas *in situ* (CIS), uma hiperplasia (HP), uma metástase de tumor de pênis para linfonodo e uma recidiva. A recidiva foi detectada aproximadamente um ano e dez meses após a exérese de carcinoma de pênis em um paciente com 37 anos. O tumor primário correspondente fez parte da casuística desse estudo e apresentava grau II e estadio T3, enquanto a recidiva possuía grau II e estadio T1. Embora o projeto inicialmente proposto envolvesse somente a análise dos tumores malignos de pênis (n=43), todas as amostras com material disponível foram submetidas aos experimentos a fim de se realizar análises adicionais (**Anexo 1**). Quatro amostras de glândula histologicamente normais (idade: 47-77 anos) obtidas a partir de autópsia de homens adultos foram utilizadas como referência para as análises de expressão gênica em larga escala. Para a validação dos transcritos, foram avaliadas as mesmas amostras de glândula e 13 prepúcios normais obtidos de recém-nascidos. Foram também obtidas 10 amostras de sangue de indivíduos sem histórico de câncer pessoal ou na família como controle normal para confirmação dos dados de ganhos e perdas

genômicas. Os tecidos congelados das lesões penianas foram macrodissecados manualmente para assegurar a presença de pelo menos 70% de células da lesão. A descrição detalhada das amostras submetidas a cada metodologia empregada nesse estudo está representada na **Figura 1**. Os dados clínicos e histopatológicos foram obtidos para todos os pacientes investigados neste estudo e estão listados na **Tabela 1**. Todas as amostras foram coletadas após obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dos pacientes ou responsáveis e aprovação do projeto pelo Comitê de Ética do Hospital AC Camargo (Processo 1230/2009) e do Hospital do Câncer de Barretos (Processo 363/2010).

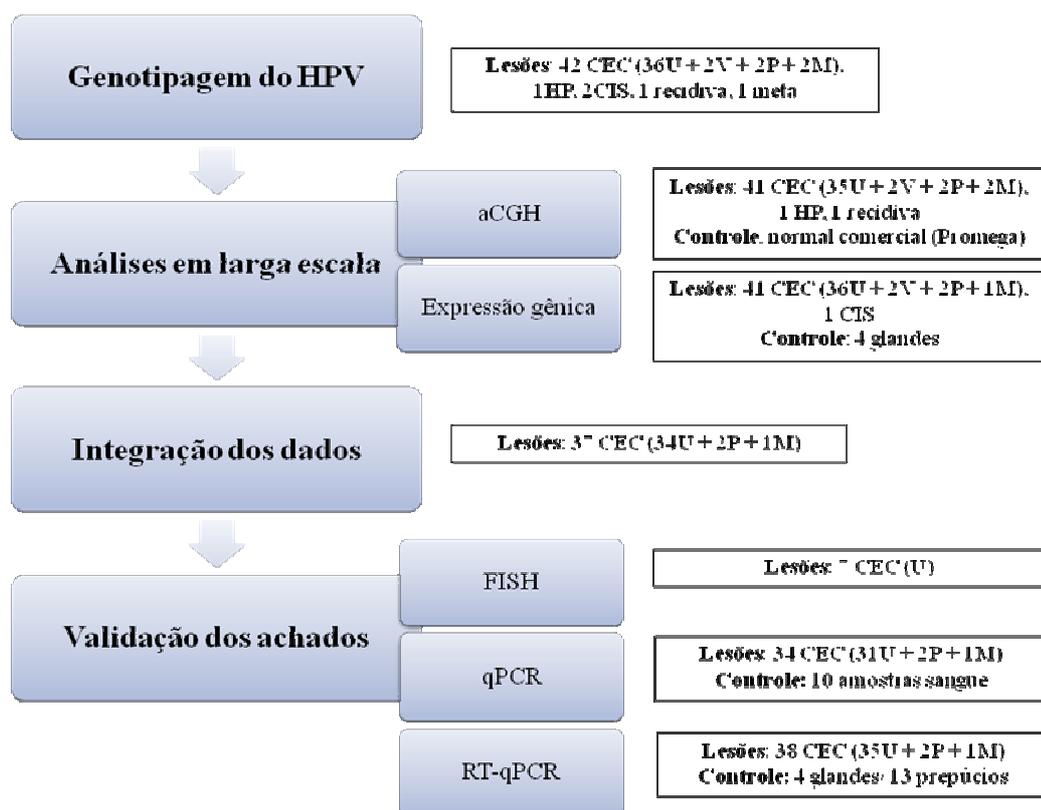


Figura 1 - Fluxograma ilustrando metodologias e casuística empregadas no presente estudo. As lesões penianas e controles normais utilizados estão descritos à frente de cada metodologia. CEC: carcinoma de células escamosas; U: usual; V: verrucoso; P: papilífero; M: misto; HP: hiperplasia; CIS: carcinoma *in situ*.

Tabela 1 - Características clínicas e histopatológicas das 48 amostras avaliadas no presente estudo.

Variável*	Lesão peniana (n=48) n (%)	Variável*	Lesão peniana (n=48) n (%)	Variável*	Lesão peniana (n=48) n (%)	Variável*	Lesão peniana (n=48) n (%)
<i>Histologia¹</i>		<i>Estadio clínico⁴</i>		<i>Raça⁵</i>		<i>Invasão perineural</i>	
CEC Usual	37 (77,1)	I-II	20 (41,7)	Branco	27 (56,3)	Presente	9 (18,8)
CEC Verrucoso	2 (4,2)	III-IV	16 (33,3)	Não-branco	14 (29,2)	Ausente	23 (47,9)
CEC Papilífero	2 (4,2)	nd	10 (20,8)	Nd	7 (14,6)	nd	12 (25,0)
CEC Misto	2 (4,2)	na	2 (4,2)			na	4 (8,3)
Recidiva	1 (2,1)			<i>Fimose</i>			
CIS	2 (4,2)	<i>Grau histológico</i>		Sim	13 (27,1)	<i>Invasão angiolinfática</i>	
Metástase	1 (2,1)	I	9 (18,8)	Não	5 (10,4)	Presente	3 (6,3)
HP	1 (2,1)	II	19 (39,6)	Nd	30 (62,5)	Ausente	29 (60,4)
		III	11 (22,9)			nd	12 (25,0)
<i>Idade (anos)</i>		na	9 (18,8)	<i>Tipo de cirurgia</i>		na	4 (8,3)
Mediana (min-max)	55 (24-91)			Postectomia	1 (2,1)		
		<i>Segundo tumor primário</i>		Glandectomia	1 (2,1)	<i>Metástase linfonodal</i>	
<i>Seguimento (meses)</i>		Sim	3 (6,3)	Penectomia	39 (81,2)	Sim	10 (20,8)
Mediana (min-max)	8,7 (1,6-58,6)	Não	37 (77,1)	Nd	7 (14,6)	Não	11 (22,9)
		nd	4 (8,3)			nd	24 (50,0)
<i>Infecção HPV</i>		na	4 (8,3)	<i>Recidiva</i>		na	3 (6,3)
Positivo	18 (37,5)			Sim	7 (14,6)		
Negativo	29 (60,4)	<i>Tabaco</i>		Não	32 (66,7)	<i>Margens cirúrgicas</i>	
nd ²	1 (2,1)	Sim	12 (25,0)	Nd	5 (10,4)	Livres	29 (60,4)
		Não	28 (58,3)	Na	4 (8,3)	Comprometidas	6 (12,5)
<i>Estadio T³</i>		nd	8 (16,7)			nd	13 (27,1)
Tis	2 (4,2)			<i>Metástase à distância</i>			
T1-T2	21 (43,8)	<i>Álcool</i>		Sim	3 (6,3)	<i>História familiar de câncer</i>	
T3-T4	11 (22,9)	Sim	8 (16,7)	Não	38 (79,2)	Sim	12 (25,0)
nd	10 (20,8)	Não	32 (66,7)	Nd	4 (8,3)	Não	22 (45,8)
na	3 (6,3)	nd	8 (16,7)	Na	3 (6,3)	nd	14 (29,2)

* nd: informação não disponível; na: variável clínica não se aplica; ¹CEC: carcinoma de células escamosas, CIS: carcinoma *in situ*, HP: hiperplasia; ²Informação não obtida para o caso PA22T devido à indisponibilidade de DNA para análise de genotipagem; ³Estadiamento do tumor com base no Sistema TNM de classificação dos tumores malignos (Fonte: SOBIN e WITTEKIND 2002); ⁴Estadiamento do tumor com base em exames físicos e complementares; ⁵A raça branca e não branca foi incluída por auto-designação.

4.2 OBTENÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS

As amostras de DNA foram obtidas para a realização dos experimentos de genotipagem do HPV, aCGH (do inglês, *Array comparative genomic hybridization*) e validação pela qPCR. O método de isolamento do DNA consistiu na digestão da amostra com proteinase K 10mg/μL (Sigma-Aldrich, MO, USA), extração das proteínas e dos ácidos graxos pela ação de solventes orgânicos (fenol/clorofórmio) (Invitrogen, CA, USA) e precipitação com etanol 100%. Após a extração do DNA, as amostras foram tratadas com RNase A de acordo com protocolo do *MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit* (Epicentre Biotechnologies, WI, USA) com o objetivo de eliminar RNA contaminante.

A extração de RNA ocorreu para casos e controles utilizando o *Rneasy Mini Kit* (Qiagen, TE, USA). Essas amostras foram utilizadas nos experimentos de expressão gênica global e RT-qPCR. O controle normal utilizado nos experimentos de expressão gênica foi composto por um *pool* contendo quatro amostras de glândula obtidas em autópsia, além de prepúncios isolados de neonatos.

Todas as amostras obtidas foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) e a qualidade foi avaliada em gel de agarose 0,8% e *Bioanalyzer (RNA 6000 NanoLabChip kit 2100*, Agilent Technologies, CA, USA) para DNA e RNA, respectivamente.

4.3 GENOTIPAGEM DO HPV

A genotipagem do HPV foi realizada em 47 dos 48 casos disponíveis utilizando o kit *Linear Array HPV Genotyping Test* (Roche, CA, USA), que se baseia na amplificação do DNA alvo pela PCR utilizando iniciadores para 37 tipos do HPV, incluindo 13 genótipos de alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68). Para proporcionar um controle adequado da qualidade do DNA, está também incluído no kit um par de iniciadores para o gene da β -globina humana. A amplificação das amostras foi realizada em uma reação contendo 200ng da amostra tumoral e 50 μ L de DNA polimerase *AmpliTaq Gold* na presença de Mg^{2+} contendo um excesso de dNTPs e iniciadores biotinilados para a amplificação das regiões específicas do HPV (450pb) e do gene da beta-globina (268pb). Além disso, a reação contém a enzima *Amp erase uracil-N-glicosilase* (UNG). As amostras foram mantidas em termociclador por 2min a 55°C para ação da enzima UNG com a finalidade de remover as bases uracil de qualquer produto de amplificação contaminante existente na mistura de reação. Após esse período foi realizada a desnaturação da fita de DNA a 95°C por 9min e a reação foi submetida a 40 ciclos de 95°C por 30min, 55°C por 1min e 72°C por 1min. Foi realizado o aquecimento a 72°C por 5min e após a amplificação foi acrescida ao produto uma solução de desnaturação. O produto amplificado foi adicionado a bandejas contendo tiras de genotipagem revestidas com sondas dos diferentes tipos do HPV. Foram realizados os procedimentos de hibridação, lavagem e detecção de acordo com as especificações do fabricante e o resultado foi interpretado com o auxílio do Guia de Referência do Teste de Genotipagem *Linear Array HPV*.

4.4 HIBRIDAÇÃO GENÔMICA COMPARATIVA BASEADA EM ARRAYS (ACGH)

As análises de alterações no número de cópias de DNA foram realizados para 43 amostras de CaPe (41 CECs, uma hiperplasia e uma recidiva) utilizando-se a plataforma *Human Genome CGH Microarray 4x44K* (Agilent Technologies, CA, USA), a qual contém sequências com 60pb e espaçamento médio de ~74Kb. Essa plataforma possui aproximadamente 44.000 *probes* que mapeiam genes bem caracterizados, particularmente envolvidos em câncer, além de sequências codificadoras e não-codificadoras (<http://www.chem.agilent.com>). Como amostra de referência foi utilizado DNA genômico comercial masculino (Promega, WI, USA), o qual é constituído por amostras genômicas provenientes de múltiplos doadores.

As amostras tumorais foram submetidas à marcação pelo Kit *Bioprime CGH Labeling Module* (Invitrogen, CA, USA), de acordo com especificações do fabricante. Inicialmente foi realizada uma diluição para um volume final de 19,7µL e as amostras foram submetidas a uma etapa de digestão enzimática randômica em reação contendo 2,3µL de *Buffer C* e 0,5µL das enzimas *AluI* e *RsaI* (Promega, WI, USA), totalizando 23µL. As reações contendo as amostras foram incubadas a 37°C por um período que variou de 20min a 2 horas, dependendo da integridade da banda de DNA em gel de agarose, e 65°C por 10min. As amostras referência foram incubadas a 37°C por 2 horas e 65°C por 10min em todos os procedimentos. Em seguida, foram adicionados 20µL de *Random Primer* e as amostras foram desnaturadas a 95°C por 5min e transferidas para o gelo. A marcação foi realizada com a adição de 5µL do dNTP mix, 1µL da enzima *Exo-Klenow* e 1,5µL de Cy3

dCTP para amostras tumorais e Cy5 dCTP para amostras referência (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). As reações foram incubadas a 37°C por 2 horas, 65°C por 10min e mantidas em gelo. A purificação foi realizada em mini-colunas de celulose (Microcon YM-30, Millipore, MA, USA) de acordo com instruções do fabricante e eluídas em 50µL de TE (tampão Tris-EDTA) 1x pH 8,0 (Promega, WI, USA).

A intensidade de marcação e rendimento da reação foram avaliados para todas as amostras utilizando NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA), sendo combinadas as amostras teste e referência com eficiências de marcação semelhantes. Adicionou-se a cada reação *Human Cot* DNA (Invitrogen, CA, USA) e os reagentes fornecidos pelo kit 10X *Blocking Agent* e 2X *Hi-RPM Hybridization Solution*. A mistura de hibridação foi desnaturada a 95°C por 3min, incubada a 37°C por 30min em banho seco e 100uL da mistura final foram adicionados às lâminas. A lavagem das mesmas ocorreu em banhos consecutivos nas soluções de *Wash Buffer 1* por 5min, *Wash Buffer 2* por 1min, Acetonitrila (Sigma-Aldrich, MO, USA) por 10seg e *Stabilization and drying solution* por 30seg. Foi utilizado o *scanner* (Agilent Technologies, CA, USA) e o *software ScanControl 8.1* para leitura das lâminas (Agilent Technologies, CA, USA). Os dados foram extraídos com o programa *Feature Extraction 10.1.1.1* (Agilent Technologies, CA, USA).

Análise dos dados genômicos: A análise dos dados foi realizada utilizando o programa *Nexus version 6.0* (Biodiscovery, CA, USA) e a seleção dos casos ocorreu de acordo com o preenchimento dos critérios de qualidade determinados pelo *software*. Foi utilizado o algoritmo *FASST2 Segmentation, threshold* de significância de 1,00E-6 e máximo espaçamento entre sondas adjacentes antes de realizar a quebra de um segmento de 1Mb. Foram consideradas três sondas consecutivas alteradas para

determinação de um segmento como alterado quanto ao número de cópias. Os limiares considerados para ganhos de uma cópia, ganhos de duas ou mais cópias (alto nível de ganhos), perdas de uma cópia e perdas de duas cópias (deleção homozigota) foram 0,3; 0,6; -0,3 e -1,0, respectivamente. As amostras foram agrupadas com a utilização do algoritmo *Complete linkage hierarchical* e exclusão de cromossomos sexuais.

A seleção de regiões para análises mais detalhadas baseou-se na inclusão de alterações presentes em mais de 20% dos casos. As comparações entre diferentes grupos de acordo com dados clínico-patológicos e alterações moleculares foram realizadas no programa *Nexus version 6.0* (Biodiscovery, CA, USA) com a utilização do teste exato de *Fisher* e $P \leq 0,05$ para a determinação de significância. A associação entre as alterações moleculares, positividade ou não do HPV e diferentes grupos obtidos na *clusterização* foi realizada com a utilização da análise de sobrevida câncer específica (do inglês, *Cancer specific survival* – CSS), calculada como o tempo entre a data do diagnóstico do tumor e óbito por câncer ou última informação para pacientes vivos, com construção de curvas de *Kaplan-Meier* e teste de *log rank* com $P \leq 0,05$.

4.5 EXPRESSÃO GÊNICA EM LARGA ESCALA

O perfil de expressão gênica foi avaliado em 42 tumores de pênis (41 CEC e um carcinoma *in situ*) utilizando-se a plataforma *Whole Human Genome 4x44K* (Agilent Technologies, CA, USA), composta por 43.376 sequências biológicas e 32 sondas para controles positivos *Spike in* (<http://www.genomics.agilent.com>). Os

procedimentos de marcação das amostras, hibridação e detecção seguiram o protocolo *Two-color microarray-based gene expression analysis* que utiliza o *Quick Amp Labeling Kit* (Agilent Technologies, CA, USA). Para a pré-síntese de cDNA foram utilizados 800ng de RNA total atingindo um volume máximo de 8,3µL; 2µL da diluição do *Spike A* para Cy3 ou *Spike B* para Cy5 e 1,2µL de *T7 Promoter Primer*. Essa reação foi incubada por 10min a 65°C e colocada no gelo por 5min. A síntese de cDNA consistiu na adição de 4µL de *5X First Strand Buffer*, 2µL de DTT 0,1M, 1µL de dNTP mix, 0,5µL da enzima *RNase Out* e 1µL da enzima MMLV-RT. As reações foram incubadas em um termociclador por 2 horas a 40°C, 15min a 65°C e transferidas para gelo. A transcrição de cDNA para cRNA ocorreu para um volume final de 80µL por reação contendo 15,3µL de água estéril, 20µL de *4X Transcription Buffer*, 6,4µL de 50% PEG, 6µL de DDT 0,1M, 8µL de NTP mix, 0,5µL de *RNase Out*, 0,6µL de *Inorganic Pyrophosphatase*, 2,4µL de Cy3 ou Cy5 e 0,8 µL da enzima *T7 RNA Polimerase*. As amostras foram mantidas a 40°C por 2 horas em termociclador e a purificação das sondas ocorreu com a utilização do *RNeasy Mini Kit* (Quiagen, TE, USA), seguindo as especificações do fabricante. A intensidade de marcação e o rendimento da reação foram avaliados para todas as amostras utilizando o NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA). Um total de 825ng de cada amostra teste foi combinada à mesma massa da referência. Foram adicionados 11µL de *10X Blocking Agent*, 2,2µL de *25X Fragmentation Buffer* e água para um volume final de 55µL. A mistura de hibridação foi desnaturada a 95°C por 3min, incubada a 37°C por 30min em banho seco e 100µL da mistura final foi adicionada às lâminas. A lavagem das mesmas ocorreu em banhos consecutivos nas soluções de *Wash Buffer 1* e *Wash Buffer 2* por 1min cada, Acetonitrila (Sigma-

Aldrich, MO, USA) por 10seg e *Stabilization and drying solution* por 30seg. Os sinais de fluorescência foram capturados no scanner Agilent utilizando o *software Scan Control* 8.1 (Agilent Technologies, CA, USA). Todos os casos preencheram os critérios de qualidade do fabricante, o que inclui principalmente análises de *background*, uniformidade da hibridação, intensidade dos sinais verde e vermelho e variação das duplicatas.

Análise dos dados transcriptômicos: Para a análise dos dados de expressão gênica foi realizada a extração dos dados utilizando o programa *Feature Extraction* 10.1.1.1 (Agilent Technologies, CA, USA) e obtenção da média da intensidade do sinal corrigida para *background* para cada canal de cor ($\log_2\text{ratio}$). Os dados foram normalizados com utilização do algoritmo LOWES e genes contendo 30 ou mais *scores* de intensidade “não-disponíveis” foram eliminados da análise. As sequências restantes foram avaliadas usando o *software* TMeV v.4.5 (<http://www.tm4.org>) pelo método SAM (do inglês, *Significance analysis of microarrays*) (TUSHER et al. 2001). Uma taxa de falsos positivos (do inglês, *False discovery rate* - FDR) $\leq 0,05$ foi utilizada como limiar de significância para os genes e para limitar a probabilidade de ocorrência de erro tipo I, considerando o fato de que milhares de genes estão sendo testados simultaneamente (BENJAMINI e HOCHBERG 1995; STOREY e TIBSHIRANI 2003). Foram utilizados os valores de $\log_2\text{ratio} \geq 2.0$ ou ≤ -2.0 para considerar genes com aumento ou diminuição de expressão como relevantes, respectivamente. O agrupamento hierárquico para dois grupos de amostras classificado quanto à infecção pelo HPV foi realizado com utilização do algoritmo *Complete linkage hierarchical clustering* e correlação de *Pearson* (EISEN et al. 1998).

4.6 INTEGRAÇÃO DOS DADOS GENÔMICOS E TRANSCRIPTÔMICOS

Genes contendo variações significativas no número de cópias determinadas por aCGH em mais de 20% dos casos foram integrados a alterações na expressão de transcritos determinada por análises globais para 37 CaPe com dados disponíveis para as duas metodologias, sendo um CEC misto (usual-papilífero), dois papilíferos e 34 usuais. Inicialmente foi gerado um banco de dados contendo 5.018 genes alterados quanto ao número de cópias e 6.117 moléculas com variação nos níveis de transcritos com valores significativos ($P \leq 0.05$), resultando em uma matriz de dados de *microarray* que foram utilizados para integração. Apesar de diversos métodos já terem sido descritos para avaliar a relação entre dados genômicos e transcriptômicos, optou-se pela utilização de análise de correlação devido à sua ampla descrição em literatura, incluindo para tumores de mama, fígado, pulmão, esôfago, entre outros (WOO et al. 2009; ISINGER-EKSTRAND et al. 2010; NATRAJAN et al. 2010; LUTP et al. 2011; ROESSLER et al. 2012). Foi utilizada a correlação de *Pearson* entre valores de intensidade de log (\log_2 ratio) para mRNA e mediana derivada do valores de aCGH para as sondas de cada gene. Somente moléculas com alterações genômicas e transcriptômicas concordantes (ganho genômico/aumento de expressão ou perda genômica/diminuição de expressão) e coeficiente de correlação (r) maior que 0,5 foram selecionadas para análises mais detalhadas.

Genes cujos dados de aCGH e expressão gênica não foram concordantes (ganho/diminuição de expressão ou perda/aumento de expressão) com correlação positiva foram avaliados quanto à regulação por miRNAs (do inglês, *Micro RNA*)

como uma possível explicação para este achado. Para tanto, foram utilizadas duas ferramentas de predição de alvos biológicos de miRNAs: *TargetScan* (<http://www.targetscan.org/>) e *PicTar* (<http://pictar.mdc-berlin.de/>). Optou-se pela utilização de duas ferramentas de predição para identificação do maior número possível de miRNAs reguladores para cada gene avaliado. As duas ferramentas apresentam distinção na metodologia de análise, o que contribui para aumentar a gama de miRNAs preditos. O *TargetScan* se baseia no pareamento perfeito entre regiões do miRNA e do mRNA correspondente, análises de termodinâmica e conservação. A ferramenta *PicTar* utiliza, além dos critérios citados para *TargetScan*, análises adicionais para predizer a ligação de miRNAs na presença ou atividade de outros miRNAs complementares (KAMIL 2012). Os miRNAs detectados foram comparados às regiões com variação no número de cópias descritos após a análise de aCGH.

4.7 ANÁLISE DA INTERPRETAÇÃO BIOLÓGICA DOS DADOS UTILIZANDO O *INGENUITY PATHWAYS ANALYSIS* (IPA)

As listas geradas pelas análises de expressão gênica em larga escala e integração dos dados genômicos e transcriptômicos foram submetidas ao *software Ingenuity Pathways Analysis* (IPA, Ingenuity® Systems, <http://www.ingenuity.com>) para facilitar a interpretação biológica dos dados. Foram inseridas no programa IPA as listas contendo os genes alterados e seus valores de expressão/correlação para a análise funcional *in silico*, associação com vias canônicas, predição da ativação ou inibição de reguladores transcricionais (RT) e filtro de biomarcadores. Foi utilizado o

teste exato de Fisher ($P \leq 0.05$ ou $-\log(P\text{-valor}) \geq 1.30$) para determinar os valores de P referentes a probabilidade de que cada função biológica ou via canônica relacionada a determinado gene ocorra ao acaso. Já valores de *Z-score* foram utilizados para a predição da ativação ou inibição de RTs com base no aumento ou diminuição dos níveis de transcritos para genes específicos. Essa análise baseia-se na capacidade do *software* em comparar o sentido de alteração na expressão gênica com sinais esperados descritos em literatura e, com base na expressão de genes regulados, predizer RT relevantes ($Z\text{-score} \geq 2,0$: ativação do RT; $Z\text{-score} \leq -2,0$: inibição do RT).

4.8 VALIDAÇÃO DOS ACHADOS

As análises das alterações genômicas e da expressão gênica global, bem como a integração dos dados, levaram à seleção de um subconjunto de genes e regiões com base em critérios específicos, os quais foram submetidos à validação por metodologias independentes no mesmo subconjunto de CaPe utilizados nas análises em larga escala.

4.8.1 Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH)

As análises de aCGH revelaram alta frequência de perdas genômicas envolvendo o cromossomo Y (39% dos casos) e ganhos envolvendo a região do cromossomo 8 contendo o gene *MYC* (8q21.2-q24.3 – 66% dos casos). Essas alterações foram submetidas à validação pela metodologia de FISH utilizando amostras em blocos de parafina de sete tumores de pênis avaliados previamente por

aCGH. Os experimentos foram realizados no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo, SP.

Para a avaliação das perdas no cromossomo Y foi utilizado o kit *AneuVysion Multicolor DNA Probe* (Vysis CEP 18/X/Y) (Abbott Molecular, IL, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Esse kit inclui uma sonda que emite fluorescência no espectro laranja para a região α -satélite de DNA localizada no centrômero do cromossomo Y (Yp11.1-q11.1) e duas outras sondas utilizadas como controle interno da reação, sendo o espectro azul para o cromossomo 18 (18p11.1-q11.1) e verde para o centrômero do cromossomo X (Xp11.1-q11.1). Para a avaliação de ganhos em *MYC* (8q24), foi utilizado o *mix* de sondas MYC/CEN-8 FISH (Dako, CA, USA), o qual detecta alterações no número de cópias do *MYC* utilizando o centrômero do cromossomo 8 como referência. O ensaio consiste em uma sonda de DNA de 291Kb marcada com *Texas-Red* cobrindo toda a região do gene *MYC*, além de sondas de DNA marcadas com fluoresceína que tem como alvo a região centromérica do cromossomo 8.

Brevemente, as lâminas contendo amostras de CaPe foram incubadas a 56°C por 8 horas e desparafinizadas utilizando xileno, etanol e água destilada. Após a incubação em 0,2M HCl à temperatura ambiente por 2min, as preparações foram tratadas com tampão citrato (2xSSC, pH6,0) a 80°C por 1 hora. Os tecidos foram digeridos à temperatura ambiente utilizando 15 μ L de solução de pepsina a 10% em HCl 0,01M por 8-14min, lavados em 2xSSC por 2min e desidratados em banho gradual de etanol (75%, 80% e 100%) por 2min. Em seguida, foi realizada a aplicação das sondas e a área da lâmina contendo o tecido foi coberta por lamínula selada com *rubber cement*. As lâminas foram incubadas em câmara de hibridação

(DAKO S2450, Dinamarca) para desnaturação a 82°C por 5min e a hibridação ocorreu por 18 horas a 45°C para avaliação do cromossomo Y e 20 horas para avaliação de *MYC*. As lavagens pós-hibridação ocorreram em solução de uréia/0,1xSSC a 45°C por 30min e 2xSSC à temperatura ambiente por 2min. As lâminas foram desidratadas em diluição gradual de etanol e seguiu-se a adição de 15µL de meio de montagem contendo 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI).

As preparações foram analisadas em microscópio Olympus BX 61 conectado ao *software* FISHView EXPO 2.0 (Applied Spectral Imaging, Israel) com a colaboração da Dra. Isabela Werneck da Cunha. Foram avaliadas as alterações no número de cópias do cromossomo Y e do *MYC* e determinou-se uma alteração quando estas constituíam mais de 10% do total de células tumorais para cada caso. Para as análises do cromossomo Y, tumores com sinais 1:1:2 (Y:X:18) foram considerados normais, enquanto ganhos ocorreram para sinais $\geq 2:1:2$ e perdas para 0:1:2. Variações no número de sinais dos centrômeros dos cromossomos X e 18 ocorreram para um caso e foram analisados separadamente. Um padrão normal para o número de cópias do gene *MYC* em relação a referência normal (centrômero do cromossomo 8) era estabelecido se a razão entre os sinais era $>0,5$ e $<1,5$; ganhos quando a razão estava $\geq 1,5$ e $< 2,5$ e uma amplificação era considerada se a razão entre estes sinais era $\geq 2,5$.

4.8.2 PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR)

A análise integrada dos dados de variação no número de cópias e expressão gênica global levou à seleção de candidatos a biomarcadores para confirmação dos achados pela PCR quantitativa em tempo real. As análises foram realizadas em 34

CECs de pênis (31 usuais, um misto papilífero-usual e dois papilíferos) e 10 amostras de sangue obtidas de indivíduos sem histórico de câncer pessoal ou na família, as quais foram utilizadas como referência normal. Foram selecionados quatro genes: *DLC1* (8p22) e *PPARG* (3p25) com perda/diminuição de expressão e *LAMP3* (3q26.3-q27) e *TNFSF10* (3q26) com ganhos/aumento na expressão de transcritos. A seleção desses genes baseou-se na alta frequência de alterações genômicas descritas por aCGH para os cromossomos 3 e 8 e sua relação com CSS e características de pior prognóstico. Além disso, essas moléculas apresentaram alta correlação entre número de cópias genômicas e nível de transcritos (*DLC1*, $r=0.870$; *PPARG*, $r=0.930$; *LAMP3*, $r=0.790$; *TNFSF10*, $r=0.890$), o que os classifica como potenciais *drivers* nos CaPe avaliados.

Desenho de oligonucleotídeos iniciadores: Anteriormente ao desenho dos iniciadores, todas as sondas que compreendiam os quatro genes selecionados foram avaliadas quanto à presença de alterações para cada caso individualmente. Em seguida, os iniciadores foram desenhados especificamente nas sequências de DNA contendo sondas alteradas para o maior número de casos e em suas regiões flanqueadoras. A avaliação das regiões adjacentes às áreas alteradas tem como finalidade determinar a extensão da alteração no número de cópias em certo gene. O programa *Primer-Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) foi utilizado para o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores da região a ser investigada. A predição de formação de possíveis estruturas secundárias estáveis (*hairpins*) e dímeros de iniciadores (homo e heterodímeros, no caso de estrutura estável com 3' livre), que podem levar a redução da eficiência da reação, foi realizada no programa *Oligoanalyzer* (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications>

/oligoanalyzer). As sequências e localização dos iniciadores para os genes alvo estão descritas no **Quadro 2 e Figura 2**.

Amplificação pela qPCR: A amplificação das amostras de DNA foi realizada em termociclador automático (*ABI Prism 7500 Sequence Detection System*) utilizando o corante fluorescente *Power SYBR Green* (Applied Biosystems, CA, USA), o qual contém todos os reagentes necessários para a reação. Foram construídas curvas de diluição de DNA para determinar a eficiência de amplificação dos iniciadores selecionados a partir de um *pool* de amostras de CaPe em concentrações seriadas (100ng, 20ng, 4ng, 0,8ng e 0,16ng). O valores de C_q (ciclo de quantificação) para cada diluição de cDNA e as concentrações respectivas de DNA (\log_{10} DNA) foram plotados num gráfico para obtenção da curva-padrão. A partir da curva-padrão foi calculada a equação da reta, bem como o valor da inclinação da reta ou *slope*. O cálculo da eficiência da amplificação foi realizado segundo a fórmula: $E=10^{(-1/slope)} - 1$ e somente iniciadores com eficiência variando entre 90 e 110% foram submetidos aos experimentos.

Para cada qPCR foram utilizados 10ng de DNA genômico, 1X de *Master Mix* (Applied Biosystems, CA, USA) e 10uM de cada oligonucleotídeo iniciador (*forward* e *reverse*) num volume final de 12,5μL. Todas as reações foram realizadas em duplicada utilizando o pipetador automático Qiagility (Qiagen, TE, USA) e submetidas às seguintes condições: 50°C por 2min, 95°C por 10min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15seg e 60°C por 1min. O gene *GAPDH* foi utilizado como referência. Foram incluídos controles negativos e positivos em todas as reações. O controle positivo constitui-se de um *pool* de amostras tumorais preparado em quantidade suficiente para ser utilizado em todas as reações. Este controle foi

utilizado como amostra “normalizadora”, o que permitiu avaliar as variações intra-ensaios.

Análise dos dados: A média dos valores de Cq das duplicatas de cada amostra foi usada na quantificação da expressão dos genes de interesse utilizando o modelo matemático proposto por PFAFFL (2001). Inicialmente, as alterações no número de cópias relativa para regiões alvo e endógeno para cada amostra foi obtida dividindo-se o valor do Cq para cada amostra individualmente pelo valor do mesmo gene na amostra normalizadora (*pool* de tumores de pênis) para eliminar qualquer variação intra-ensaio. Em seguida, foi obtida a relação entre o Cq das amostras individualmente e do gene referência. Para a obtenção dos valores de número de cópias relativa nas amostras tumorais em relação aos tecidos penianos normais, dividiu-se o número de cópias relativo para cada gene de cada amostra pela mediana dos valores de número de cópias relativa dos controles. Foi utilizado o intervalo padrão de ganhos e perdas genômicas com 10% de variação (0,55-1,35) para considerar os fragmentos como alterados.

As comparações entre a presença de ganhos/perdas genômicas e dados da genotipagem do HPV e outras características clínicas e patológicas foram realizadas pelo teste de *Qui-quadrado*. A análise de sobrevida foi realizada pelo teste de *log rank* ($P \leq 0.05$) e construção de curvas de *Kaplan-Meier*. Todas as análises estatísticas foram realizadas no *software GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software, <http://www.graphpad.com>).

Quadro 2 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na qPCR.

Gene	No.	Região gênica*	Sentido **	Iniciadores (5'-3')	Tamanho produto (pb)***
Genes alvo					
<i>DLC1</i>	1	E-18 (*)	F	TCCACGAACCTCTTCTGTACTTTGA	146
			R	AGGCTAGAGGGAGCAGTTCATCC	
	2	I-18	F	AACTGAGCCACCCACTCCCAA	124
			R	TCTGCTGTTGCACGTTGTCGTC	
	3	E-2 (*)	F	CCAAGGGCAGAAAACATCAGGC	84
			R	TGGTTACTTTGTATGATGGGCAGTG	
	4	I-4	F	TGCCATCCTCCCCTGCGAA	62
			R	TCAGGTAGCACCATCTTAGCCCT	
5	E-4 (*)	F	GGAAGAAGGGCATTGGGAACA	150	
		R	CCGTGGACTCAGTGTGAGAAGAC		
6	I-4	F	GACTCAGCCTTCACAACAGTATTCC	75	
		R	ACCTGTGCTGCTGGTCAAGAT		
7	E-5 (*)	F	GGGTCTTCCTTGTAAGTCAACCA	86	
		R	CCAAATTCATTCCCCAGAACCCTGA		
8	I-4	F	TCTGAGGATGTTGTCCCTGAAGAAA	91	
		R	GGATTTGATGCCTTCCACCCC		
<i>LAMP3</i>	1	I-4 (*)	F	TGTCTTCCCATAATCCCTCCCACT	97
			R	TGTTCTTATGTAGGGTGTGAATGGC	
	2	E-4	F	AGTGGGAGCCTATTTGACCGT	89
			R	GCTAACCAACAGAAACAGCGTCA	
<i>PPARG</i>	1	E-2 (*)	F	TGAAAGAAGCCAACACTAAACCACA	73
			R	ACCGTTAAAGGCTGACTCTCGT	
	2	I-2	F	ACACACTCCCATCCCTACCTCTAC	144
			R	ACTGCTAAGATGTGGTTCCCGA	
3	E-3 (*)	F	TCAAGCCCTTCACTACTGTTGACT	88	
		R	GCAACCACTGGATCTGTTCTTGT		
4	E-4	F	CCTTCCAACCTCCCTCATGGCA	98	
		R	ATTACCTTGCATCCTTCACAAGCA		
<i>TNFSF10</i>	1	E-1 (*)	F	GGGAGGGACAGTTGCAGGTT	89
			R	AGTGAGGAAATGAAAGCGAATGAGT	
	2	I-1	F	CCAAAGGGACTGGAGCTTACACTG	87
			R	CTCAAAAGGAAAACCTGAACCAACGG	
3	E-3 (*)	F	TCCTTCTCTGTGTTCTCATCCACTC	60	
		R	GCTTGAGATACGGAGCAGCAGAT		
4	E-4	F	GTTTGGCAAGTGTGATGACCCT	132	
		R	GTGTTGCTTCTTCTCTGGTCCC		
Gene referência					
<i>GAPDH</i>	-	-	F	GCAACCGGGAAGGAAATGA	67
			R	CAGGAGCGCAGGGTTAGTCA	

* E: éxon, I: íntron. Iniciadores desenhados em regiões de íntrons ou éxons com o símbolo (*) estão localizados em áreas de sonda alterada detectada pela análise de aCGH. Todas as outras regiões flanqueiam áreas com ganhos ou perdas genômicas. ** F: *forward*, R: *reverse*. ***pb: pares de base.

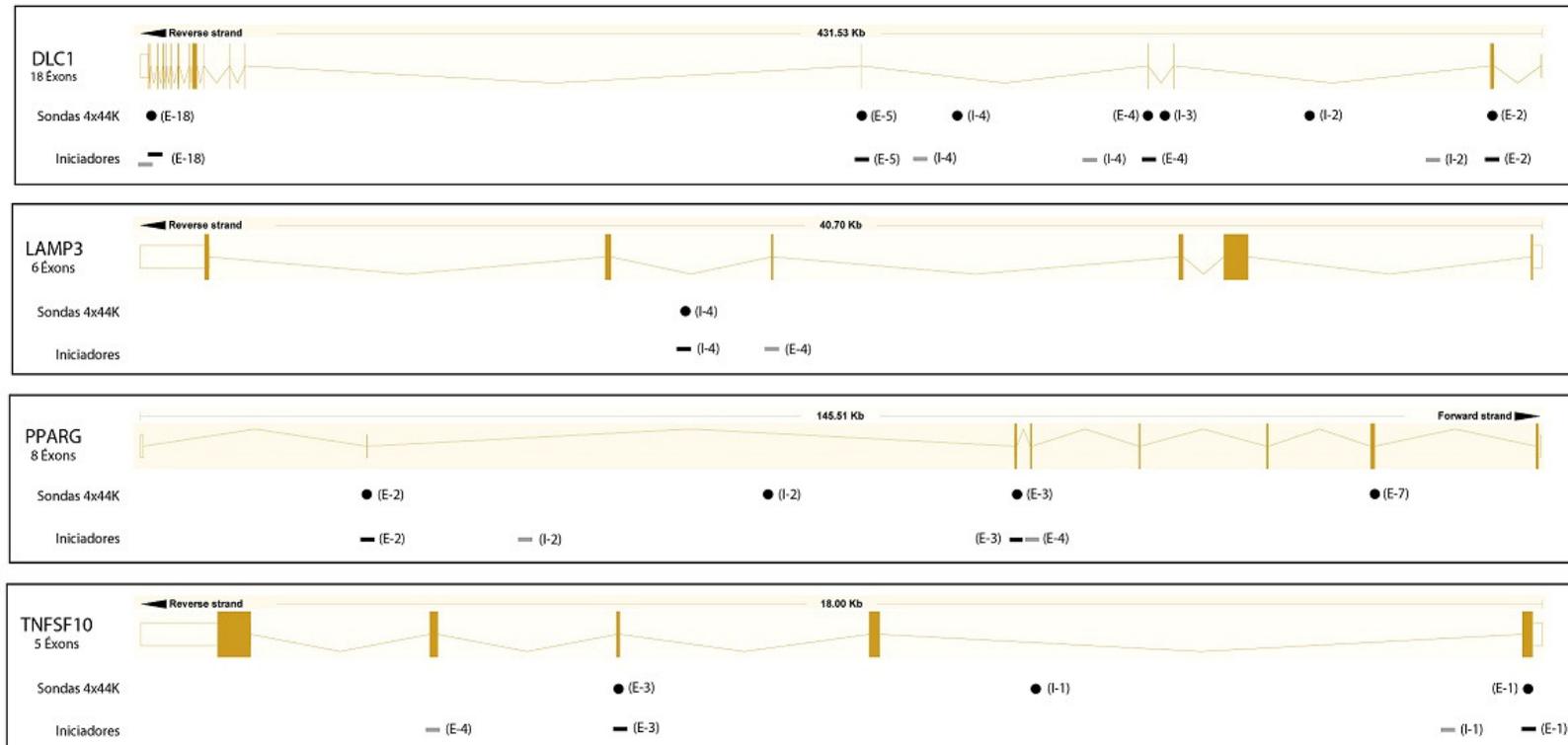


Figura 2 - Representação esquemática dos quatro genes selecionados para validação por qPCR (*DLC1*, *LAMP3*, *PPARG*, *TNFSF10*). Abaixo da ilustração de éxons/íntrons para cada gene estão detalhadas as sondas alteradas presentes na plataforma 4x44K utilizada nos experimentos de aCGH (**primeira linha**) e os iniciadores desenhados para as sondas alteradas em maior número de casos (preto) ou regiões flangeadoras (cinza) (**segunda linha**). À frente de cada sonda ou par de iniciadores desenhados está indicada sua localização, em que “E” representa éxon e “I”, íntron, ambos seguidos do número correspondente. Acima dos esquemas gênicos estão indicados o sentido de leitura (*forward* ou *reverse*) e o tamanho do gene em Kb.

4.8.3 RT-PCR Quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR)

Com base na análise de expressão gênica em larga escala e integração dos dados genômicos e transcriptômicos, foram selecionados 17 genes para validação devido ao preenchimento de critérios específicos, sendo eles *CAVI*, *DLC1*, *FLII*, *FOXO1*, *IFIT2*, *JUN*, *LAMP3*, *MMP1*, *MSH6*, *PCNA*, *PI3*, *PPARG*, *RFC4*, *SBF1*, *STAT1*, *TNFSF10* e *TP53*. Os critérios para seleção e os genes a serem avaliados estão descritos brevemente abaixo. A validação foi realizada para 38 CECs de pênis (35 usuais, um misto papilífero-usual e dois papilíferos). Foram utilizados como referências normais amostras de glândulas ou prepúcios de recém-nascidos.

Via canônica relacionada à infecção por HPV: a análise de vias canônicas contendo genes diferencialmente expressos entre os grupos HPV+ e HPV- revelou resultados interessantes. Foi encontrado alto *score* de alteração [definido como $-\text{Log}(\text{P-valor})$] para a via do reparo a erros de pareamento (*mismatch repair*) em eucariotos. Três genes desta via apresentaram aumento de expressão em tumores infectados pelo vírus e foram submetidos à validação: *MSH6*, *PCNA* e *RFC4*.

Ativação e inibição de reguladores transcricionais: com base nos dados de expressão gênica obtidos na comparação normal *versus* tumores de pênis, foi realizada uma análise de reguladores transcricionais (RT) e três proteínas foram classificadas como alteradas. Foi observada ativação dos reguladores FOXO1 e JUN e inibição para TP53. Embora os genes responsáveis pela codificação dos RTs não tenham apresentado alteração na expressão detectada por *microarray*, foi hipotetizada a presença de variações nos níveis de transcritos como mecanismo de alteração protéica e os genes *FOXO1*, *JUN* e *TP53* foram submetidos à avaliação por RT-qPCR.

Genes presentes em regiões genômicas associadas à sobrevida: a análise integrada dos dados revelou diversos genes candidatos a *drivers* cujas alterações no número de cópias foram capazes de influenciar a expressão de transcritos. Entre eles, quatro moléculas presentes nos cromossomos 3 e 8, os quais apresentaram associação com sobrevida e características clínicas e patológicas de pior prognóstico, foram selecionadas para validação dos dados genômicos (qPCR) e transcriptômicos (RT-qPCR), sendo eles: *DLC1* e *PPARG* com perdas/diminuição de expressão e *LAMP3* e *TNFSF10* com ganhos/aumento de expressão.

Genes relacionados ao câncer: sete genes descritos previamente em literatura como associados a processos relacionados ao câncer foram avaliados por RT-qPCR (*CAVI*, *FLII*, *IFIT2*, *MMP1*, *PI3*, *SBF1* e *STAT1*). A comparação com dados de aCGH e de expressão global revelou que esses genes apresentaram alterações no número de cópias em pelo menos um CaPe avaliado, além de expressão gênica diferencial para duas dessas moléculas (aumento de expressão para *MMP1* e *STAT1*). As funções dos genes relacionados ao câncer selecionados estão descritas brevemente no **Quadro 3**. A metodologia de RT-qPCR foi realizada para todos os genes avaliados como descrita a seguir.

Desenho de oligonucleotídeos iniciadores: O desenho dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a detecção dos genes alvos ocorreu a partir da sequência de mRNA do gene em questão (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) e utilização do programa *Primer-Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Os iniciadores desenhados flanqueavam junções éxon-éxon ou íntrons contendo mais de 1.000 pares de bases. A predição de formação de dímeros ou estruturas secundárias foi realizada no programa *Oligoanalyzer* (<http://www.idtdna.com/analyzer/>

applications/oligoanalyzer). As sequências dos iniciadores para os genes alvo estão descritas no **Quadro 4**.

Quadro 3 - Genes descritos na literatura como relacionados ao câncer e com alteração detectada em larga escala selecionados para validação.

Gene	Localização	Alteração genômica*	Expressão Gênica*	Descrição/Função
<i>CAVI</i>	7q31.1	↓ (5 casos)	-	Candidato a supressor tumoral
<i>FLII</i>	11q24	↓ (5 casos)	-	Proliferação, diferenciação e migração celular
<i>IFIT2</i>	10q23.31	↓ (6 casos)	-	Atividade pró-apoptótico, relação com sistema imune
<i>MMP1</i>	11q22.3	↑ (1 caso) ↓ (4 casos)	↑	Metaloproteinase de matriz
<i>PI3</i>	20q13.12	↑ (5 casos)	-	Papel na inflamação
<i>SBF1</i>	22q13.33	↑ (5 casos) ↓ (5 casos)	-	Regulação do crescimento
<i>STAT1</i>	2q32.2	↓ (1 caso)	↑	Atividade antitumoral, associação a prognóstico

* ↑: Ganho ou aumento de expressão gênica; ↓: Perda; -: ausência de alteração.

Síntese de cDNA: Anteriormente às reações de RT-qPCR, todas as amostras de RNA normais e teste foram submetidas à transcrição reversa. Brevemente, 2µg de RNA foram digeridos com 1U de *Dnase I Amplification Grade* (Invitrogen, CA, USA) em 10X *Dnase I Reaction Buffer* e 25mM de EDTA pH 8,0 para evitar presença de DNA contaminante. As reações foram realizadas em um termociclador PTC-100 (Peltier - EffectCycling - MJ Research) por 15min em temperatura ambiente e a enzima inativada por aquecimento das reações a 70°C por 10min. A síntese de cDNA ocorreu para um volume final de 20µl contendo 5x *First-Strand Buffer* (250mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂), 10mM de cada dNTP, 0,5µg/µl de Oligo(dT)₁₈, 0,1M ditiotreitol e 200U da transcriptase reversa *Super Script™ II* (Invitrogen, CA, USA). A transcrição reversa foi realizada a 42°C por 60min e a inativação ocorreu subsequentemente por 15min a 70°C.

Amplificação por RT-qPCR: A amplificação das sequências de cada gene selecionado por RT-qPCR foi realizada no termociclador automático (ABI *Prism 7500 Sequence Detection System*) utilizando *Power SYBR Green* (Applied Biosystems, CA, USA), o qual contém todos os reagentes necessários para a reação. A determinação da eficiência de amplificação dos iniciadores foi realizada da mesma maneira descrita para qPCR.

Para cada reação foram utilizados 20ng de cDNA, 1X de *Master Mix* (Applied Biosystems, CA, USA) e 0,2uM de cada oligonucleotídeo iniciador (*forward* e *reverse*) num volume final de 12,5µl. As reações em duplicata utilizando o pipetador automático Qiagility (Qiagen, TE, USA) foram submetidas às seguintes condições: 95°C por 10min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15seg e 60°C por 1min. Os genes utilizados como referência foram baseados em um trabalho prévio do grupo (MUÑOZ 2011). A avaliação dos genes *ACTB*, *GAPDH*, *GUSB*, *HPRT*, *HMBS* e *RPLP0* quanto à estabilidade de expressão foi realizada no programa geNorm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>) com algoritmo descrito por VANDESOMPELE et al. (2002). Com base nessa análise, obteve-se alta estabilidade de expressão para *HMBS* e *GUSB*, os quais foram utilizados como referência nesse estudo. Foram incluídos controles negativos e positivos em todas as reações. O controle positivo constitui-se de um *pool* de amostras tumorais sendo utilizado como amostra “normalizadora”, o que permitiu avaliar as variações intra-ensaios.

Análise dos dados de expressão de transcritos específicos: A média dos valores de Cq das duplicatas de cada amostra foi usada na quantificação da expressão dos genes de interesse utilizando o modelo matemático proposto por PFAFFL (2001). Ao utilizar mais de um gene na normalização da RT-qPCR aplica-se a média

geométrica dos valores de expressão relativa dos genes de referência. Para corrigir variações intra-ensaios, a expressão relativa dos genes alvo e endógeno de cada amostra foi obtida dividindo-se o valor de expressão de cada amostra pelo valor da expressão do mesmo gene na amostra normalizadora (*pool* de tumores de pênis). Em seguida, foi obtida a relação entre o Cq das amostras individualmente. As comparações entre os valores de expressão gênica para os grupos amostrais e entre as variáveis clínicas e patológicas foram realizadas pelo teste não paramétrico de *Mann-Whitney* (duas variáveis) ou *Kruskal-Wallis* (três variáveis). A análise de sobrevida foi realizada com utilização do teste de *log rank* ($P \leq 0,05$) e construção de curvas de *Kaplan-Meier*. Todas as análises estatísticas foram realizadas no *software GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software, <http://www.graphpad.com>).

Quadro 4 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas análises de expressão dos transcritos por RT-qPCR.

Gene	Sentido *	Iniciadores (5' - 3')	Tamanho produto (pb)**
Genes alvo			
<i>CAVI</i>	F	ACCTCCTCACAGTTTTTCATCCAGC	127
	R	GCCTTGTTGTTGGGCTGTAGAT	
<i>DLC1</i>	F	TGGCACCTCATCCTGCTCG	129
	R	TAACCCCTCACACCCACCACAG	
<i>FLII</i>	F	GCCTCAACAAAAGTCCTCCCC	130
	R	TGCCCCGCTTCCAGGGTT	
<i>FOXO1</i>	F	TGCGAACAGACCAACCTGGCA	127
	R	CGGGTAGCCAAATGCAGGAGGC	
<i>IFIT2</i>	F	AACCGAGCCCTGCCGAA	128
	R	AGTTTTCTCCCTCCATCAAGTTCCA	
<i>JUN</i>	F	TGCCAACTCATGCTAACGCAGC	190
	R	GTCAGGACGCAACCCAGTCCA	
<i>LAMP3</i>	F	GGCACCCGAAAATCCAACCT	113
	R	ACGGTCAAATAGGCTCCCACT	
<i>MMP1</i>	F	GCTGCTTACGAATTTGCCGACA	74
	R	TGTCCCTGAACAGCCCAGTAC	
<i>MSH6</i>	F	AGGCTTGCTAATCTCCCAGAGGAA	111
	R	ACTAGCCAGGCAAACCTCCCGAAA	
<i>PCNA</i>	F	GGGCTTCGACACCTACCGCT	169
	R	AACTTTCTCCTGGTTTGGTGCTTCA	
<i>PI3</i>	F	CTGTTTCGTTCCCCAGTGAGAGGG	93
	R	GCAGCAGGGACTTAGGACCAGAT	
<i>PPARG</i>	F	TGGAGACCGCCCAGGTTT	101
	R	ACTCAGGGTGGTTCAGCTTCA	
<i>RFC4</i>	F	TGCTGCCTGTCAGAGTGGCT	184
	R	TGCTAGGCATTTGTCAACTTCGGCA	
<i>SBF1</i>	F	CGGAGCCTTCACAGGAAACGACG	144
	R	ACACCAGTACCAGCGTCTTCGGT	
<i>STAT1</i>	F	GGCACCAGAACGAATGAGGGTC	123
	R	CACAACGGGCAGAGAGGTCG	
<i>TNFSF10</i>	F	TACCAACGAGCTGAAGCAGATGC	150
	R	ACGAGCTGACGGAGTTGCCA	
<i>TP53</i>	F	CCTGTTGGTCGGTGGCTTGGT	153
	R	CAGGGTGTGGGATGGGGTGACA	
Genes referência			
<i>GUSB</i>	F	GAAAATACGTGGTTGGAGAGCTCATT	101
	R	CCGAGTGAAGATCCCCTTTTA	
<i>HMBS</i>	F	GGCAATGCGGCTGCAA	155
	R	GGGTACCCACGCGAATCAC	

* F: forward, R: reverse. **pb: pares de base.



Resultados

5 RESULTADOS

5.1 GENOTIPAGEM DO HPV

O ensaio de genotipagem do HPV foi realizado para todas as amostras do estudo (n=47), exceto para o tumor PA22T devido à indisponibilidade de DNA. Foi detectada positividade para o HPV31 na HP, HPV16 na metástase, HPV16/62 e HPV16/52/59 na CIS e ausência de infecção para recidiva (**Tabela 2a**).

Catorze dos 42 CaPe apresentaram positividade para algum subtipo viral, o que corresponde a 33,3% dos casos. Entre os 14 casos, 10 apresentaram positividade para o HPV16 (71,4%) e um caso mostrou positividade para cada um dos subtipos: HPV16/40 (7,1%), HPV16/62 (7,1%), HPV18/40 (7,1%) e HPV81 (7,1%) (**Tabela 2b**).

Os carcinomas usuais apresentavam positividade para os subtipos HPV16, 16/40 e 16/62; os carcinomas papilíferos eram HPV16 e 18/40 e os carcinomas verrucosos, HPV81. O padrão de infecção pelo HPV de acordo com o subtipo histológico está detalhado na **Tabela 2b**.

Tabela 2 - Detalhes dos subtipos do HPV detectados nesse estudo de acordo com a classificação histológica das lesões penianas.

A

Subtipo	HP (n=1)* n (%)	CIS (n=2)* n (%)	Metástase (n=1) n (%)	Recidiva (n=1) n (%)
HPV16 ¹	-	-	1 (100,0)	-
HPV16 ¹ /62	-	1 (50,0)	-	-
HPV31 ¹	1 (100,0)	-	-	-
HPV16 ¹ /52/59	-	1 (50,0)	-	-
Ausente	-	-	-	1 (100,0)

*HP: hiperplasia; CIS: carcinoma *in situ*; ¹ HPV alto risco

B

Subtipo	CEC n (%)**				Total (n=42)
	Usual (n=36)	Verrucoso (n=2)	Papilífero (n=2)	Misto (n=2)	
HPV16 ¹	9 (25,0)	-	1 (50,0)	-	10 (23,8)
HPV16 ¹ /40	1 (2,8)	-	-	-	1 (2,4)
HPV16 ¹ /62	1 (2,8)	-	-	-	1 (2,4)
HPV18 ¹ /40	-	-	1 (50,0)	-	1 (2,4)
HPV81	-	1 (50,0)	-	-	1 (2,4)
Ausente	25 (69,4)	1 (50,0)	-	2 (100,0)	28 (66,7)

**CEC: carcinoma de células escamosas; ¹ HPV alto risco

5.2 EXPERIMENTOS GLOBAIS DE ANÁLISES GENÔMICAS E TRANSCRIPTÔMICAS

5.2.1 Avaliação de Ganhos e Perdas Genômicas

A. Avaliação dos diferentes subtipos histológicos tumorais

Após obtenção dos dados de alteração no número de cópias para os CaPe (n=41), foi realizada uma análise de agrupamentos entre todos os carcinomas segundo o subtipo histológico para verificar se havia um perfil genômico característico.

A análise do número de alterações genômicas para cada grupo de tumores revelou 49 CNAs para CEC misto usual-papilífero (n=1), 16 CNAs para CEC misto usual- verrucoso (n=1) e uma média de 13,5 CNAs para os CEC papilíferos (n=2), 28,5 CNAs para os CEC usuais (n=35) e 1,5 CNAs para os CEC verrucosos (n=2). Embora não tenha sido possível a realização de análises estatísticas devido ao baixo número de amostras na maioria dos grupos, ficou evidente que os CECs do subtipo verrucoso apresentaram um número menor de CNAs quando comparados aos outros tipos tumorais. Foram encontradas somente três alterações genômicas no carcinoma verrucoso, sendo uma perda em 16p11.2-p11.1 ganho em 22q13.33 e perda em Yq11.222-q11.223.

Considerando os perfis obtidos, optou-se pela exclusão dos dois casos de carcinomas verrucosos e do CEC misto (usual-verrucoso) das análises subsequentes, resultando em um número amostral final de 38 carcinomas de pênis.

B. Caracterização geral das alterações tumorais

Após a exclusão dos carcinomas verrucosos, foram analisados 38 CECs de pênis, sendo 35 usuais, dois papilíferos e um misto (usual - papilífero) para caracterização tumoral. O ideograma final para todos os casos analisados, bem como a representação da frequência das alterações por cromossomo, está ilustrado na **Figura 3**. Foram detectadas 1.074 CNAs com média de $28,3 \pm 17,8$ CNAs/caso. Os tumores avaliados apresentaram alterações genômicas que variaram de 2 a 68 CNAs por amostra, as quais foram divididas em ganhos (uma cópia adicional), perdas (uma cópia ausente), alto nível de ganhos (duas ou mais cópias adicionais) e deleções homozigotas (duas cópias ausentes). Foram observados 419 ganhos (39%), 590

perdas (54,9%), 61 ganhos em alto nível (5,7%) e quatro deleções homozigotas (0,4%) (**Figura 3C**).

Foram selecionadas e submetidas para análises mais detalhadas as alterações presentes em mais de 20% dos casos (**Tabela 3, Figura 4**). Foram detectadas 28 regiões frequentemente alteradas envolvendo os cromossomos 3, 5, 8, 9, 20, 21 e Y, sendo 15 ganhos e 13 perdas genômicas. Essas alterações variavam em 26 a 66% dos casos avaliados.

Foram detectados ganhos em 3q (16 de 38 casos), 5p (10 casos), 8q (25 casos), 9p (10 casos), 9q (11 casos), 20p (10 casos) e 21p (10 casos). Essas alterações envolveram 1.702 genes e 40 miRNAs. No geral, os ganhos compreendiam grandes segmentos genômicos. Especialmente, os cromossomos 3 e 8 apresentaram alterações envolvendo quase todos os braços: perdas de 3p e 8p e ganhos de 3q e 8q. Somente quatro regiões apresentaram menos que 10 genes envolvidos, sendo elas 8q12.1 (genes *RP1* e *XKR4*), 9p12.p11.2 (*AK094644*, *AK125850*, *ANKRD20A2*, *ANKRD20A3*, *BC064148*, *CBWD5*, *CR605783*, *DQ588135* e *FAM95B1*), 20p12.1 (*BANF2*, *BFSP1*, *DSTN*, *KIAA1398*, *KIF16B*, *OTOR*, *PCSK2*, *RRBP1* e *SNRPB2*) e 21p11.1 (*BAGE*, *BAGE1*, *BAGE2*, *BAGE3*, *BAGE4* e *BAGE5*). A comparação dos achados com o banco de dados DGV (do inglês, *Database of genomic variants*) mostrou que os ganhos detectados apresentavam frequência de CNAs já descritas variando de 0 a 100%.

As perdas genômicas ocorreram em 3p (16 de 38 casos), 8p (19 casos), 9p (10 casos), 21p (10 casos) e Y (15 casos). Em conjunto estas alterações envolveram 786 genes e 14 miRNAs. Assim como para ganhos, as regiões de perdas envolveram praticamente os braços inteiros dos cromossomos 3p, 8p e Y e somente cinco áreas

apresentaram menos que 10 genes alterados: 3p26.3 (*CNTN4*, *CNTN6* e *hNB-3*), 3p22.2 (*ACAA1*, *DLEC1*, *MYD88*, *ORCTL4*, *OSR1*, *OXSRI*, *SLC22A13*, *SLC22A14*, *XYLB*), 9p21.3 (*C9orf53*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *CDKN2B-AS1*, *CDKN2BAS* e *MTAP*), 21p11.1 (*BAGE*, *BAGE1*, *BAGE2*, *BAGE3*, *BAGE4* e *BAGE5*) e Yq11.21-q11.221 (*KIAA0951*, *NLGN4Y*, *TMSB4Y*, *UTY*, *VCY* e *VCY1B*). Semelhante ao detectado para ganhos, a comparação com o DGV revelou as perdas variavam de 0 a 100% das alterações já descritas.

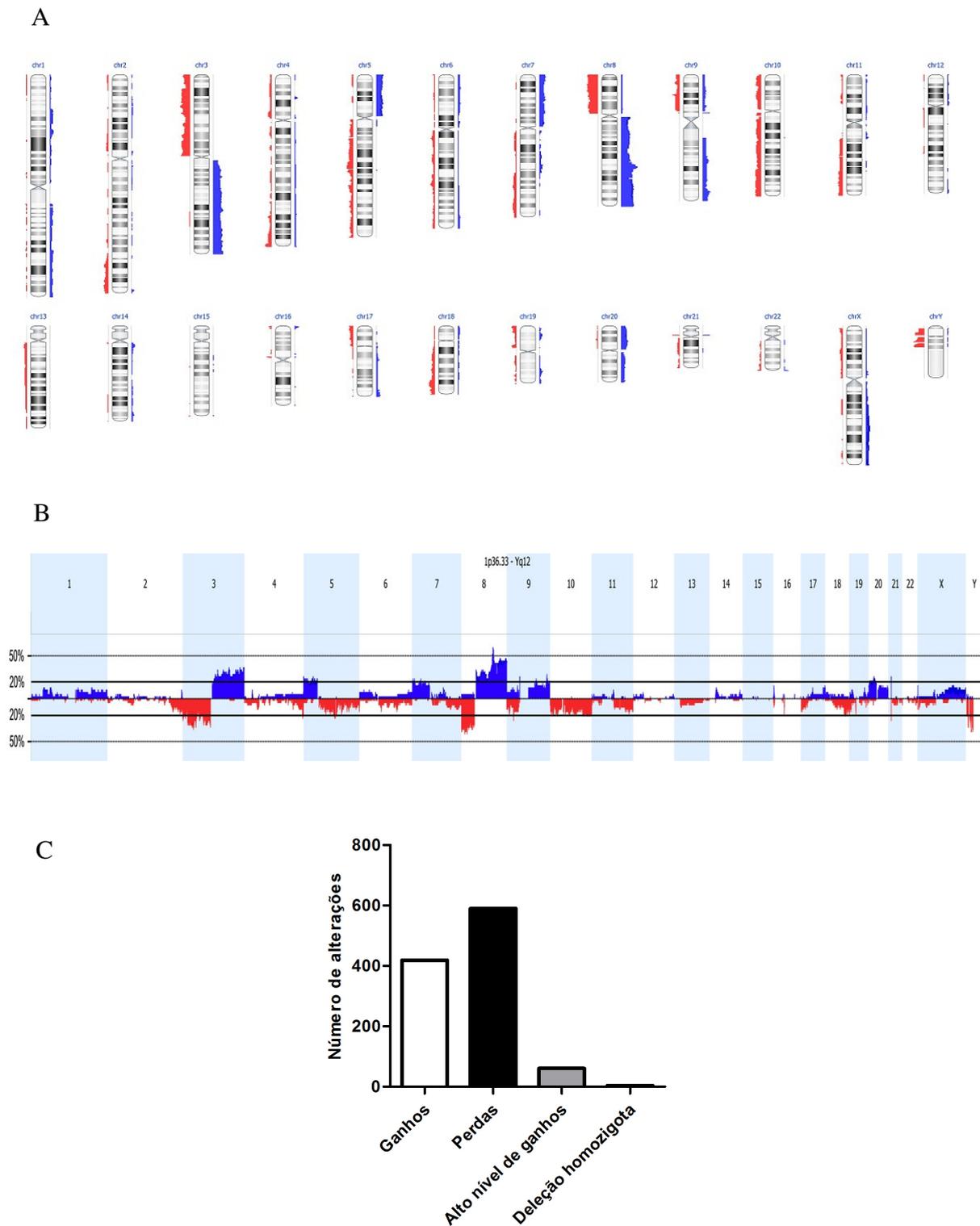


Figura 3 - Caracterização genômica dos 38 CECs de pênis avaliados quanto a ganhos e perdas genômicas. O ideograma representa as alterações genômicas em (A), enquanto as frequências das alterações para cada cromossomo são mostradas em (B) (cromossomo 1 ao Y). As barras superiores ou à direita (azuis) indicam ganhos genômicos, enquanto as barras inferiores ou à esquerda (vermelhas) referem-se a perdas cromossômicas. O gráfico (C) representa o número de regiões com ganhos e perdas detectados em todo o conjunto cromossômico para todos os CaPe. Imagens geradas pelos *softwares* *GraphPad Prism 5.0* e *Nexus version 6.0*.

Tabela 3 - Alterações genômicas encontradas em mais de 20% dos 38 casos de CaPe avaliados.

Localização	Start	End	Evento	No.	Genes Símbolo**	No.	miRNAs Símbolo**	Cobertura CNV (%)***	Frequência (%)
Cromossomo 3									
p26.3	993.748	2.670.578	Perda	3	<i>CNTN4, CNTN6, hNB-3</i>	0	0	0	26
p24.3 - p22.2	15.550.927	37.778.461	Perda	109	-	2	<i>hsa-mir-128-2, hsa-mir-563</i>	13	42
p22.2	38.062.745	38.411.982	Perda	9	<i>ACAA1, DLEC1, MYD88, ORCTL4, OSRI, OXSRI, SLC22A13, SLC22A14, XYLB</i>	0	0	0	26
p22.2 - p21.32	38.941.951	44.629.118	Perda	74	-	1	<i>hsa-mir-138-1</i>	0	34
p21.1 - p14.3	54.190.324	57.080.457	Perda	15	-	0	0	15	26
p14.1	66.457.075	70.311.198	Perda	23	-	0	0	0	32
p13 - p11.1	72.491.521	90.264.177	Perda	44	-	1	<i>hsa-mir-1324</i>	0	34
q12.3 - q13.13	104.132.986	110.515.632	Ganho	34	-	0	0	0	29
q13.13 - q13.31	111.130.268	115.247.042	Ganho	46	-	1	<i>hsa-mir-567</i>	0	34
q13.31 - q25.31	116.240.263	157.523.060	Ganho	428	-	3	<i>hsa-mir-1280, hsa-mir-548i-1, hsa-mir-198</i>	0	42
q25.31 - q29	157.878.836	199.501.827	Ganho	382	-	12	-	91	42
Cromossomo 5									
p13.3	31.077.746	32.825.265	Ganho	13	-	1	<i>hsa-mir-579</i>	0	26
p15.33	0	1.305.409	Ganho	33	-	0	0	74	26
Cromossomo 8									
p23.3 - p11.21	0	43.175.310	Perda	444	-	10	<i>hsa-mir-486, hsa-mir-548i-3, hsa-mir-124-1, hsa-mir-598, hsa-mir-383, hsa-mir-320a, hsa-mir-596, hsa-mir-597, hsa-mir-548h-4, hsa-mir-1322</i>	75	50
q11.1 - q11.23	47.062.121	55.033.387	Ganho	28	-	0	0	2	34
q12.1	55.682.239	56.316.934	Ganho	2	<i>RPI, XKR4</i>	0	0	0	26
q12.1 - q21.13	56.967.220	82.092.323	Ganho	172	-	2	<i>hsa-mir-2052, hsa-mir-124-2</i>	0	34
q21.2 - q24.3	87.183.119	146.274.826	Ganho	461	-	19	-	0	66
q22.3*	101.799.120	103.732.868	Ganho	16	-	0	0	29	61

Conto/ Tabela 3

Localização	Start	End	Evento		Genes		miRNAs	Cobertura CNV (%)***	Frequência (%)
Cromossomo 9									
p21.3*	21.905.405	22.067.827	Perda	6	<i>C9orf53, CDKN2A, CDKN2B, CDKN2B-AS1, CDKN2BAS, TAPAK094644, AK125850,</i>	0	0	100	26
p12 - p11.2*	42.014.069	42.702.421	Ganho	9	<i>ANKRD20A2, ANKRD20A3, BC064148, CBWD5, CR605783, DQ588135, FAM95B1</i>	0	0	0	26
q33.3 - q34.11*	129.284.384	130.899.653	Ganho	79	-	2	<i>hsa-mir-199b, hsa-mir-219-2</i>	32	29
Cromossomo 20									
p12.1	16.381.425	17.709.418	Ganho	9	<i>BANF2, BFSP1, DSTN, KIAA1398, KIF16B, OTOR, PCSK2, RRBP1, SNRPB2</i>	0	0	100	26
Cromossomo 21									
p11.1*	10.013.263	10.117.957	Ganho	6	<i>BAGE, BAGE1, BAGE2, BAGE3, BAGE4, BAGE5</i>	0	0	89	26
p11.1*	10.013.263	10.117.957	Perda	6	<i>BAGE, BAGE1, BAGE2, BAGE3, BAGE4, BAGE5</i>	0	0	44	26
Cromossomo Y									
p11.2*	7.278.858	10.143.912	Perda	19	-	0	0	0	29
q11.21 - q11.221*	13.924.906	17.801.127	Perda	6	<i>KIAA0951, NLGN4Y, TMSB4Y, UTY, VCY, VCY1B</i>	0	0	0	39
q11.222 - q11.223*	19.700.039	23.283.748	Perda	28	-	0	0	0	39

* regiões descritas como estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$) pelo software Nexus version 6.0.

** genes/miRNAs de regiões contendo mais que dez moléculas não foram descritos (sinal -).

*** segundo o Database of genomic variants (<http://www.projects.tcag.ca/variation/>)

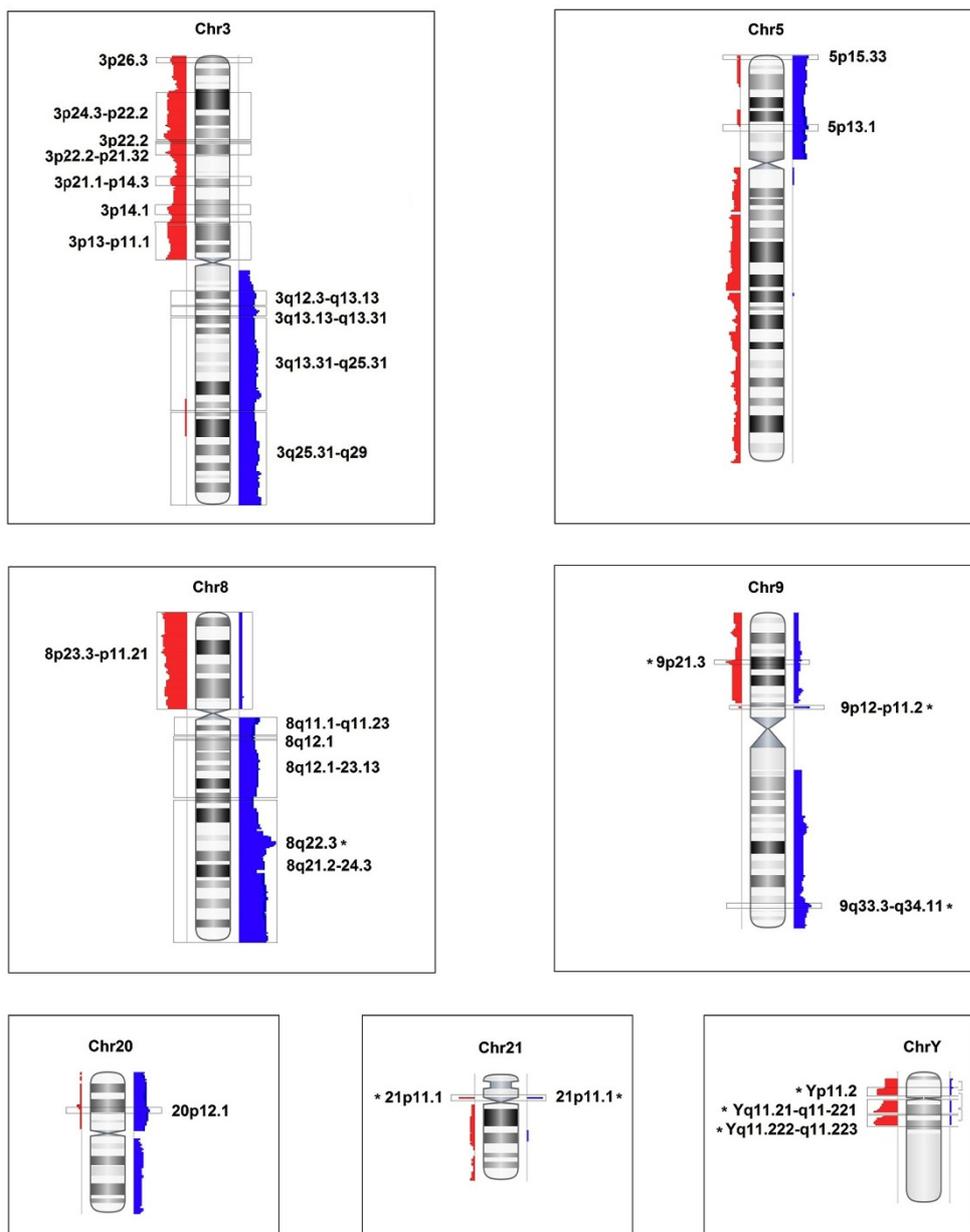


Figura 4 - Representação esquemática dos cromossomos com alterações presentes em mais que 20% dos CaPe avaliados (cromossomos 3, 5, 8, 9, 20, 21 e Y). As alterações mais frequentes estão detalhadas ao lado de cada região. As barras à direita (azuis) indicam ganhos genômicos, enquanto barras à esquerda (vermelhas) referem-se a perdas cromossômicas. Regiões com * foram descritas como significativas ($P \leq 0,05$). Chr: cromossomo. Imagens geradas pelo *software Nexus version 6.0*.

Clusterização hierárquica. O agrupamento hierárquico não supervisionado das 38 amostras avaliadas pela técnica de aCGH com base no padrão de alterações genômicas revelou quatro grupos distintos, denominados *cluster 1* (18 casos), *cluster 2* (9 casos), *cluster 3* (5 casos) e *cluster 4* (6 casos) (**Figura 5**).

A maior média de alterações foi encontrada para o *cluster 1* ($33,28 \pm 17,80$ CNAs), seguido por *cluster 2* ($26,11 \pm 18,5$ CNAs), *cluster 3* ($22,00 \pm 13,60$ CNAs) e *cluster 4* ($21,67 \pm 19,31$ CNAs). Embora tenham sido observados valores medianos de ganhos e perdas decrescentes do *cluster 1* em direção ao *cluster 4*, esses resultados não foram diferencialmente significativos quando analisados pelo teste de *Kruskal-Wallis* ($P=0,4121$).

A comparação genômica aos pares entre os *clusters 1* a *4* mostrou diversas regiões cromossômicas com padrão de alterações distintos entre eles envolvendo principalmente os cromossomos 3 e 8, as quais mostraram-se mais frequentes nos grupos contendo maior média de alterações genômicas. Quando comparados o *cluster 1 versus 2*, foram encontradas perdas significativas em 8p e ganhos em 3q e 8q. Essas alterações foram frequentes no *cluster 1* e praticamente ausentes no *cluster 2* (vide **Figura 5**). A comparação entre *cluster 2 versus 3* revelou ganhos em 8q com alta frequência no *cluster 2* quando comparado ao *cluster 3*, enquanto a análise *cluster 3 versus 4* mostrou ganhos em 8q mais frequentes no *cluster 3* em relação ao 4.

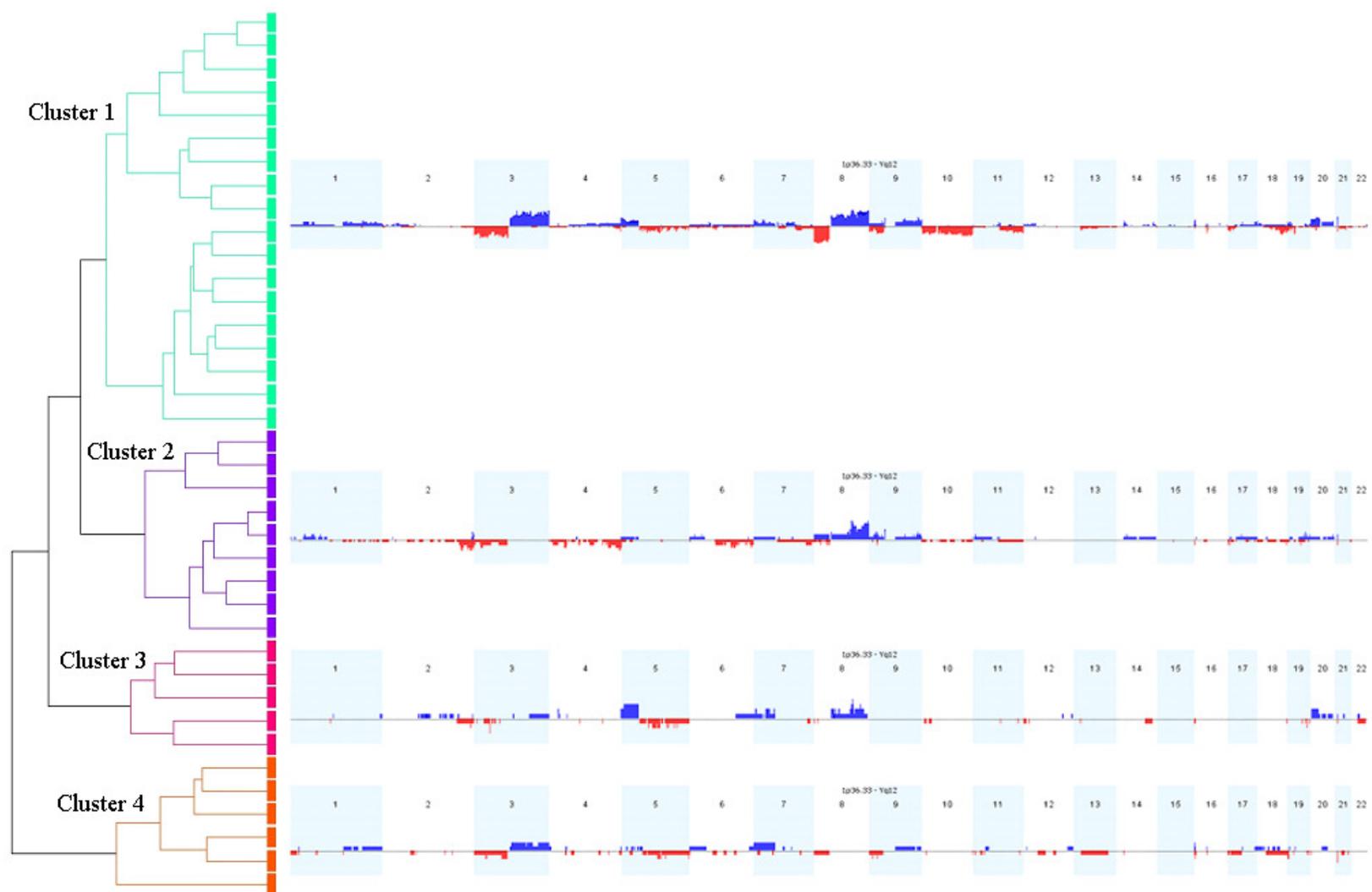


Figura 5 – Agrupamento hierárquico com base no perfil genômico realizado para os 38 CaPe avaliados por aCGH. Foram encontrados quatro grupos distintos, os quais estão representados por diferentes cores. O perfil genômico está presente à direita de cada grupo (cromossomo 1 ao Y). Imagens geradas pelo *software* Nexus version 6.0.

Associação com características clínicas e sobrevida. A comparação entre as 28 alterações genômicas (presentes >20% dos casos) com características clínico-patológicas dos pacientes e sobrevida mostrou associação significativa, as quais estão apresentadas na **Tabela 4**. As características de pior prognóstico, tais como estadio clínico III-IV, estadio T III-IV e morte do paciente foram significativamente associadas com as alterações em 3p e 8p. No entanto, outras regiões estavam associadas com fatores de prognóstico favorável, como ausência de metástase linfonodal ou invasão perineural. Isso ocorreu principalmente para regiões mapeadas em 8q, 9p e 20p (**Tabela 4**). A comparação entre o padrão de alterações presentes nos quatro *clusters* e os dados clínicos e patológicos, incluindo o perfil de infecção pelo HPV, não revelou resultados significativos.

A análise de sobrevida foi realizada para 26 pacientes, nos quais haviam dados disponíveis. Foi detectada CSS diminuída nos casos que apresentavam alterações em seis regiões de perdas e ganhos localizadas em 3p e 3q, respectivamente, sendo elas: 3p14.1, 3p21.1-p14.3, 3p22.2, 3p22.2-p21.32, 3p24.3-p22.2 e 3q25.31-q29. Não foram observadas alterações na sobrevida em pacientes com CNAs presentes em outros cromossomos ou segundo o padrão de agrupamento hierárquico.

Tabela 4 - Características clínicas e patológicas associadas com as alterações detectadas em mais de 20% dos CaPe avaliados.

Localização	Alteração	Variável clínica		P valor
Cromossomo 3				
3p13-p11.1	Perda	Estadio T	III-IV	0,007
		Estadio clínico	III-IV	0,049
3p14.1	Perda	Estadio T	III-IV	0,022
		Estadio clínico	III-IV	0,025
3p21.1-p14.3	Perda	Evento	Morte	0,027
		Evento	Morte	0,012
		Estadio clínico	III-IV	0,028
		Estadio T	III-IV	0,034
3p22.2	Perda	Estadio T	III-IV	0,034
3p22.2-p21.32	Perda	Evento	Morte	0,038
3p24.3-p22.2	Perda	Estadio T	III-IV	0,001
		Estadio clínico	III-IV	0,002
		Evento	Morte	0,009
		Recorrência	Sim	0,015
Cromossomo 8				
8p23.3-p11.21	Perda	Recorrência	Sim	0,045
8q11.1-q11.23	Ganho	Metástase linfonodal	Não	0,028
8q21.2-q24.3	Ganho	Metástase linfonodal	Não	0,013
		Idade	55 ou menos	0,033
8q12.1-q22.3	Ganho	Metástase linfonodal	Não	0,003
8q12.1	Ganho	Metástase linfonodal	Não	0,005
8q22.3	Ganho	Metástase linfonodal	Não	0,005
		Idade	55 ou menos	0,007
		Invasão perineural	Não	0,041
Cromossomo 9				
9p12-p11.2	Ganho	Grau histológico	I	0,049
Cromossomo 20				
20p12.1	Ganho	Consumo de tabaco	Não	0,018
		Metástase linfonodal	Não	0,036
Cromossomo Y				
Yp11.2	Perda	Estadio clínico	III-IV	0,028
		Metástase linfonodal	Não	0,028
		Recorrência	Sim	0,034
Yq11.21-q11.221	Perda	História familiar	Não	0,015
		Consumo de álcool	Não	0,017
		Segundo tumor primário	Não	0,019
Yq11.222-q11.2223	Perda	História familiar	Não	0,011
		Consumo de álcool	Não	0,015
		Segundo tumor primário	Não	0,019

C. Perfil genômico de acordo com a infecção pelo HPV

Foi também realizada a comparação entre o padrão de alterações genômicas quanto a positividade para o HPV, ou seja, entre os 13 casos positivos e os 25 casos negativos para a presença do vírus.

Não foram observadas diferenças significativas no número médio de alterações entre os grupos com presença (média de $28,54 \pm 16,23$ CNAs) e ausência de infecção viral (média de $28,12 \pm 18,84$ CNAs) (teste de *Mann-Whitney*; $P=0,9877$).

A busca por regiões com perdas ou ganhos genômicos capazes de distinguir os dois grupos avaliados resultou na detecção de 19 ganhos ou perdas genômicas diferenciais, todas localizadas em maior frequência nos tumores HPV positivos (**Tabela 5**). Essas alterações envolveram perdas em 2q, 3p, 4p, 5q e 17p e ganhos em 8p, 9p, 16p e 19p. É interessante notar a presença do gene *TP53* em uma das regiões de perda do cromossomo 17.

A comparação das regiões diferenciais entre os casos positivos e negativos para infecção pelo HPV com dados disponíveis em literatura indicou que 10/19 regiões alteradas no grupo HPV positivo correspondem a sítios de integração viral descritos em linhagens celulares ou tumores cervicais (**Tabela 5**). Não foram encontrados outros resultados significativos na comparação entre a positividade para o HPV e características clínicas e patológicas, bem como para CSS.

D. Perfil genômico de acordo com dados clínicos e patológicos

A disponibilidade de amostras de lesões de pênis adicionais (hiperplasia e recidiva), bem como as informações clínicas e patológicas, permitiu a realização de análises nestes casos, as quais estão detalhadas a seguir.

Tabela 5 - Alterações genômicas que diferenciaram os casos positivos (n=13) e negativos para o HPV (n=25) avaliados por aCGH.

Localização	Evento	Genes	miRNAs	Freq. Neg. (%)**	Freq. Pos. (%)**	P valor	Sítio integração***
Cromossomo 2							
q33.2 - q33.3	Perda	19	0	0,0	21,4	0,03	Sim (2q33 - FRA21)
q35	Perda	5	0	0,0	21,4	0,03	Sim (2q34-q35)
q36.3 - q37.1	Perda	53	3	3,7	28,6	0,04	Sim (2q36)
q37.1	Perda	33	0	3,7	35,7	0,01	Não
q37.3	Perda	5	0	3,7	35,7	0,01	Não
q37.3	Perda	12	0	3,7	28,6	0,04	Não
q37.3	Perda	1	0	3,7	28,6	0,04	Não
q37.1	Perda	2	0	7,4	35,7	0,04	Não
Cromossomo 3							
p21.1	Perda	2	0	7,4	35,7	0,04	Sim (3p21)
Cromossomo 4							
p16.1 - p15.2	Perda	88	3	0,0	21,4	0,03	Sim (4p16, 4p15)
p14 - p13	Perda	5	0	0,0	21,4	0,03	Não
Cromossomo 5							
q31.1	Perda	3	0	0,0	21,4	0,03	Sim (5q31 - FRA5C)
Cromossomo 8							
p12	Ganho	19	0	0,0	21,4	0,03	Sim (8p12)
Cromossomo 9							
p13.3	Ganho	22	0	3,7	28,6	0,04	Sim (9p13)
Cromossomo 16							
p13.3	Ganho	5	0	3,7	28,6	0,04	Não
Cromossomo 17							
p13.1*	Perda	55	0	0,0	21,4	0,03	Não
p12 - p11.2	Perda	103	2	0,0	21,4	0,03	Não
p11.2	Perda	11	0	0,0	21,4	0,03	Não
Cromossomo 19							
q13.32	Ganho	10	0	0,0	21,4	0,03	Sim (19q13 - FRA19A)

* gene *TP53* incluso; ** revisado por WENTZENSEN et al. 2004: alterações observadas em carcinomas ou linhagens de câncer cervical; *** Freq. Negativos (%): frequência de casos negativos para HPV contendo a região alterada; Freq. Positivos (%): frequência de casos positivos para HPV com região alterada. .

Hiperplasia versus CEC. O caso PE3T (hiperplasia) apresentou ganhos em 1p36.33 e 1q21.1-q44 (3.199 genes, 45 miRNAs) e perdas em 2q35-q37.1 (236 genes, 6 miRNAs), 8p23.3-p11.21 (472 genes, 10 miRNAs), 10q23.1-q25.2 (388 genes, 9 miRNAs), 17q25.3 (27 genes), 19p13.3 (23 genes) e Yq11.222-q11.223 (30 genes). Essas regiões estavam também alteradas nos CECs primários (n=38) com

frequência variando entre 2 e 42% dos casos. Regiões de perdas e ganhos em 3p, 3q, 5p, 5q, 7p, 8q, 9p, 9q, 10q, 18q, 20p, 21p e Y ocorreram exclusivamente em tumores primários.

Recorrência versus tumor primário. A comparação entre o tumor primário (PA9T) e a recidiva (PA11T) do mesmo paciente revelou um total de 13 CNAs para o tumor primário, sendo sete ganhos e seis perdas genômicas; a recidiva apresentou 16 ganhos e 14 perdas, totalizando 30 CNAs. Foi possível verificar regiões alteradas em comum às duas amostras em 8q22.2-q22.3 (ganho), 8q24.22-q24.3 (ganho), 12p11.22-p11.21 (ganho), 19p12 (perda), 19q13.2-q13.32 (ganho), Yp11.2 (perda) e Yq11.222-q11.223 (perda). Alterações adicionais adquiridas pela recidiva e não detectadas no tumor primário incluem ganhos em 7q, 8q, 9p, 9q, 12p, 20q e Xq, e perdas em 1q, 2q, 3p, 8p, 12q, 15q, 16p, 19p e 21p.

Características de pior prognóstico. Outra análise realizada envolveu a comparação do perfil genômico entre dois grupos relacionados a características clínicas e patológicas dos pacientes, incluindo recorrência (sim *versus* não), margens cirúrgicas (livres *versus* comprometidas), metástase linfonodal (sim *versus* não), invasão perineural (sim *versus* não), evento óbito *versus* vivo, estadió T (I-II *versus* III-IV) e estadió clínico (I-II *versus* III-IV). Seis das sete características resultaram em regiões estatisticamente distintas entre os dois grupos ($P \leq 0,05$), exceto invasão perineural. As regiões que diferenciam estes grupos podem ser observadas na **Figura 6**. A análise dos gráficos permite notar maior frequência de alteração para 3p, especificamente perdas, nos casos com pior prognóstico, incluindo presença de recidiva, margens cirúrgicas comprometidas, óbito e estadió clínico e T avançados (III-IV). Embora esse perfil de alterações não tenha sido estatisticamente

significativo para metástase linfonodal, a análise da figura revela a presença de alterações em 3p com maior frequência nos casos com metástase.

Foram detectadas 12 regiões genômicas com alterações diferenciais entre os casos positivos e negativos para metástase linfonodal, das quais somente uma encontra-se com maior frequência nos casos positivos. Ganhos em 7p15.3-p15.2 (15 genes e 1 miRNA), foram detectados em 50% dos casos positivos para metástase linfonodal.

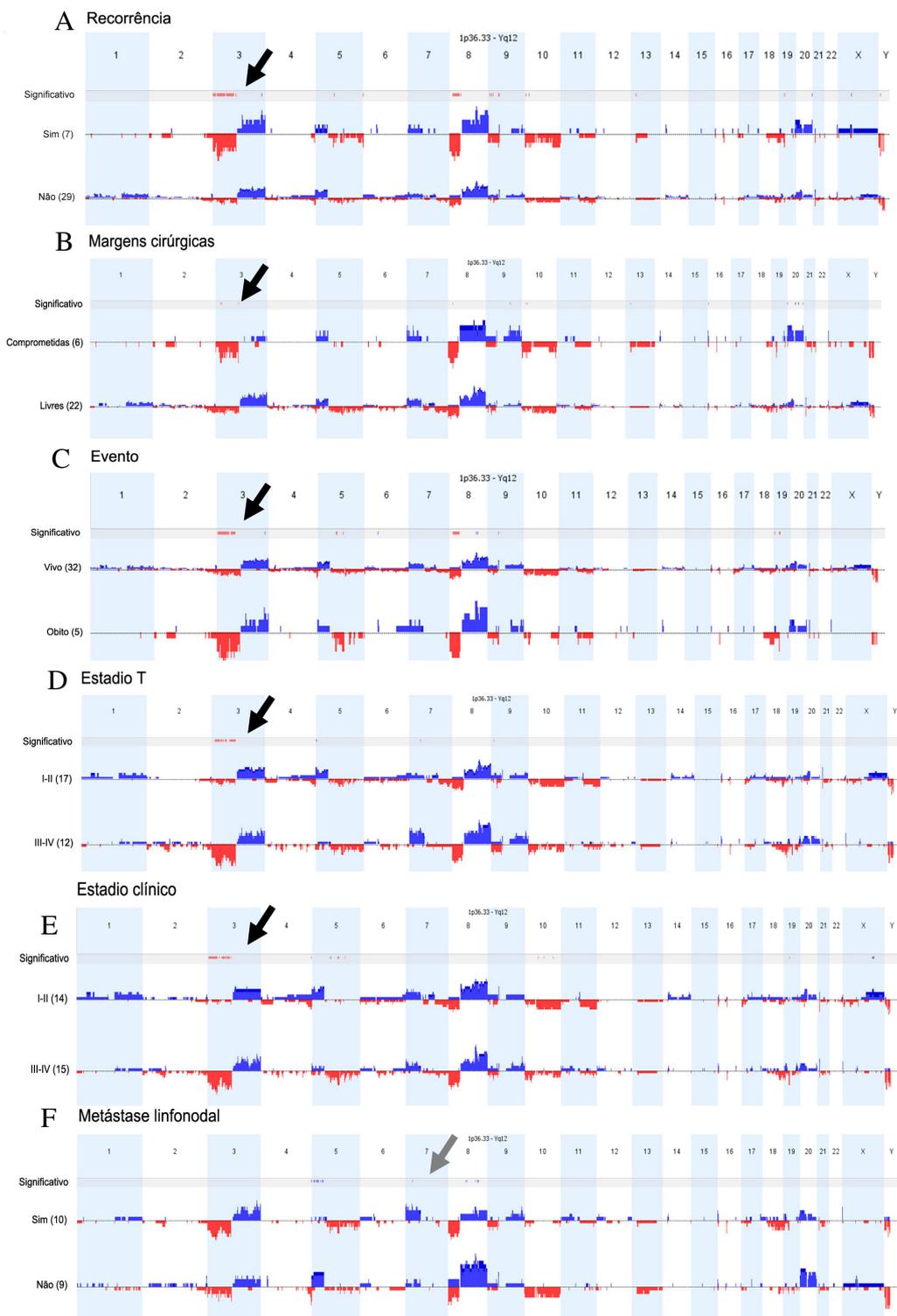


Figura 6 - Comparação do perfil genômico de acordo com características clínicas e patológicas. Foram verificadas alterações diferenciais para grupos classificados quanto a recorrência (A), margens cirúrgicas (B), evento (C), estadio T (D), estadio clínico (E) e metástase linfonodal (F) para todo o conjunto cromossômico. Estão destacadas as regiões significativamente diferenciais (linha “Significativo”), alterações frequentes em 3p (setas pretas) e a região exclusiva de casos com metástase linfonodal em 7p (seta cinza). As barras superiores (azuis) indicam ganhos genômicos, enquanto as barras inferiores (vermelhas) referem-se a perdas cromossômicas. Imagens geradas pelo *software* Nexus *version* 6.0.

5.2.2 Avaliação de Alteração na Expressão de Transcritos

A. Avaliação de expressão diferencial entre tumores e normais

Para evitar desvios no perfil de expressão gênica devido a diferenças no subtipo histológico dos CECs, optou-se pela exclusão dos carcinomas verrucosos e as análises foram realizadas para os 39 CECs de pênis restantes (36 CECs usuais, dois papilíferos e um misto usual-papilífero).

Foram identificados 875 genes diferencialmente expressos, sendo 241 com aumento e 634 com diminuição da expressão gênica (27,5% e 72,5%, respectivamente) (**Figura 7**). Os genes com expressão aumentada estavam mapeados principalmente nos cromossomos 1 e 17, enquanto a diminuição na expressão ocorreu preferencialmente para moléculas mapeadas nos cromossomos 1 e 3.

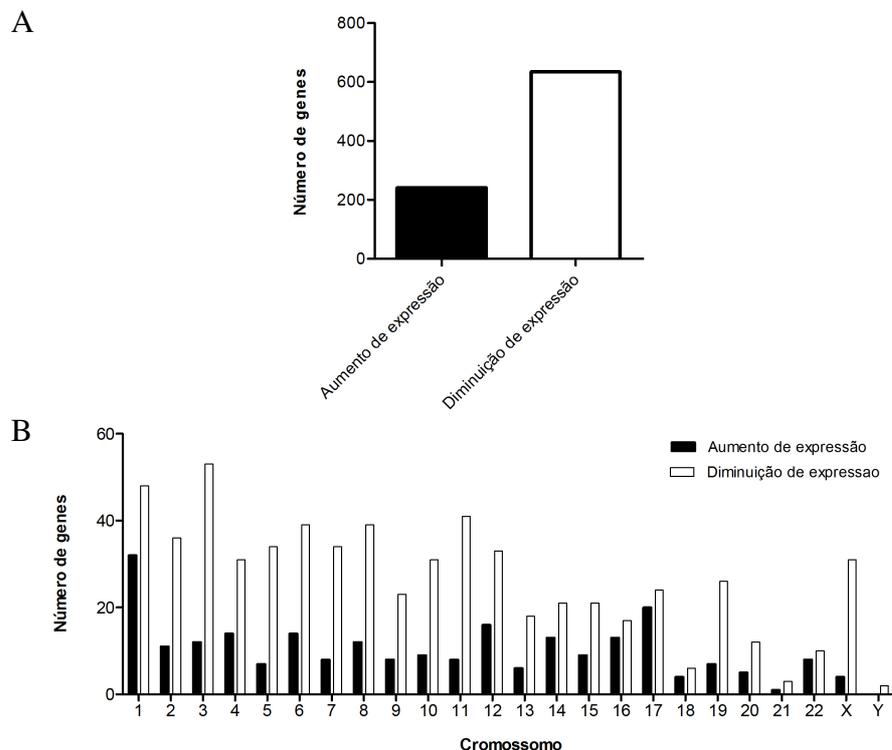


Figura 7 - Perfil de expressão gênica em larga escala para 39 CaPe avaliados. Em (A) estão representados o número de genes com aumento ou diminuição na expressão de transcritos nos tumores de pênis em relação a glândulas normais. Os genes com aumento e diminuição de expressão foram também agrupados quanto à localização cromossômica (B). Imagens geradas pelo *software GraphPad Prism 5.0*.

As dez principais doenças e funções celulares ou moleculares relacionadas aos 875 genes com aumento ou diminuição de expressão estão representadas na **Figura 8** (maiores *scores*). A avaliação dos resultados obtidos quanto a doenças mostrou um grande número de moléculas alteradas associadas ao câncer. Com relação a funções moleculares e celulares, foi observada predominância de genes envolvidos na movimentação celular, duplicação, recombinação e reparo do DNA, desenvolvimento celular, crescimento e proliferação, ciclo celular e morte e sobrevivência da célula (**Figura 8**).

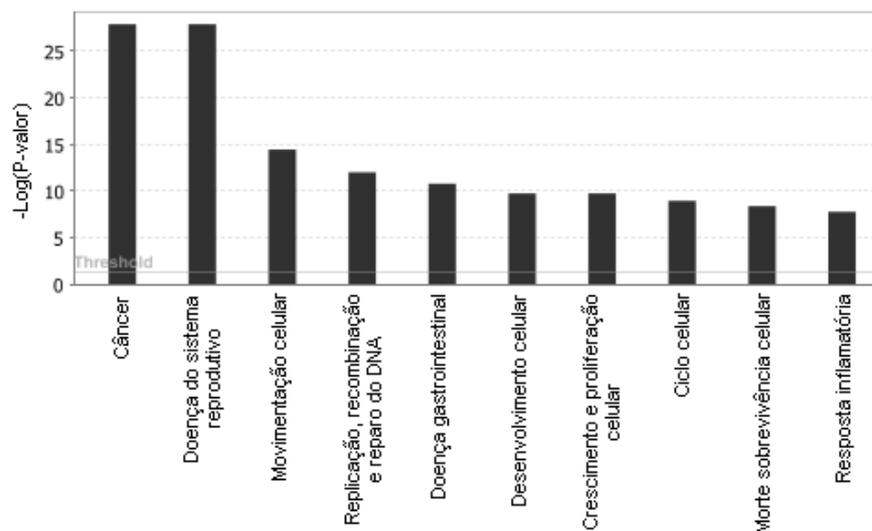


Figura 8 - Caracterização funcional do grupo de genes obtidos após análise de expressão gênica para 39 CaPe. O gráfico representa as dez funções e doenças associadas aos genes com expressão gênica diferencial com maiores *scores*. Todas as categorias foram consideradas significantes ($[-\text{Log}(\text{P-valor})] > 1.3$). Imagens geradas pelo *software* IPA.

A análise do grupo de genes diferencialmente expressos também revelou as principais vias canônicas (maiores *scores*) possivelmente alteradas devido ao aumento ou diminuição na expressão dessas moléculas (**Quadro 5**). Nessa lista podem ser detectadas alterações em vias relacionadas diretamente ao câncer ou a processos a ele associados, tais como a via de sinalização do câncer de bexiga (13/89 genes diferencialmente expressos), sinalização do RhoGDI (17/191 genes) e sinalização do receptor do aril hidrocarboneto (13/155 genes).

Outra análise realizada permitiu a predição de ativação/inativação de reguladores transcricionais (RT) com base nas moléculas por eles reguladas. De acordo com o sentido de alteração dos genes alvo de determinado RT, o programa IPA foi capaz de prever a ativação/inativação significativa de três moléculas ($P \leq 0,05$): FOXO1, JUN e TP53. Os RT FOXO1 ($Z\text{-score}=2,59$) e JUN ($Z\text{-score}=2,19$) foram classificados pelo programa como ativados, uma vez que o

sentido de alteração da maior parte dos genes por eles regulados está de acordo com o descrito em literatura (7/10 genes consistentes para ativação da proteína FOXO1 e 5/9 genes para JUN). Já para TP53 (*Z-score*=-2,54) foi detectada alteração de expressão inversa à descrita em literatura para os genes por ele regulados, o que levou à classificação do RT como inativado (20/32 genes alvo consistentes com inibição). Vale ressaltar que a análise realizada pelo *software* não leva em consideração o sentido de alteração de expressão gênica observado para o RT (somente para seus genes alvo) e prediz o *status* de ativação protéico.

Quadro 5 - Relação dos genes diferencialmente expressos presentes nas 10 vias canônicas com maiores *scores* [-Log(P-valor)].

Via canônica	-Log(P-valor)	Moléculas*
<i>Fibrose hepática/Ativação de células hepáticas estreladas</i>	1,53E-01	↑ <i>IFNG</i> , ↑ <i>IL8</i> , ↑ <i>CCR5</i> , ↑ <i>IL1A</i> , <i>CTGF</i> , ↑ <i>CXCL9</i> , ↓ <i>EDNRB</i> , ↓ <i>FGF2</i> , ↓ <i>FGFR1</i> , ↓ <i>ACTA2</i> , ↓ <i>MYH11</i> , ↓ <i>BCL2</i> , ↓ <i>JGF1</i> , ↓ <i>EDNI</i> , ↓ <i>HGF</i> , ↑ <i>IL1B</i> , ↑ <i>STAT1</i> , ↑ <i>MMP9</i> , ↑ <i>MMP1</i> , ↑ <i>FASLG</i> , ↓ <i>AGT</i> , ↓ <i>PDGFRB</i>
<i>Sinalização do câncer de bexiga</i>	1,46E-01	↑ <i>CDKN2A</i> , ↑ <i>IL8</i> , ↓ <i>FGF2</i> , ↑ <i>MMP10</i> , ↓ <i>FGF13</i> , ↑ <i>CDHI</i> , ↓ <i>FGF10</i> , ↑ <i>E2F1</i> , ↓ <i>MRAS</i> , ↑ <i>MMP12</i> , ↓ <i>FGF7</i> , ↑ <i>MMP1</i> , ↑ <i>MMP9</i>
<i>Sinalização do RhoGDI</i>	8,63E-02	↓ <i>ACTA2</i> , ↑ <i>ITGA2</i> , ↓ <i>CDH6</i> , ↓ <i>RHOJ</i> , ↓ <i>ARHGEF17</i> , ↓ <i>GNA14</i> , ↑ <i>CDHI</i> , ↓ <i>ARHGEF10</i> , ↑ <i>EZR</i> , ↓ <i>GNAO1</i> , ↓ <i>PPP1R12B</i> , ↓ <i>RHOA</i> , ↓ <i>MRAS</i> , ↓ <i>PPP1R12A</i> , ↓ <i>ACTG2</i> , ↓ <i>DLC1</i> , ↓ <i>ESR1</i>
<i>Entrada na fase S mediada por estrógeno</i>	1,79E-01	↑ <i>CCNA2</i> , ↑ <i>E2F1</i> , ↓ <i>ESR1</i> , ↑ <i>CDK1</i> , ↑ <i>CDC25A</i>
<i>Sinalização da arterosclerose</i>	8,89E-02	↓ <i>PLA2G16</i> , ↑ <i>IL8</i> , ↑ <i>IFNG</i> , ↑ <i>ALOX12B</i> , ↑ <i>IL1A</i> , ↓ <i>SELP</i> , ↓ <i>CXCL12</i> , ↑ <i>COL10A1</i> , ↑ <i>IL1B</i> , ↓ <i>PDGFD</i> , ↑ <i>MMP9</i> , ↑ <i>MMP1</i>
<i>Patologia das vias aéreas na doença pulmonar obstrutiva crônica</i>	3,33E-01	↑ <i>IL8</i> , ↑ <i>MMP9</i> , ↑ <i>MMP1</i>
<i>Sinalização do receptor do Aril Hidrocarboneto</i>	8,39E-02	↑ <i>CDKN2A</i> , ↑ <i>CCNA2</i> , ↓ <i>GSTA2</i> , ↓ <i>ALDH1B1</i> , ↑ <i>IL1A</i> , ↓ <i>HSPB2</i> , ↓ <i>GSTM3</i> , ↑ <i>E2F1</i> , ↑ <i>IL1B</i> , ↓ <i>NFIB</i> , ↓ <i>GSTA1</i> , ↓ <i>ESR1</i> , ↑ <i>FASLG</i>
<i>Patogênese da esclerose múltipla</i>	3,33E-01	↑ <i>CCR5</i> , ↑ <i>CXCL9</i> , ↑ <i>CCL3</i>
<i>Interações de agrina nas junções neuromusculares</i>	1,18E-01	↑ <i>NRG1</i> , ↓ <i>LAMC1</i> , ↓ <i>ACTA2</i> , ↑ <i>ITGA2</i> , ↓ <i>MRAS</i> , ↓ <i>UTRN</i> , ↓ <i>ACTG2</i> , ↑ <i>AGRN</i>
<i>Papel do aumento nos níveis de citocinas e quimiocinas na patogênese da influenza</i>	1,46E-01	↑ <i>IL8</i> , ↑ <i>IFNG</i> , ↑ <i>IL1A</i> , ↑ <i>CCR5</i> , ↑ <i>IL1B</i> , ↑ <i>CCL3</i>

* ↑: Aumento de expressão; ↓: Diminuição de expressão

B. Avaliação de expressão diferencial de acordo com a infecção por HPV

A análise de expressão gênica diferencial quanto ao padrão de infecção pelo papilomavírus humano foi realizada para os dois grupos de pacientes (HPV positivo: 11 casos e HPV negativo: 25 casos).

Foram encontrados 381 genes diferencialmente expressos entre os dois grupos, sendo 227 com aumento e 154 com diminuição de expressão gênica no grupo positivo para infecção em relação ao negativo (59,6% e 40,4%, respectivamente) e *fold change* variando de 5,32 a -2,89 (**Figura 9**). A maior parte dos genes com aumento de expressão está mapeada nos cromossomos 1 e 3, enquanto moléculas com expressão diminuída ocorrem com maior frequência nos cromossomos 6 e 7.

Todos os 381 genes diferencialmente expressos entre os casos positivos e negativos para HPV foram submetidos ao agrupamento hierárquico supervisionado e não supervisionado. Não foi observado nenhum tipo de agrupamento na análise não supervisionada. Já no agrupamento supervisionado, embora não tenha havido a separação completa dos dois grupos baseado no perfil diferencial de expressão gênica entre pacientes positivos e negativos para HPV, a análise dos agrupamentos revelou um subgrupo contendo 9/11 casos positivos para infecção viral, denominado *cluster B* (**Figura 10**). Localizavam-se em outro subgrupo (*cluster A*) somente os casos positivos PE2T e PE26T. Além disso, no grupo HPV positivo estava presente um único CaPe negativo, o tumor PA9T.

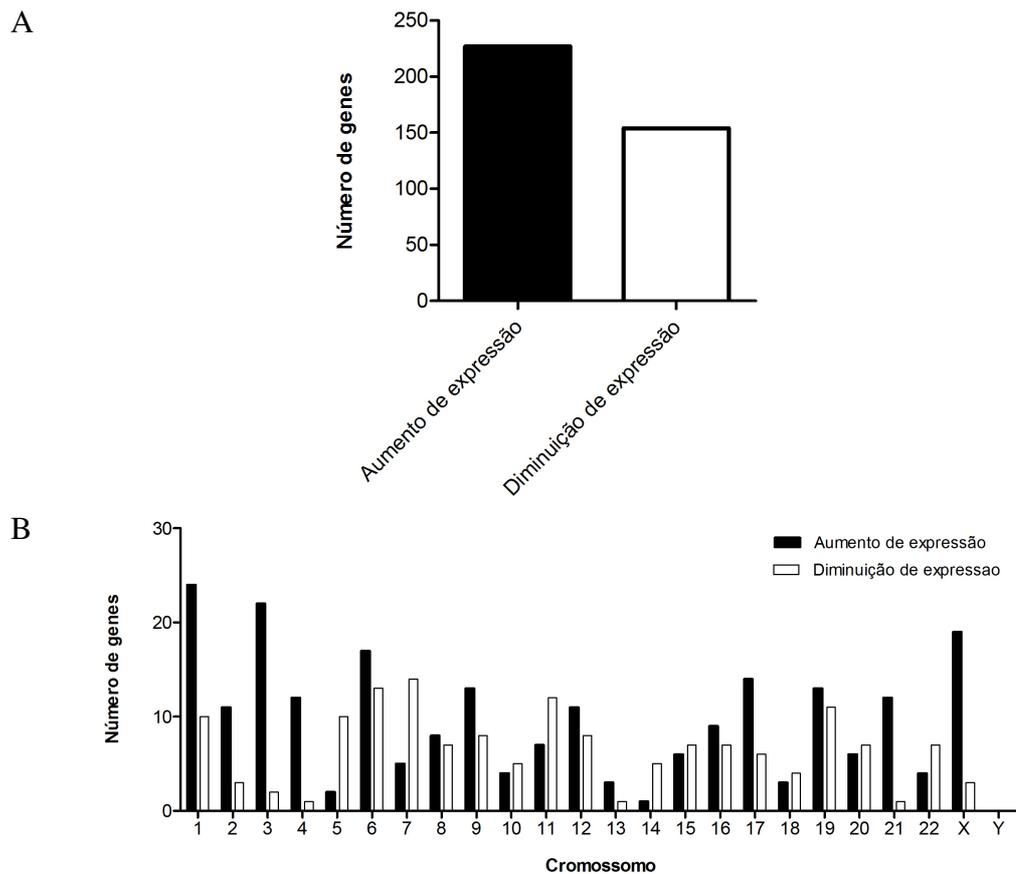


Figura 9 - Perfil de expressão gênica em larga escala para dois grupos classificados quanto à infecção pelo HPV. Em (A) está representado o número de genes com aumento ou diminuição na expressão de transcritos no grupo HPV positivo quando comparado aos casos negativos. Os genes com aumento e diminuição de expressão foram também agrupados quanto à localização cromossômica (B). Imagens geradas pelo *software GraphPad Prism 5.0*.

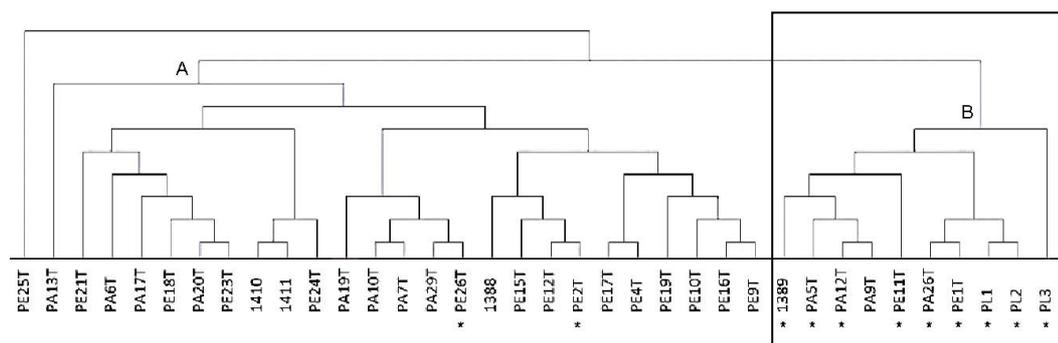


Figura 10 - Agrupamento hierárquico supervisionado quanto à presença ($n=11$) ou ausência ($n=25$) de infecção pelo HPV. Casos positivos para infecção pelo HPV estão representados com asterisco (*). Pode-se observar um subgrupo com presença predominante de casos positivos para infecção pelo HPV (quadrado, *cluster B*).

As dez principais doenças e funções celulares ou moleculares relacionadas aos 381 genes com aumento ou diminuição de expressão estão representadas na **Figura 11** (maiores *scores*). A avaliação dos resultados revela um grande número de moléculas alteradas descritas associadas com o câncer. Com relação a funções moleculares e celulares, foi observada maior significância para genes envolvidos no ciclo celular, desenvolvimento, crescimento e proliferação celular, morte e sobrevivência da célula, morfologia celular, função e manutenção da célula e duplicação, recombinação e reparo do DNA (**Figura 11**).

A análise do grupo de genes diferencialmente expressos também revelou as principais vias canônicas (maiores *scores*) possivelmente alteradas devido ao aumento ou diminuição na expressão dessas moléculas nos casos HPV positivos em relação aos negativos (**Quadro 6**). Nessa lista é possível notar a interferência dos genes alterados principalmente em vias relacionadas ao ciclo celular, tais como a de reparo a erros de pareamento (*mismatch repair*) em eucariotos (3/24 genes diferencialmente expressos) (**Figura 12**), papel do *BRCA1* na resposta a danos ao DNA (4/65 genes) e reparo a quebras de dupla fita por recombinação homóloga (2/17 genes), além das vias associadas à resposta inflamatória, sendo elas apoptose de células-alvo mediada por linfócitos T citotóxicos (4/53 genes), biosíntese da histamina (1/3 genes) e sinalização do OX40 (3/63 genes) (**Quadro 6**).

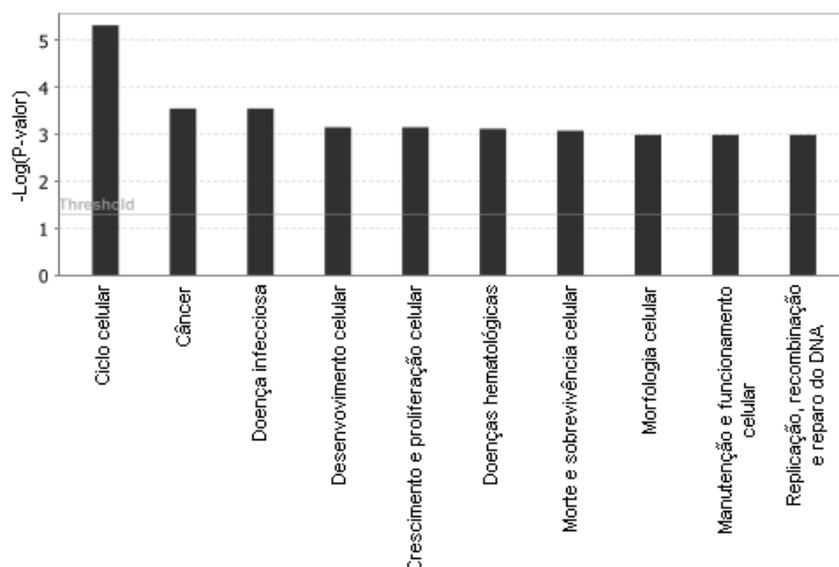


Figura 11 - Caracterização funcional do grupo de genes obtidos após análises de expressão gênica realizadas para dois grupos classificados quanto à infecção pelo HPV (n=36). O gráfico representa as dez funções e doenças associadas aos genes com expressão gênica diferencial com maiores *scores*. Todas as categorias foram consideradas significantes ($[-\text{Log}(\text{P-valor})] > 1.3$). Imagens geradas pelo *software* IPA.

Quadro 6 - Relação dos genes diferencialmente expressos entre dois grupos classificados quanto à infecção pelo HPV presentes nas 10 vias canônicas com maiores *scores* $[-\text{Log}(\text{P-valor})]$.

Via canônica	$-\text{Log}(\text{P-valor})$	Moléculas*
<i>Reparo a erros de pareamento (mismatch repair) em eucariotos</i>	2,64E+00	↑PCNA, ↑RFC4, ↑MSH6
<i>Apoptose de células alvo mediada por linfócitos T citotóxicos</i>	2,46E+00	↓HLA-DOA, DFFB, ↑HLA-DQA2, ↑BCL2
<i>Vias de recuperação de ribonucleotídeos de pirimidina</i>	2,00E+00	↓PYCRL, ↑PRPF4B, ↑PRKCH, ↑ACVR2A, ↑DYRK1A
<i>Sinalização do ritmo circadiano</i>	1,78E+00	↑PER3, GRIN1, ↑ADCYAP1
<i>Biossíntese de histamina</i>	1,77E+00	↑HDC
<i>Papel do BRCA1 na resposta a danos no DNA</i>	1,75E+00	↑RFC4, ↑MSH6, ↑BRCA1, ↑HLTF
<i>Via de recuperação do piridoxal-5-fosfato</i>	1,75E+00	↑PRPF4B, ↑PRKCH, ↑ACVR2A, ↑DYRK1A
<i>Reparo a quebras de dupla fita por recombinação homóloga</i>	1,64E+00	↑POLA1, ↑BRCA1
<i>Papel do OCT4 na pluripotência de células tronco embrionários de mamíferos</i>	1,49E+00	↓FBXO15, ↑BRCA1, ↑WWP2
<i>Via de sinalização do OX40</i>	1,49E+00	↓HLA-DOA, ↑HLA-DQA2, ↑BCL2

* ↑: Aumento de expressão; ↓: Diminuição de expressão

Nucleus

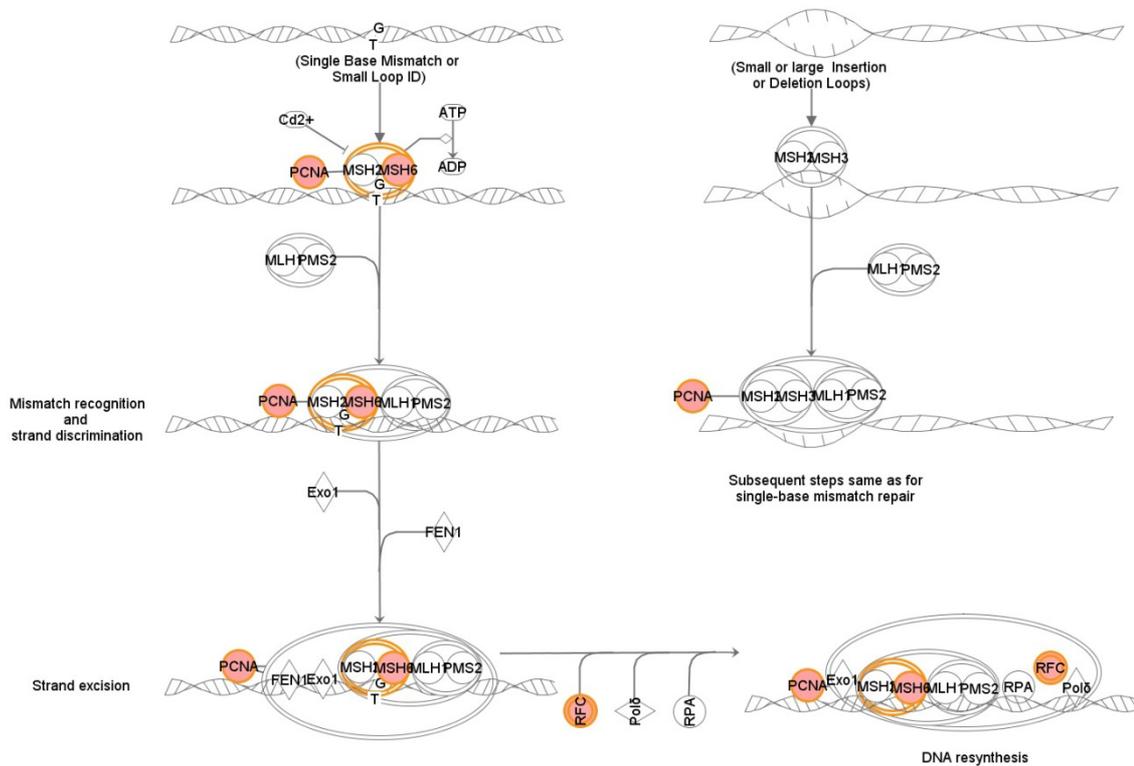


Figura 12 - Representação esquemática da via de reparo a erros de pareamento (*mismatch repair*) em eucariotos. Essa via apresentou o maior *score* de alteração quando considerados genes diferencialmente expressos entre casos HPV positivos e negativos [-Log(P-valor)=2.64 E+00]. Os genes com aumento na expressão de transcritos *MSH6*, *RFC4* e *PCNA* estão representados em vermelho e foram submetidos a validação por RT-qPCR. Imagens geradas pelo software IPA.

5.3 INTEGRAÇÃO DOS DADOS GENÔMICOS E TRANSCRIPTÔMICOS

Com a finalidade de encontrar potenciais genes *drivers* que possam ser utilizados como marcadores moleculares ou alvos terapêuticos nos tumores de pênis, foi realizada a análise de integração dos dados de alterações genômicas e da expressão de transcritos para os 37 casos de CaPe com dados disponíveis para as duas metodologias. A comparação de 5.018 genes que apresentaram variação no número de cópias genômicas com 6.117 genes com alteração na expressão de transcritos entre os 37 casos de CaPe revelou 1.076 genes com alteração pelas duas metodologias (**Figura 13**). Desse total, 365 genes apresentaram ganhos e diminuição de expressão (33,9%), 271 ganhos e aumento de expressão (25,2%), 330 perdas e diminuição de expressão (30,7%) e 110 perdas e aumento de expressão (10,2%). Todos esses genes com alterações concomitantes no número de cópias e expressão gênica foram submetidos à correlação de *Pearson* para a determinação da significância da influência das alterações genômicas nos níveis de transcritos (**Figura 14**). Um total de 666 dos 1.076 genes com alteração pelas duas metodologias apresentou correlação positiva entre dados genômicos e transcriptômicos ($0 < r \leq 1$), dos quais 601 (90%) possuíam sentido de alteração concordante entre as duas metodologias, ou seja, ganho e aumento na expressão ou perda e diminuição nos níveis de transcritos.

Com a finalidade de assegurar a influência do número de cópias na expressão desses genes, somente moléculas com $r \geq 0,5$ foram consideradas nas análises subsequentes. Essa análise resultou em 187 genes *drivers* cujas CNAs foram capazes

de alterar a expressão gênica, sendo 90 genes com ganho e aumento de expressão e 97 com perda e diminuição de expressão. Foi observada alta concordância entre o perfil de CNAs e expressão gênica para os 37 casos avaliados, ou seja, ganho genômico e aumento de expressão do transcrito ou perda genômica e diminuição de expressão do transcrito em um mesmo caso avaliado.

Inicialmente foi realizada a classificação dos 187 genes quanto à localização cromossômica (**Figura 15**). A análise do gráfico revela que genes com ganhos e aumento de expressão dos transcritos e perdas e diminuição na expressão estavam mapeados principalmente nos cromossomos 3 e 8.

Genes significativos apresentando ganhos genômicos e aumento de expressão gênica (90 genes) foram subdivididos em duas categorias: ganho simples (uma cópia genômica adicional) ou alto nível de ganhos (duas ou mais cópias adicionais). Essa análise foi realizada para verificar o efeito do número e cópias na expressão de transcritos. Foram encontrados 22 genes contendo ganhos e 68 genes contendo ganhos e alto nível de ganhos, dependendo do caso avaliado, o que determinou o aumento na expressão gênica.

O mesmo procedimento foi realizado para genes com perdas genômicas (97 genes), para os quais foi verificada a possibilidade de perda de uma ou duas cópias genômicas e seu efeito na expressão dos transcritos. Todos os 97 genes avaliados apresentaram perdas de uma cópia. No entanto o gene *TGFBR2*, apresentou, além de perdas de uma cópia, deleção homozigota em um caso avaliado.

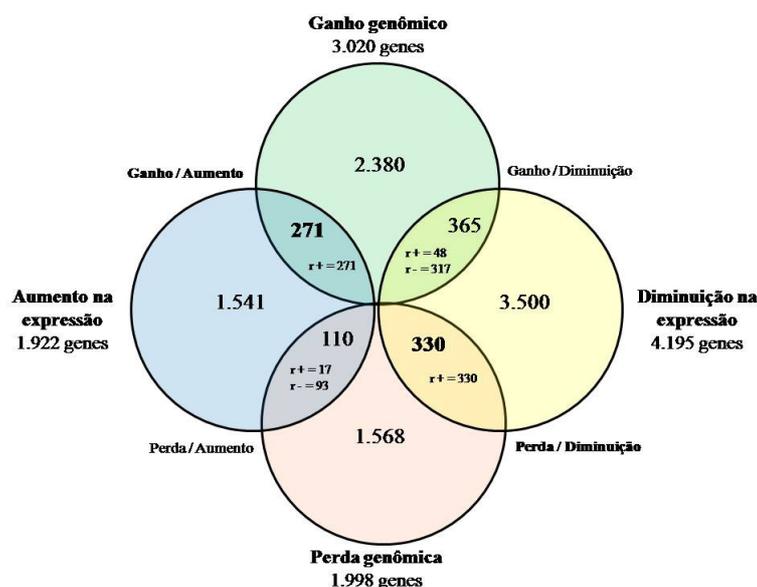


Figura 13 - Diagrama obtido após análise integrada dos dados genômicos e transcriptômicos para 37 CaPe. Os valores descritos no interior dos círculos indicam o número de genes alterados quanto ao número de cópias e/ou expressão gênica em larga escala. As intersecções dos diagramas referem-se a moléculas alteradas pelas duas metodologias. r =coeficiente de correlação de *Pearson*.

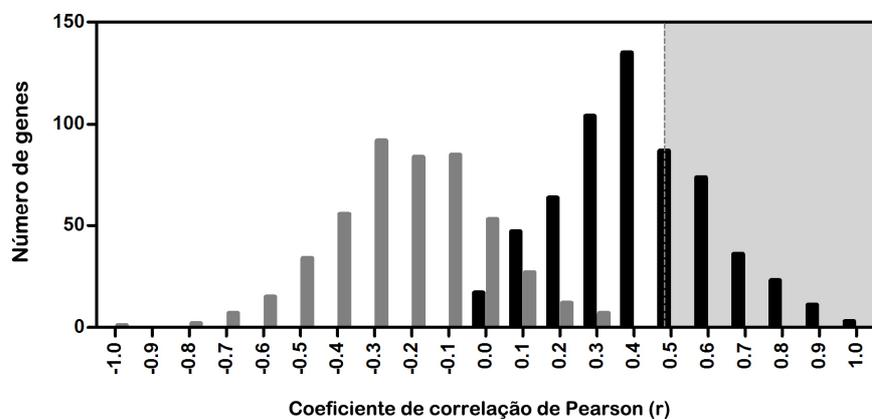


Figura 14 - Distribuição do coeficiente de correlação de *Pearson* (r) entre os 1.076 genes com alteração no número de cópias e expressão gênica em CaPe. Coeficientes para genes com sentido inverso de alteração, isto é, ganho/diminuição de expressão ou perda/aumento de expressão estão representados em preto, enquanto genes com mesmo sentido de alteração (ganho/aumento de expressão ou perda/diminuição de expressão) estão representados por barras cinzas. Foram consideradas nessa análise moléculas com $r \geq 0,5$ (área cinza) (187 genes). Imagem gerada pelo software *GraphPad Prism 5.0*.

As dez principais doenças e funções celulares (maiores *scores*) ou moleculares relacionadas aos 187 genes significativos após a análise integrada estão representadas na **Figura 16**. Além da presença significativa de moléculas alteradas envolvidas no câncer, foi verificada a alteração em diversos processos relacionados ao desenvolvimento e progressão de tumores, tais como organização e montagem celular, manutenção e funcionamento da célula, sinalização e interação célula-célula, entre outros.

Esses genes também se correlacionaram com importantes vias canônicas previamente descritas e as 10 vias com maiores *scores* estão representadas no **Quadro 7**. É interessante notar os altos índices de alteração encontrados para a via de sinalização do PTEN (6/134 genes alterados) e para a via do mTOR (7/203 genes alterados).

Entre as 187 moléculas obtidas após análise integrada, 16 genes foram associados com o diagnóstico, prognóstico, eficácia de drogas, progressão da doença e resposta a terapia em diversos tumores, sendo eles *PTGES*, *MLH1*, *SIAH2*, *GLI3*, *TGFBR2*, *PCDH11Y*, *STK11*, *DLC1*, *TNFSF10*, *RPS4Y1*, *RXRA*, *RAF1*, *MGMT*, *FGFR2*, *FGFR1* e *PPARG* (**Quadro 8**). É interessante notar o alto número de tumores e aplicações encontrados para os genes de reparo de DNA *MLH1* e *MGMT*.

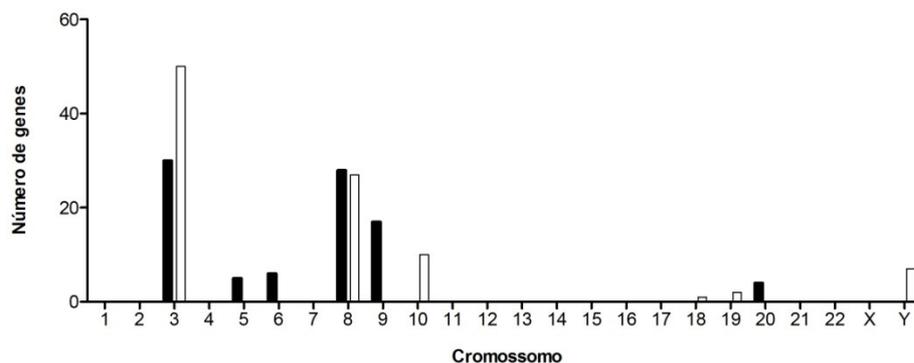


Figura 15 - Representação gráfica da localização cromossômica dos genes com ganho/aumento de expressão ou perda/diminuição de expressão gênica e $r \geq 0,5$ em CaPe. Imagens geradas pelo *software GraphPad Prism 5.0*.

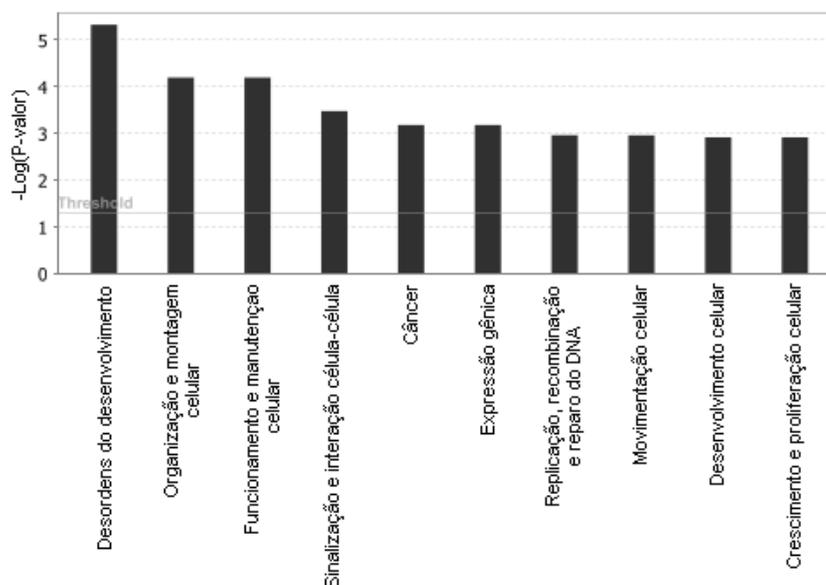


Figura 16 - Caracterização funcional do grupo de genes obtidos após análise integrada dos dados genômicos e transcriptômicos para CaPe. O gráfico representa as dez funções e doenças associadas aos genes com maiores *scores*. Todas as categorias foram consideradas significantes ($[-\text{Log}(\text{P-valor})] > 1.3$). Imagens geradas pelo *software IPA*.

Quadro 7 - Relação dos genes com alteração na expressão gênica determinada por variações genômicas presentes nas 10 vias canônicas com maiores *scores* [-Log(P-valor)].

Via canônica	-Log(P-valor)	Moléculas*
<i>Sinalização do PTEN</i>	2,79E+00	↓ <i>TGFBR2</i> , ↓ <i>RAF1</i> , ↑ <i>SHARPIN</i> , ↓ <i>INPP5F</i> , ↓ <i>FGFR1</i> , ↓ <i>FGFR2</i>
<i>Sinalização da Ephrin A</i>	2,77E+00	↑ <i>VAV2</i> , ↓ <i>RHOA</i> , ↓ <i>EPHA3</i> , ↑ <i>PIK3R4</i>
<i>Sinalização do mTOR</i>	2,53E+00	↓ <i>RPS4Y1</i> , ↑ <i>MAPKAP1</i> , ↑ <i>PRKCI</i> , ↑ <i>PPP2R4</i> , ↓ <i>STK11</i> , ↓ <i>RHOA</i> , ↑ <i>PIK3R4</i>
<i>Sinalização da orientação axonal</i>	2,50E+00	↓ <i>RAF1</i> , ↓ <i>SRGAP3</i> , ↑ <i>SEMA4D</i> , ↑ <i>PRKCI</i> , ↑ <i>GLI3</i> , ↑ <i>PLXNA1</i> , ↓ <i>RHOA</i> , ↓ <i>PPP3CC</i> , ↓ <i>EPHA3</i> , ↑ <i>PIK3R4</i> , ↓ <i>ROBO1</i>
<i>Sinalização do Rac</i>	2,32E+00	↓ <i>RAF1</i> , ↑ <i>PRKCI</i> , ↓ <i>RHOA</i> , ↑ <i>PIP5KLI</i> , ↑ <i>PIK3R4</i>
<i>Sinalização das células natural killer</i>	2,23E+00	↑ <i>VAV2</i> , ↓ <i>RAF1</i> , ↑ <i>PRKCI</i> , ↓ <i>INPP5F</i> , ↑ <i>PIK3R4</i>
<i>Sinalização do Fc Epsilon RI</i>	2,22E+00	↑ <i>VAV2</i> , ↓ <i>RAF1</i> , ↑ <i>PRKCI</i> , ↓ <i>INPP5F</i> , ↑ <i>PIK3R4</i>
<i>Sinalização do IL-3</i>	2,12E+00	↓ <i>RAF1</i> , ↑ <i>PRKCI</i> , ↓ <i>PPP3CC</i> , ↑ <i>PIK3R4</i>
<i>Mecanismos de saída de vírus das células hospedeiras</i>	2,03E+00	↑ <i>PRKCI</i> , ↑ <i>SH3GLB2</i> , ↓ <i>PDCD6IP</i>
<i>Sinalização do PDGF</i>	2,00E+00	↓ <i>RAF1</i> , ↓ <i>INPP5F</i> , ↑ <i>PIK3R4</i> , ↓ <i>CAV3</i>

*: ↓Perda/diminuição de expressão; ↑Ganho/aumento de expressão

Quadro 8 - Genes com alterações nos níveis de expressão dos transcritos devido a alterações genômicas em CaPe identificados como potenciais biomarcadores de acordo com o banco de dados do *software* IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*).

Gene	Alteração	Coefficiente de correlação (r)	Localização celular	Droga disponível	Aplicação como biomarcador	Tipo de tumor
<i>DLC1</i>	Perda / Diminuição	0.870	Citoplasma	-	Diagnóstico, Progressão da doença	Leucemia linfoblástica aguda (D, PD); câncer de fígado (PD)
<i>FGFR1</i>	Perda / Diminuição	0.516	Membrana celular	Pazopanib	Diagnóstico, Prognóstico	Câncer de pulmão de células não pequenas (D, P); melanoma (P)
<i>FGFR2</i>	Perda / Diminuição	0.514	Membrana celular	Palifermin	Diagnóstico, Prognóstico, Resposta a terapia	Câncer de mama (D); câncer de pulmão de células não pequenas (D); câncer de tireóide (D); câncer gástrico (P); câncer de endométrio (RT)
<i>GLI3</i>	Ganho / Aumento	0.593	Núcleo	-	Eficácia	Câncer de mama (E)
<i>MGMT</i>	Perda / Diminuição	0.599	Núcleo	O6-Benzylguanine	Diagnóstico, Progressão da doença, Eficácia, Prognóstico	Câncer de pulmão de células não pequenas (D); câncer de esôfago (D); câncer colorrectal (D); câncer de cérebro (D); câncer renal (D); câncer de próstata (D); câncer de pulmão (D); câncer de ovário (D); câncer de mama (DP); câncer de cabeça e pescoço (E); mesotelioma (E); câncer de cérebro (E); câncer de colon (P); câncer de cérebro (P)
<i>MLH1</i>	Perda / Diminuição	0.546	Núcleo	-	Diagnóstico, Eficácia, Prognóstico, Resposta a terapia	Carcinoma de endométrio (D); câncer colorretal (D); neoplasia de células germinativas (D); câncer de ovário (D); câncer de tireóide (D); câncer de cérebro (D); câncer de reto (E); câncer de colon (E); câncer colorrectal (E); câncer colorretal (P); câncer de cérebro (P); câncer colorretal (RT)

Cont/ Quadro 8

<i>Gene</i>	Alteração	Coefficiente de correlação (r)	Localização celular	Droga disponível	Aplicação como biomarcador	Tipo de tumor
<i>PCDH11Y</i>	Perda / Diminuição	0,676	Membrana celular	-	Diagnóstico	Câncer de próstata (D)
<i>PPARG</i>	Perda / Diminuição	0,930	Núcleo	Pioglitazone/Metformin, Rosiglitazone-Metformin combination, Glimepiride/Rosiglitazone, Rosiglitazone, GI262570, Pioglitazone, Tesaglitazar, Troglitazone	Diagnóstico, Eficácia, Prognóstico	Câncer de próstata (D); câncer de pulmão de células não pequenas (E); câncer de pulmão (E); câncer colorretal (P)
<i>PTGES</i>	Ganho / Aumento	0,502	Citoplasma	-	Diagnóstico, Prognóstico	Câncer de colon (D); câncer de pulmão de células não pequenas (P)
<i>RAF1</i>	Perda / Diminuição	0,818	Citoplasma	CHIR-265, Vemurafenib, Sorafenib	Eficácia	Tumores sólidos (E)
<i>RPS4Y1</i>	Perda / Diminuição	0,916	Citoplasma	-	Diagnóstico, Prognóstico	Câncer de fígado (D); sarcoma de Ewing (P)
<i>RXRA</i>	Ganho / Aumento	0,610	Núcleo	Bexarotene, Tretinoin, 9-cis-Retinoic Acid	Prognóstico	Câncer colorrectal (P)
<i>SIAH2</i>	Ganho / Aumento	0,563	Núcleo	-	Eficácia	Câncer de mama (E)
<i>STK11</i>	Perda / Diminuição	0,738	Citoplasma	-	Diagnóstico	Câncer de pâncreas (D)
<i>TGFBR2</i>	Perda / Diminuição	0,615	Membrana celular	-	Diagnóstico	Câncer de pulmão de células não pequenas (D); câncer colorretal (D)
<i>TNFSF10</i>	Ganho / Aumento	0,890	Espaço extracelular	-	Eficácia, Segurança	Câncer de pulmão de células não pequenas (E); câncer de mama (S)

* D: diagnóstico; PD: progressão da doença; E: eficácia; RT: resposta a terapia; P: prognóstico.

Influência dos miRNAs no perfil integrado de alterações

Ganhos e perdas genômicas podem resultar em aumento e diminuição da expressão dos transcritos. A análise integrada revelou concordância entre estes achados para 601 genes, dos quais 187 apresentaram coeficiente de correlação maior que 0,5 e foram utilizados para análises mais detalhadas. A não concordância dos resultados podem ser explicadas por outros mecanismos, incluindo a regulação por miRNAs.

Com base nesse contexto, genes apresentando ganho/diminuição de expressão (48 moléculas) ou perda/aumento de expressão (17 moléculas) com correlação de *Pearson* positiva foram submetidos a análises de regulação por miRNA. Foram encontrados 54 genes preditos como regulados por miRNAs (83,1%) envolvendo um total de 287 miRNAs, segundo as bases de dados utilizadas. A comparação dos 287 miRNAs com aqueles detectados como alterados quanto ao número de cópias por aCGH resultou em 177 miRNAs mapeados em regiões sem alteração (61,7%) e 110 miRNAs presentes em áreas com ganhos ou perdas genômicas (38,3%) alteradas de um a 11 dos CaPe avaliados por aCGH. Essa análise sugere que 38,3% dos miRNAs reguladores de genes com ganhos/diminuição de expressão ou perdas/aumento de expressão após análise integrada podem ter tido sua função normal alterada devido a ganhos e perdas genômicos.

Entre os 110 miRNAs localizados em áreas genômicas alteradas, 23 estavam em regiões de perda (20,9%), 42 em regiões envolvidas em ganhos (38,2%) e 45 miRNAs em regiões de perdas ou ganhos, dependendo do caso avaliado (40,9%). Os miRNAs com alteração no número de cópias detectado com maiores frequências (mais que 15% dos casos avaliados) por aCGH estão listados no **Quadro 9**.

Quadro 9 - miRNAs com alterações no número de cópias em mais de 15% dos casos avaliados por aCGH.

miRNA	CNA (% de casos)			No. genes alterados regulados*
	Ganho	Alto nível de ganhos	Perda	
<i>hsa-miR-199b</i>	28,95	0	0	1
<i>hsa-miR-15b</i>	23,68	2,63	2,63	2
<i>hsa-miR-198</i>	23,68	2,63	0	1
<i>hsa-miR-148^a</i>	21,05	0	0	3
<i>hsa-let-7d</i>	21,05	0	0	2
<i>hsa-miR-27b</i>	21,05	0	0	2
<i>hsa-miR-126</i>	21,05	0	0	1
<i>hsa-miR-23b</i>	21,05	0	0	1
<i>hsa-miR-199b</i>	28,95	0	0	1
<i>hsa-miR-15b</i>	23,68	2,63	2,63	2
<i>hsa-miR-198</i>	23,68	2,63	0	1
<i>hsa-miR-148^a</i>	21,05	0	0	3
<i>hsa-let-7d</i>	21,05	0	0	2
<i>hsa-miR-27b</i>	21,05	0	0	2
<i>hsa-miR-126</i>	21,05	0	0	1
<i>hsa-miR-23b</i>	21,05	0	0	1
<i>hsa-miR-1200</i>	18,42	0	0	1
<i>hsa-miR-32</i>	15,79	0	0	3
<i>hsa-miR-338</i>	15,79	0	0	1
<i>hsa-miR-548p</i>	0	0	21,05	1
<i>hsa-miR-31</i>	10,53	0	15,79	1
<i>hsa-miR-873</i>	7,89	0	15,79	1
<i>hsa-let-7g</i>	0	0	15,79	2
<i>hsa-miR-107</i>	0	0	15,79	1

* genes com ganhos e diminuição de expressão ou perdas e aumento de expressão no presente estudo com regulação pelos miRNAs.

5.4 CONFIRMAÇÃO E VALIDAÇÃO DOS ACHADOS OBTIDOS PELAS ANÁLISES DE aCGH E EXPRESSÃO GÊNICA GLOBAL

5.4.1 Avaliação de Ganhos e Perdas Genômicas por FISH

A. Confirmação de perdas no cromossomo Y

Devido à alta frequência de perdas envolvendo o cromossomo Y, foi aplicada a metodologia de FISH em sete CaPe provenientes do mesmo grupo submetido à análise de aCGH para a confirmação dos achados.

Pelas análises de aCGH, quatro tumores apresentavam perda do cromossomo Y (Yp11.31-p11.2, Yq11.21-q11.221 e Yq11.222-q11.223), enquanto três carcinomas não possuíam alterações nesse cromossomo. Foram analisados entre 50 e 100 núcleos interfásicos para cada um dos casos avaliados. Os resultados de FISH foram concordantes aos obtidos por aCGH para todos os casos avaliados.

B. Confirmação de ganhos no gene MYC

A alta frequência de ganhos em 8q24.21, região onde se localiza o gene *MYC*, levou à sua seleção para confirmação dos dados de aCGH em sete CaPe provenientes do mesmo grupo submetido às análises em larga escala.

Quatro CaPe apresentaram ganhos envolvendo o gene *MYC* (8q24.21) nas análises de aCGH, sendo que dois deles demonstraram ganhos de duas ou mais cópias do gene (alto nível de ganhos). Os três casos restantes avaliados por *microarray* não apresentaram qualquer alteração genômica na região. Para análise do gene *MYC* por FISH, foram avaliados entre 50 e 100 núcleos interfásicos para cada

caso. Alterações genômicas (ganhos ou ampliações) foram detectadas por FISH para todos os casos com alterações por aCGH, sendo que um tumor apresentou amplificação e três CaPe tinham ganhos no DNA.

Um resumo dos achados detectados por aCGH e FISH para o cromossomo Y e gene *MYC* está apresentado no **Quadro 10**. Pode ser verificado que houve concordância entre os achados para todos os casos avaliados.

Quadro 10 - Alterações genômicas para o cromossomo Y e gene *MYC* detectadas por aCGH e FISH em sete CaPe.

Amostra	Cromossomo Y		MYC (8q24)	
	aCGH	FISH	aCGH	FISH (Razão MYC/cen)*
PA5T	Perda	Perda	Alto nível de ganhos	Amplificação (R=2.5)
PA6T	Perda	Perda	Alto nível de ganhos	Ganho (R=2.0)
PA7T	Sem alteração	Sem alteração	Ganho	Ganho (R=2.0)
PA9T	Perda	Perda	Sem alteração	Sem alteração (R=1.0)
PA12T	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração (R=1.0)
PA13T	Perda	Perda	Ganho	Ganho (R=2.0)
PA19T	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração (R=1.0)

* R = razão entre sinais encontrados para o gene *MYC* e centrômero do cromossomo 8. Razão ≥ 1.5 e < 2.5 : ganho; ≥ 2.5 : amplificação; > 0.5 e < 1.5 : normal.

5.4.2 Avaliação de Alterações Genômicas e Transcriptômicas pela PCR

Quantitativa em Tempo Real

A. Avaliação de reguladores transcricionais (RT)

Com base nos dados de expressão gênica obtidos na comparação normal *versus* tumores de pênis, foi realizada uma análise de reguladores transcricionais (RT). Duas proteínas foram classificadas como potencialmente ativadas, FOXO1 e JUN, enquanto TP53 foi predita como inibida. Embora não tenham apresentado alteração detectada pelas análises de expressão gênica global, esses genes foram submetidos à avaliação dos níveis de RNA por RT-qPCR para verificar a

possibilidade das alterações nos transcritos influenciarem a ativação ou inibição proteica.

Observou-se diminuição significativa na expressão de *FOXO1* ($P=0,0003$), classificado como ativado, e para *TP53* ($P<0,0001$), o qual foi predito como inativado em nível proteico nos tumores em relação aos controles normais (**Figura 17**). Não foi observada alteração nos níveis de expressão para o gene *JUN*. Esses dados serão analisados em conjunto com os dados protéicos a serem obtidos em estudo futuros para verificar o impacto das alterações transcriptômicas na biologia dos tumores de pênis.

Devido à disponibilidade da genotipagem do HPV para os tumores avaliados, foi realizada a comparação entre os níveis de expressão gênica dos três RT avaliados para dois grupos classificados quanto à infecção pelo HPV. Foi encontrado aumento de expressão do gene *JUN* nos casos positivos para infecção em relação aos casos negativos ($P=0,0030$) (**Figura 17**). Estes genes não estavam presentes na assinatura de expressão de transcritos quanto à infecção por HPV.

B. Alterações na via do reparo a erros de pareamento em eucariotos

O perfil de expressão gênica diferencial entre casos positivos e negativos para infecção por HPV revelou alta significância para alterações na via do reparo a erros de pareamento (*mismatch repair*) em eucariotos. Nessa via, foi observado aumento de expressão para os genes *MSH6*, *RFC4* e *PCNA*, os quais foram selecionados para confirmação dos níveis de transcritos por RT-qPCR.

Os resultados obtidos para os três genes avaliados estão representados na **Figura 18**. Foi observado aumento significativo na expressão dos três genes em

CaPe positivos para HPV quando comparados a tumores negativos: *MSH6* (P=0,044), *PCNA* (P=0,012) e *RFC4* (P=0,025).

Embora os genes tenham sido selecionados com base em grupos formados de acordo com a infecção pelo HPV, foi realizada a comparação entre os valores de expressão obtidos para tumores e para 13 prepúncios normais. Todos os genes demonstram diminuição de expressão significativa nos tumores em relação aos tecidos normais: *MSH6* (P<0,001), *RFC4* (P=0,030) e *PCNA* (P<0,001). Estes genes não estavam presentes na assinatura de expressão de transcritos para tumores de pênis quando comparados a tecidos normais.

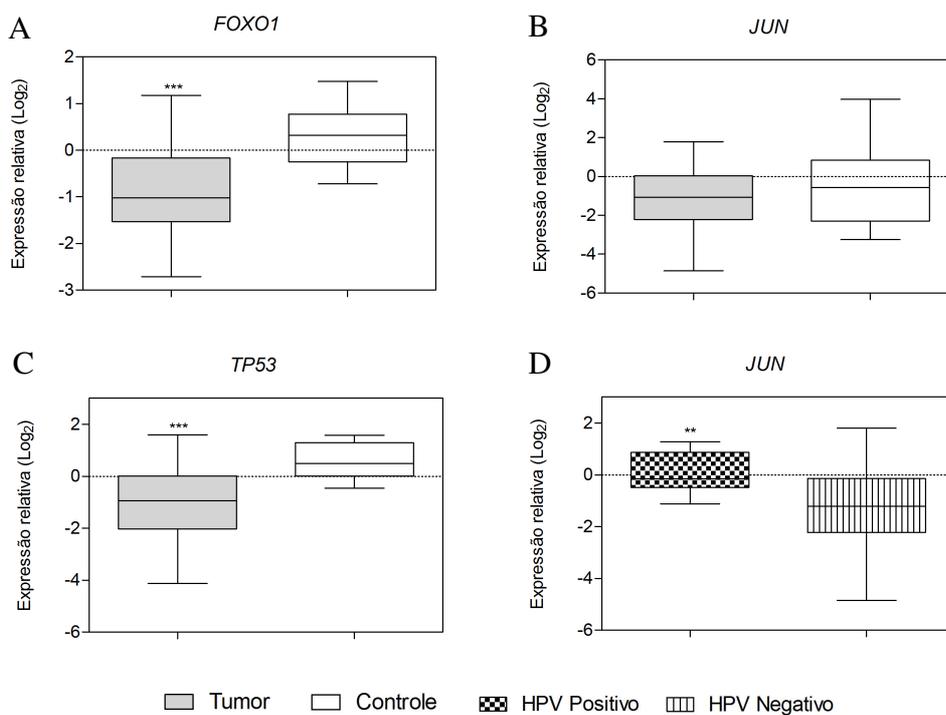


Figura 17 - Expressão gênica de reguladores transcricionais em CaPe. Os níveis dos transcritos *FOXO1* (A), *JUN* (B, D) e *TP53* (C) foram avaliados por RT-qPCR e comparados entre amostras tumorais *versus* normais e positivas *versus* negativas para HPV. Foi observada diminuição de expressão significativa para *FOXO1* (A) e *TP53* (C) na comparação tumor *versus* normal. O gene *JUN* estava diferencialmente expresso segundo a infecção pelo HPV (D). **P<0,01; *** P<0,001. Imagens geradas no software GraphPad Prism 5.0.

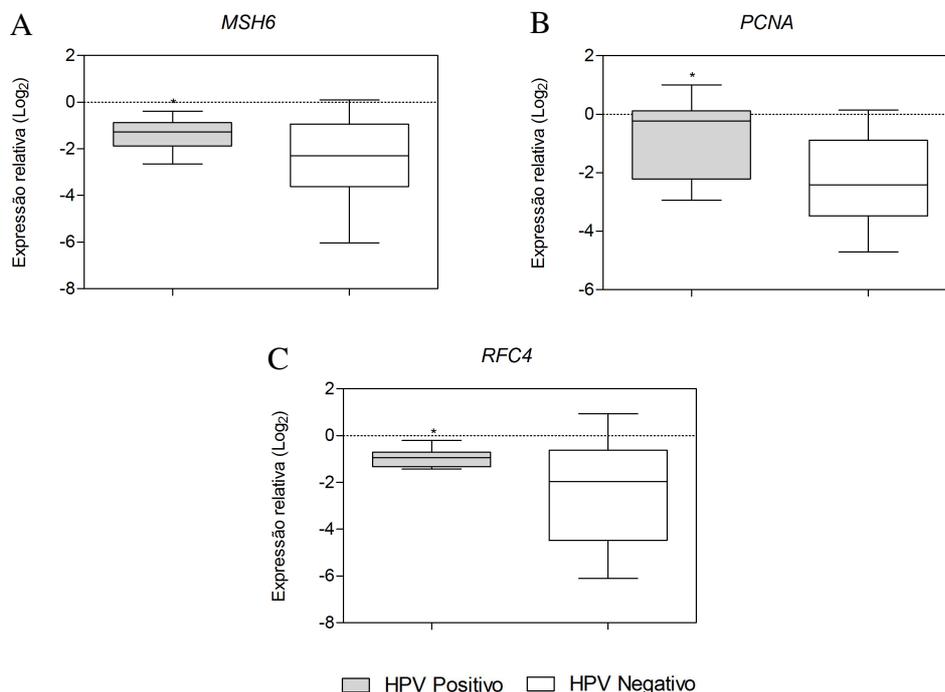


Figura 18 - Expressão de genes da via de reparo a erros de pareamento (*mismatch repair*) em eucariotos de acordo com a infecção pelo HPV em CaPe. Os níveis dos transcritos *MSH6* (A), *PCNA* (B) e *RFC4* (C) foram avaliados por RT-qPCR e comparados entre amostras de CaPe positivas e negativas para infecção pelo HPV. Foi observado aumento na expressão em casos positivos para HPV para os três genes avaliados. * $P \leq 0.05$. Imagens geradas no *software GraphPad Prism 5.0*.

C. Confirmação de alteração em genes “drivers” associados à sobrevida

A análise integrada dos dados de alterações no número de cópias e expressão gênica revelou quatro moléculas localizadas nos cromossomos 3 e 8 em regiões associadas a características clínicas e patológicas de pior prognóstico e sobrevida: *DLC1* e *PPARG* com perdas genômicas/diminuição de expressão dos transcritos e *LAMP3* e *TNFSF10* com ganhos genômicos/aumento de expressão dos transcritos. Além disso, esses genes apresentaram alto coeficiente de correlação de *Pearson* (r), o que sugeriu grande influência das alterações genômicas na expressão dos transcritos contribuindo para sua classificação como *drivers* em CaPe. Devido à sua

importância, os genes *DLCL1*, *LAMP3*, *PPARG* e *TNFSF10* foram selecionados para validação dos dados genômicos por qPCR e transcriptômicos pela metodologia de RT-qPCR.

Foram avaliadas 18 regiões genômicas presentes nos quatro genes (*DLCL1*: oito regiões, *LAMP3*: duas regiões; *PPARG*: quatro regiões; *TNFSF10*: quatro regiões), das quais nove foram determinadas como alteradas pela metodologia de aCGH e nove foram avaliadas com o objetivo de verificar a extensão do ganho ou perda genômico. Os resultados obtidos para cada região avaliada estão representados na **Tabela 6**.

Entre as nove regiões alteradas, seis apresentaram alteração pela metodologia de qPCR em mais de 20% dos casos, confirmando os dados em larga escala para 66,7% das regiões avaliadas. Entre as seis regiões relevantes alteradas, cinco localizam-se em éxons e uma em intron. Com relação às regiões flanqueadoras, 2/9 segmentos gênicos avaliados apresentavam ganhos ou perdas em mais de 20% das amostras (22,2%), indicando a extensão das alterações em cada gene. As duas regiões flanqueadoras alteradas em mais de 20% dos casos correspondem a áreas de íntron.

Quando classificadas de acordo com o gene, foram observadas perdas em mais de 20% dos casos em cinco de oito regiões avaliadas para *DLCL1* (4: sonda *microarray*; 1: região flanqueadora), ganhos em uma de duas regiões para *LAMP3* (sonda), perdas em uma de quatro regiões para *PPARG* (região flanqueadora) e ganhos em uma de quatro áreas para *TNFSF10* (sonda). Todas as regiões relevantes avaliadas apresentaram o mesmo tipo de alteração detectado por aCGH (perda ou ganho). Por essas análises, além de confirmar os dados obtidos por *microarray*, foi

possível determinar a extensão dos ganhos e perdas para regiões adjacentes para cada gene.

A análise de expressão gênica pela metodologia de RT-qPCR revelou diminuição na expressão dos transcritos nos tumores de pênis em relação aos normais para o gene *PPARG* (P=0,0120) e aumento nos níveis para *LAMP3* (P=0,0047) e *TNFSF10* (P=0,0017) (**Figura 19**). Esses genes apresentaram o mesmo sentido de alteração detectado por expressão gênica em larga escala. Não foi observada alteração na expressão para o gene *DLC1* (P=0,5531). Não foi observada diferença na expressão destes genes entre dois grupos classificados quanto à infecção pelo HPV.

Tabela 6 - Frequência e tipo de alteração genômica (ganho/perda) observados para os genes selecionados para validação por qPCR em 34 CaPe.

Gene	Sequência Iniciadora	Região gênica*	Alteração	Frequência qPCR**
<i>DLC1</i>	1	E-18 (*)	Perda	71%
	2	E-18	Perda	35%
	3	E-2 (*)	Perda	50%
	4	I-2	Perda	9%
	5	E-4 (*)	Perda	53%
	6	I-4	Perda	3%
	7	E-5 (*)	Perda	35%
	8	I-4	Perda	9%
<i>LAMP3</i>	1	I-4 (*)	Ganho	21%
	2	E-4	Ganho	15%
<i>PPARG</i>	1	E-2 (*)	Perda	6%
	2	I-2	Perda	71%
	3	E-3 (*)	Perda	3%
	4	E-4	Perda	6%
<i>TNFSF10</i>	1	E-1 (*)	Ganho	3%
	2	I-1	Ganho	15%
	3	E-3 (*)	Ganho	38%
	4	E-4	Ganho	3%

* E: éxon, I: íntron. Iniciadores desenhados em regiões de íntrons ou éxons com o símbolo (*) estão localizados em áreas de sonda alterada detectada pela análise de aCGH. Todas as outras regiões flanqueiam áreas com ganhos ou perdas genômicas; **Alterações presentes em mais de 20% dos CaPe avaliados (negrito) foram consideradas relevantes e consideradas na análise.

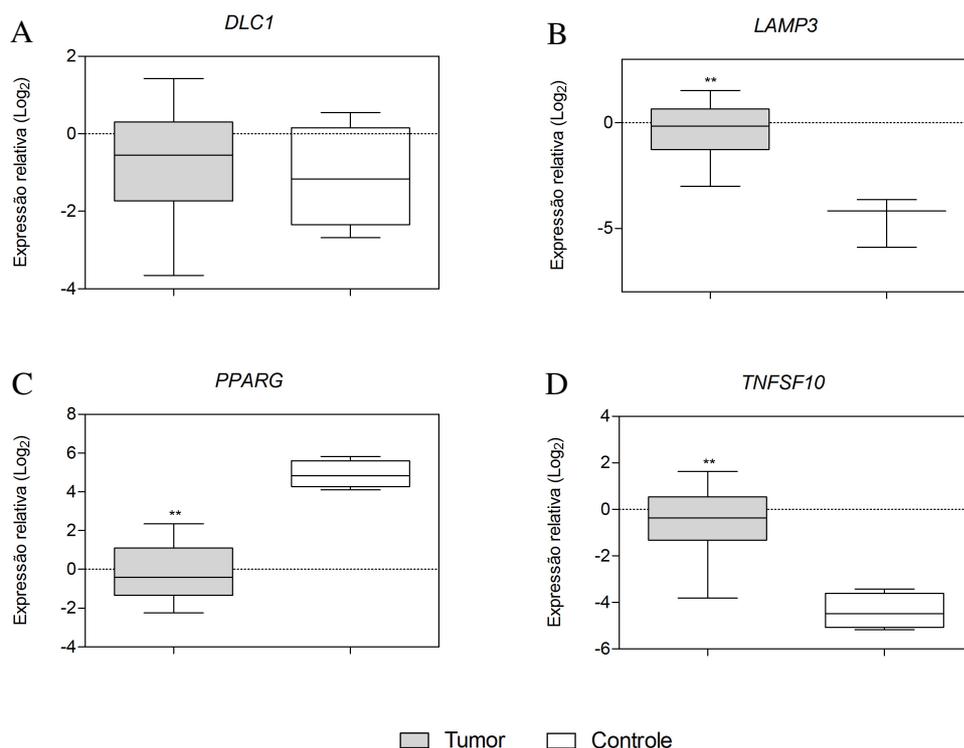


Figura 19 - Expressão gênica para genes *drivers* detectados pela análise integrada em CaPe. Os níveis de transcritos foram avaliados para *DLC1* (A), *LAMP3* (B), *PPARG* (C) e *TNFSF10* (D) por RT-qPCR e comparados entre amostras normais e tumorais. Foi observado aumento de expressão para *LAMP3* (B) e *TNFSF10* (D) e diminuição nos níveis de *PPARG* (C). Não foi encontrada alteração de expressão significativa para *DLC1* (A). ** $P \leq 0.01$. Imagens geradas no software GraphPad Prism 5.0.

D. Avaliação de alterações em genes associados ao câncer

Com base no conhecimento das alterações moleculares relacionadas a tumores descritos em literatura, foram selecionados sete genes para avaliação dos níveis de transcritos por RT-qPCR (*CAVI*, *FLII*, *IFIT2*, *MMP1*, *PI*, *SBF1* e *STAT1*). Entre os sete genes avaliados, quatro apresentaram expressão gênica diferencial por RT-qPCR. Foi observado aumento de expressão para o gene *MMP1* ($P < 0,0001$), confirmando o resultado encontrado por expressão gênica em larga escala. Esse gene estava em regiões de ganho em um caso de CaPe avaliado por aCGH. Os genes *CAVI* ($P = 0,0137$), *FLII* ($P < 0,001$) e *SBF1* ($P < 0,0001$) apresentaram significativa diminuição de expressão. Não foi encontrada alteração nos níveis de expressão de

transcritos em CaPe para os genes *IFIT2* (P=0,1474), *PI3* (P=0,7152) e *STAT1* (P=0,3250) (**Figura 20**). A expressão destes sete genes foi comparada com a presença ou ausência do HPV. Não foi encontrada associação entre os níveis dos transcritos e a infecção viral.

E. Correlação com características clínicas e patológicas

Dados genômicos. A comparação entre alterações no número de cópias para regiões específicas dos genes *DLC1*, *LAMP3*, *PPARG* e *TNFSF10* e características clínicas e patológicas dos pacientes com CaPe revelou correlação significativa para segmentos genômicos de três dos quatro genes avaliados, sendo duas regiões para *DLC1* (DLC1-3, éxon 2 e DLC1-7, éxon 5), uma região para *LAMP3* (LAMP3-2, éxon 4) e uma para *TNFSF10* (TNFSF10-3, éxon 3) (**Tabela 7**). Foi observada correlação com bom prognóstico para as regiões alteradas de *LAMP3* (associação com baixo grau histológico) e *TNFSF10* (relação com baixo grau histológico e estadió clínico, ausência de invasão perineural, margens cirúrgicas livres e ausência de metástase linfonodal). Já as perdas em duas regiões genômicas de *DLC1* associaram-se a características de pior prognóstico da doença, sendo elas presença de invasão perineural (P=0,020) e margens cirúrgicas comprometidas (P=0,037) para DLC1-3 e DLC1-7, respectivamente. A comparação entre as alterações genômicas e a sobrevida dos pacientes não revelou diferenças significativas.

A possibilidade de relação entre as alterações genômicas e infecção pelo HPV foi avaliada e não foram encontrados resultados significativos.

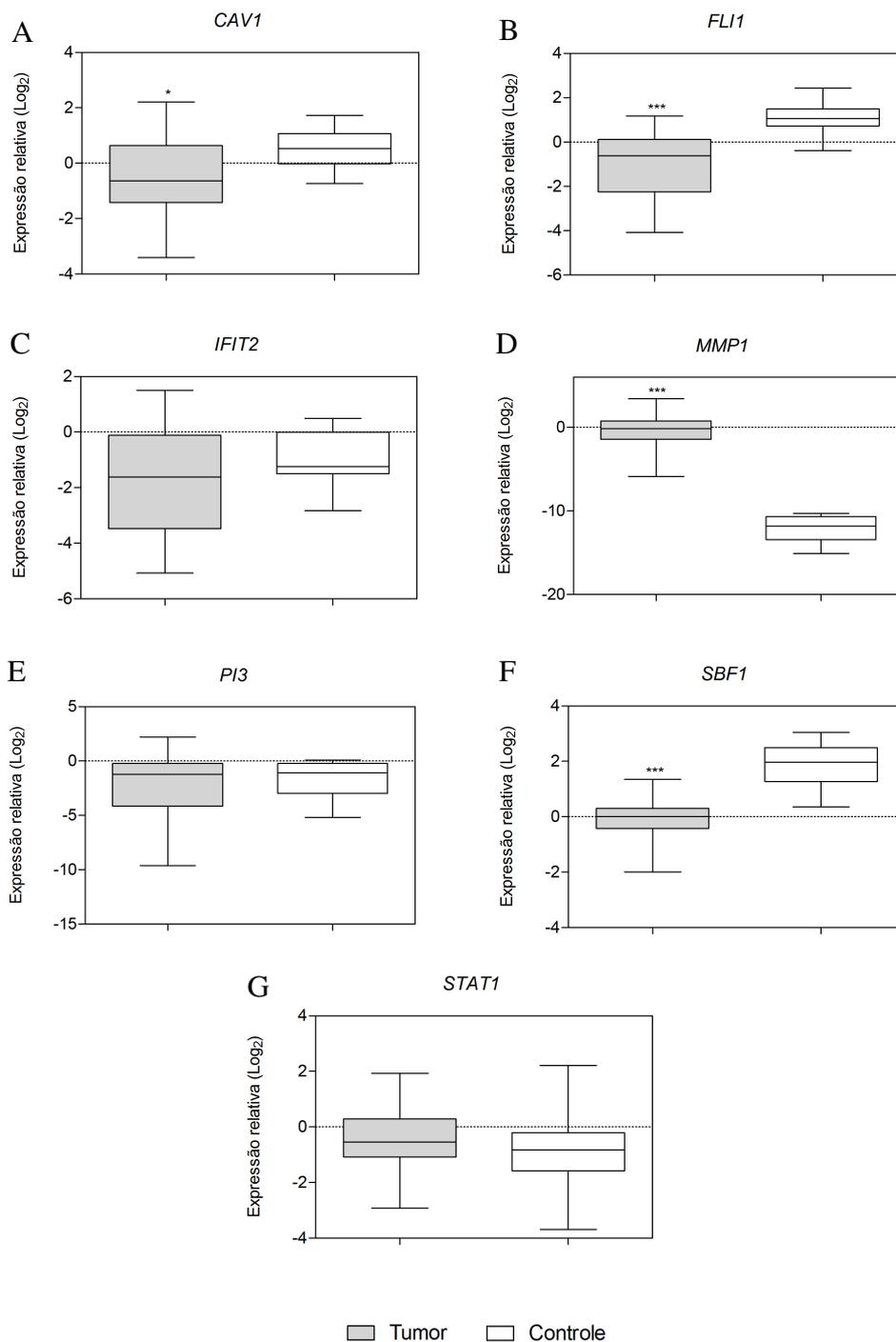


Figura 20 - Níveis de transcritos em CaPe para genes selecionados com base em sua relevância no câncer. A avaliação de genes relacionados ao câncer revelou diminuição de expressão significativa para *CAV1* (A), *FLI1* (B) e *SBF1* (F), além de aumento na expressão de *MMP1* (D). Não foram obtidos resultados significativos para *IFIT2* (C), *PI3* (E) e *STAT1* (G). * $P \leq 0.05$; *** $P \leq 0.001$. Imagens geradas no software *GraphPad Prism 5.0*.

Tabela 7 - Correlação entre resultados obtidos por qPCR e características clínicas e patológicas de 34 pacientes com CaPe.

Gene	Local*	Variável associada					P valor**
		Descrição	Grupos	n total	n com alteração	% alteração	
<i>DLC1</i>							
DLC1-3	E-2	Invasão perineural	Sim	8	7	87,50	0,020
			Não	13	6	46,20	
DLC1-7	E-5	Margens cirúrgicas	Livres	20	7	35,00	0,037
			Comprometidas	6	5	83,30	
<i>LAMP3</i>							
LAMP3-2	E-4	Grau histológico	I	7	3	42,90	0,001
			II-III	21	2	9,52	
<i>TNFSF10</i>							
TNFSF10-3	E-3	Grau histológico	I	7	7	100,00	0,000
			II-III	24	4	16,70	
		Estadio clínico	I-II	12	8	66,70	0,034
			III-IV	12	3	25,00	
		Invasão perineural	Sim	8	0	0,00	0,014
			Não	13	8	61,50	
		Margens cirúrgicas	Livres	16	9	56,30	0,042
			Comprometidas	7	0	0,00	
Metástase linfonodal	Sim	8	0	0,00	0,023		
	Não	8	4	50,00			

* I: íntron; E: éxon. ** Em negrito estão descritos valores obtidos para características de pior prognóstico determinada pelo teste de Qui-quadrado ($P \leq 0,05$).

Dados de expressão gênica: Após a análise dos dados de RT-qPCR, todos os valores de expressão relativa obtidos para os tumores de pênis para cada gene (*CAVI*, *DLC1*, *FLII*, *FOXO1*, *IFIT2*, *JUN*, *LAMP3*, *MMP1*, *MSH6*, *PCNA*, *PI3*, *PPARG*, *RFC4*, *SBF1*, *STAT1*, *TNFSF10* e *TP53*) foram comparados a características clínicas e patológicas. Foram obtidos resultados estatisticamente significativos para dois genes avaliados: *MSH6* e *PI3* (**Figura 21**).

Com relação ao gene *MSH6*, foi observada associação entre a diminuição nos níveis de transcritos e a presença de margens cirúrgicas comprometidas ($P=0,0127$). Além disso, foi verificada associação significativa entre a expressão gênica

diferencial de *PI3* e estadió clínico ($P < 0,0001$), grau tumoral ($P = 0,0280$), estadió T ($P = 0,0280$), recorrência ($P = 0,0170$) e morte pela doença ($P = 0,0370$). Todas as características de pior prognóstico avaliadas apresentaram associação com a diminuição na expressão de *PI3*, tais como aumento do grau tumoral ($3 < 2 < 1$), estadió T III-IV, estadió clínico III-IV, presença de recorrência do tumor e óbito.

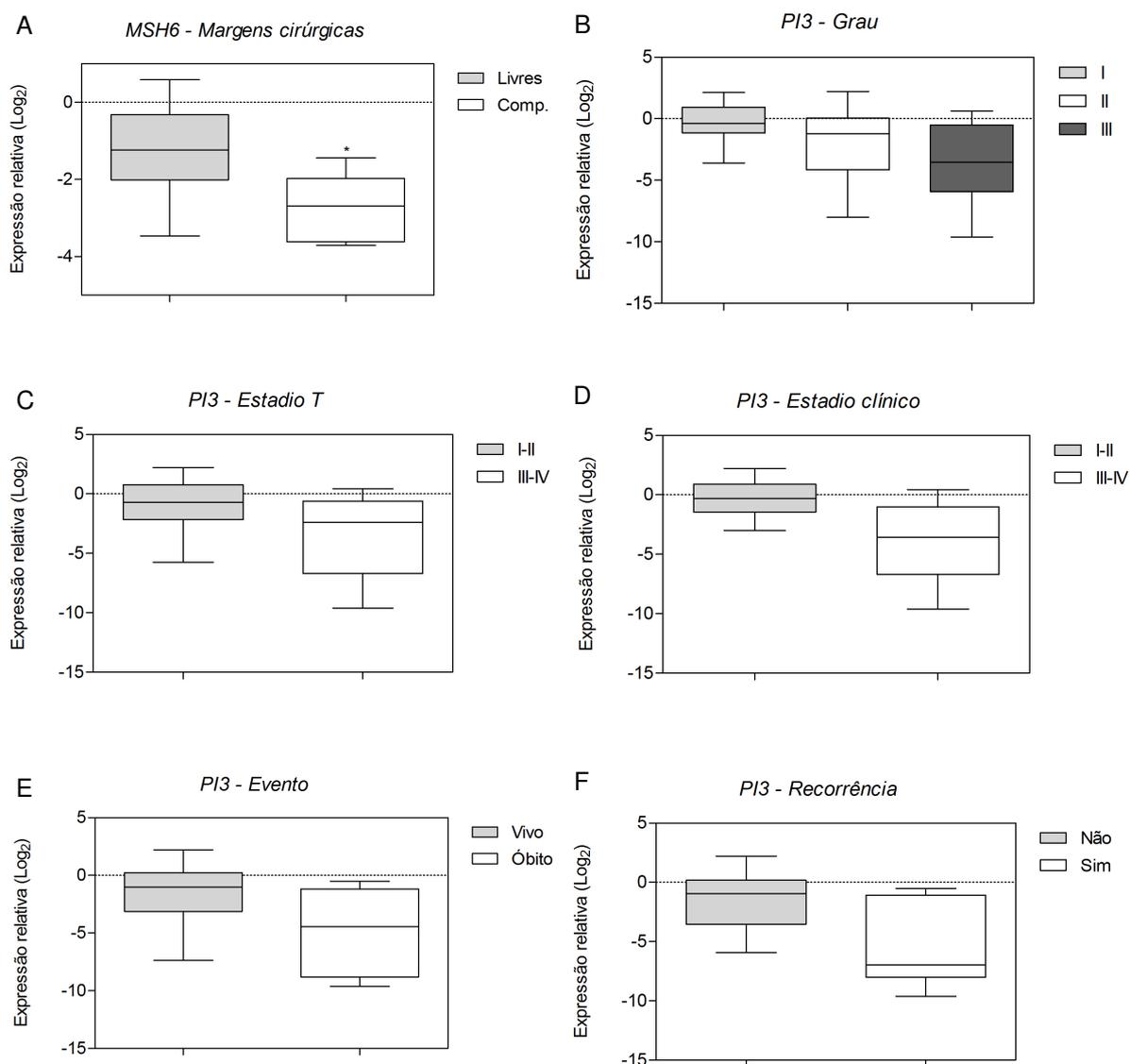


Figura 21 - Associação entre a expressão gênica e características clínicas e patológicas em CaPe. A expressão diminuída de *MSH6* foi relacionada com margens cirúrgicas comprometidas (A). Além disso, baixos níveis de *PI3* foram significativamente associados com grau (B), estadió T (C) e estadió clínicos (D) avançados, além de morte (E) e presença de recorrência (F). * $P \leq 0,05$; *** $P \leq 0,001$. Imagens geradas no software *GraphPad Prism 5.0*.



Discussão

6 DISCUSSÃO

O CaPe é uma doença agressiva com importante impacto psicológico e social. O Brasil apresenta uma das maiores incidências mundiais de CaPe (FAVORITO et al. 2008). Neste estudo, foram avaliados CaPe provenientes de 43 pacientes por metodologias de análises globais para a determinação das alterações mais relevantes para o desenvolvimento e progressão destes tumores.

Entre os tumores, 37 foram classificados como CECs usuais (86,0%), dois como CECs verrucosos (4,7%), dois como CECs papilíferos (4,7%) e dois como CECs mistos (um usual-verrucoso e um usual-papilífero). Semelhante ao descrito em literatura (EBLE et al. 2004), os CECs usuais foram os mais frequentes entre os indivíduos portadores de CaPe. Foram também avaliados uma hiperplasia, dois carcinomas *in situ*, uma recidiva e uma metástase de tumor de pênis para linfonodo para conhecimento de sua padrão molecular e comparação com os tumores primários. As discussões em literatura envolvendo lesões penianas, tais como HP e CIS, são escassas quando comparadas aos dados disponíveis para outras regiões anatômicas, como cervix e vulva (CUBILLA et al. 2004).

A infecção pelo HPV de alto risco é amplamente aceita como relacionada à patogênese de carcinomas do trato anogenital, particularmente carcinomas cervicais (WALBOOMERS et al. 1999; BOSCH et al. 2002; ZUR HAUSEN 2002). Embora alguns relatos tenham demonstrado a coexistência de CaPe e infecção pelo HPV, essa relação e a forma como ocorre ainda são pouco estabelecidas. Assim, mais estudos são necessários para elucidar o papel do vírus no desenvolvimento dos

tumores de pênis. Para contribuir para o entendimento dessa relação foi realizada a genotipagem do HPV para 42 dos 43 CaPe. Não foi possível realizar a genotipagem do HPV no caso PA22T por ausência de amostra em quantidade suficiente para o estudo.

Catorze dos 42 casos (33,3%) apresentaram positividade para algum subtipo do HPV, sendo o HPV16 o mais frequente (10/14 casos), seguido por HPV16/40 (1/14), HPV16/62 (1/14), HPV18/40 (1/14) e HPV81 (1/14). A incidência de infecção por HPV em tumores de pênis varia, sendo descrita de 15 a 75% dos casos avaliados nos diferentes estudos (revisado em IARC 2009). Essa variação pode ser explicada, entre outros fatores, pela utilização de diferentes métodos de detecção (PCR, hibridação *in situ*, *Southern blot*), pelo tipo de tecido utilizado (congelado, fresco ou parafina), número de amostras ou ainda devido à presença de diferentes subtipos histológicos em um mesmo grupo amostral. Especificamente no Brasil, BEZERRA et al. (2001), na análise de 82 CaPe provenientes de homens brasileiros e utilizando a técnica de PCR seguida de *dotblot* para 19 subtipos específicos do vírus, encontraram DNA do HPV em 30,5% dos tumores. Destes casos, 50% apresentaram HPV16, seguido por 16% com HPV18 e 8% com HPV6-11. Ainda no Brasil, SCHEINER et al. (2008) realizaram genotipagem do HPV em 80 tumores de pênis utilizando iniciadores específicos para sequências conservadas dos subtipos 6, 16, 18, 28, 31, 33, 45 e 71. Setenta e dois por cento dos CaPe foram positivos para HPV, sendo o subtipo 16 o mais frequente (52%). Recentemente, AFONSO et al. (2012) avaliaram 135 CaPe fixados em formalina e em blocos de parafina de homens brasileiros quanto à presença do HPV usando amplificação pela PCR seguida de RFLP (do inglês, *Restriction fragment length polymorphism*) e detectaram

positividade para DNA viral em 60,7% dos tumores. Desse total, 69,5% das amostras apresentaram HPV de alto risco, com maior prevalência para HPV16 (29,7%), seguido por HPV45 (23,0%). Além disso, os autores detectaram HPV6, 11, 18, 26, 28, 31, 33, 35, 53, 62, 70, 71 e 73 em menores frequências. No presente estudo foi realizada a genotipagem do HPV pelo kit *Linear Array HPV Genotyping Test* (Roche, CA, USA) usando amostras a fresco, das quais 33,3% foram positivas, semelhante à frequência encontrada por BEZERRA et al. (2001). Assim como nos outros três relatos em amostras de pacientes brasileiros (BEZERRA et al. 2001; SCHEINER et al. 2008; AFONSO et al. 2012), o principal subtipo detectado foi o 16 (12/14 casos, incluindo infecções simples e múltiplas).

A confiabilidade dos resultados gerados pelo kit *Linear Array HPV Genotyping Test* (Roche, CA, USA) utilizado nesse trabalho foi confirmada por um estudo internacional realizado pelo *HPV Laboratory Network* (Labnet) da Organização Mundial da Saúde para avaliação dos diferentes métodos utilizados na detecção do HPV (EKLUND et al. 2010). Para isso, vários laboratórios utilizaram seus protocolos padrões de genotipagem para detectar um dos 16 subtipos do HPV provenientes de plasmídeos encaminhados pelo LabNet: HPV6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68. Foram recebidas 84 listas de dados de genotipagem do HPV provenientes de 54 laboratórios. Entre essas listas, 15 basearam-se na utilização do kit *Linear Array HPV Genotyping Test* (Roche, CA, USA), sendo este o mais utilizado entre os laboratórios avaliados. Baseado em critérios estabelecidos pelo Labnet, esse kit apresentou seis listas de dados com 100% de proficiência, cinco listas com 90-99% de proficiência e quatro listas não proficientes, cujos estudos detectaram dois ou três resultados falso-positivos. Quando

comparado a outros 20 kits com capacidade de detectar mais de 12 tipos do HPV, o teste utilizado no presente estudo é o quarto a apresentar 100% de proficiência, o que demonstra que os dados gerados pelos nossos experimentos são confiáveis.

Um aspecto extremamente importante quanto à infecção pelo HPV em CaPe está relacionado à classificação histológica dos tumores. É bem estabelecido que tumores basalóides ou condilomatosos apresentam praticamente 100% de infecção por HPV, enquanto em CECs verrucosos a infecção é praticamente ausente (GREGOIRE et al. 1995; BEZERRA et al. 2001; RUBIN et al. 2001; FERREUX et al. 2003). Todos os outros subtipos tumorais apresentam frequências variáveis de infecção. Nesse estudo, entre os 14 casos infectados por HPV, 11 correspondem ao subtipo usual (78,6%), um CEC verrucoso (7,1%) e dois CECs papilíferos (14,3%). Embora a infecção pelo HPV em CECs verrucosos seja rara, entre os dois casos avaliados nesse estudo um era do subtipo 81, considerado como de baixo risco oncogênico e que deve não contribuir para o desenvolvimento tumoral. Todos os outros CECs apresentaram infecção pelo HPV de alto risco e em frequências variáveis (30,6% para CEC usual e 100% para CEC papilífero), assim como descrito em literatura.

Um aspecto interessante desse estudo foi a presença de três CaPe positivos para mais de um subtipo do HPV (um caso HPV16/40, um caso HPV16/62 e um HPV18/40), o que corresponde a 21,4% dos casos positivos para a infecção. STANKIEWICZ et al. (2011a) avaliaram 149 amostras de CEC de pênis fixados em formalina e em blocos de parafina quanto à infecção pelo HPV. Cinquenta e sete casos apresentaram positividade para o vírus, dos quais 17 (30%) foram co-infectados por até seis subtipos. No estudo de BEZERRA et al. (2001) em 85 CaPe

foi detectada a co-infecção em quatro de 25 casos positivos para HPV (16%). Embora os estudos citados tenham avaliado amostras em parafina, os valores encontrados foram próximos ao detectado no presente estudo (21,4% de infecções múltiplas), realizado somente com amostras de tecido a fresco congeladas.

Ainda não é completamente conhecido o significado de múltiplas infecções pelo HPV no desenvolvimento do câncer. A maioria dos estudos refere-se a lesões cervicais e os resultados são controversos. FIFE et al. (2001) avaliaram a presença do HPV em lavados vaginais de mulheres contendo displasia, atipia de significância incerta (do inglês, *Atypical squamous cells of undetermined significance* - ASCUS) e citologicamente normais. A média de subtipos virais detectados por amostra em cada grupo foi de 3,29 (displasia), 2,33 (ASCUS) e 1,04 (normal), revelando um risco aumentado significativo de desenvolvimento de displasia (mais agressivo) em mulheres contendo maior número de infecções virais ($P \leq 0.001$). GARGIULO et al. (2007) relataram um menor número de casos com co-infecção por HPV em raspado cervical de displasia severa e carcinoma cervical quando comparado a mulheres com ASCUS, lesão intra-epitelial de alto grau (HSIL) ou baixo grau (LSIL). Nesse estudo, os autores relataram que praticamente todas as múltiplas infecções detectadas (96 de 106; 95% dos casos múltiplos) apresentavam pelo menos um HPV de alto risco. No presente trabalho, os três casos com infecções múltiplas também tinham pelo menos um subtipo viral de alto risco, sendo dois casos com HPV16 e um caso com HPV18. Possivelmente há a necessidade de pelo menos um genótipo de alto risco para a ocorrência da transformação maligna, enquanto que os genótipos adicionais podem contribuir para a posterior progressão tumoral ou não possuir qualquer papel no tumor.

Com relação às outras lesões de pênis avaliadas, foi observada infecção por HPV31 para a HP, HPV16/62 e HPV16/52/59 para os dois CIS e HPV16 para metástase. Como é possível notar, todos os tecidos apresentaram infecções incluindo pelo menos um HPV de alto risco. Os estudos avaliando infecção por HPV em lesões epiteliais penianas não invasivas envolvem principalmente análises de CIS (WIENER et al. 1992; DEMETER et al. 1993; AYNAUD et al. 1994). A avaliação de dois CIS por WIENER et al. (1992) pela PCR para os subtipos 16 e 18 revelou infecção por HPV16 em um dos tumores avaliados. AYNAUD et al. (1994) avaliaram quatro CIS penianos por *Southern blot* para HPV6, 11, 16, 18, 33, 42 e 66 e detectaram infecção por HPV16 em todos os casos. A utilização de um número amostral maior (n=13) de CIS avaliados por hibridação *in situ* RNA/RNA para HPV6, 11, 16, 18 e 31 revelou 12/13 casos infectados pelo HPV16 (DEMETER et al. 1993). Semelhante ao descrito nos relatos citados, no presente estudo foi detectada a positividade para o HPV16 nos dois CIS avaliados. Embora tenham sido encontrados outros subtipos do HPV infectantes concomitantemente ao subtipo 16, não é possível afirmar que o mesmo não ocorreu nos tumores avaliados em outros estudos, uma vez que as metodologias utilizadas eram capazes de detectar somente um baixo espectro de subtipos virais. O efeito do HPV na progressão maligna de CIS para carcinoma invasivo em tumores de pênis ainda é pouco estudado e mais análises são necessárias para elucidar essa questão. No entanto, a alta frequência de infecção pelo HPV detectada nesse e em outros estudos da literatura para CIS parece indicar o envolvimento do vírus na progressão para tumores malignos de pênis. Para o nosso conhecimento, não há dados em literatura avaliando a infecção pelo HPV em hiperplasia peniana.

Estudos envolvendo alterações moleculares em CaPe são extremamente limitados, principalmente devido a raridade da doença e conseqüente dificuldade de amostras disponíveis. A análise simultânea de milhares de genes torna os *microarrays* uma ferramenta promissora com potencial aplicação em processos clínicos que vão do diagnóstico à classificação molecular do câncer, da estratificação dos pacientes a predição do prognóstico e descoberta de novos alvos que predizem a resposta tumoral (WADLOW e RAMASWAMY 2005). Com base nessa informação, análises de *microarray* foram utilizadas para avaliação de alterações no número de cópias genômicas e expressão gênica diferencial em amostras de CaPe. Além da comparação normal *versus* tumoral, foi verificado o efeito da infecção pelo HPV no padrão de alterações moleculares a partir da comparação entre amostras positivas e negativas quanto à infecção viral.

A avaliação de ganhos e perdas genômicas por aCGH foi realizada em 43 lesões penianas, sendo 41 CECs, uma hiperplasia e uma recidiva. Para a caracterização mais detalhada das alterações genéticas entre os tumores malignos (n=41), todas as amostras foram agrupadas quanto ao subtipo histológico para evitar qualquer interferência desse fator na análise dos dados. Foi encontrado maior número de alterações para CEC misto usual-papilífero (49 CNAs) e CEC usual (28,5 CNAs), valores intermediários para CEC misto usual-verrucoso (16 CNAs), e CEC papilífero (13,5 CNAs) e menor número de ganhos e perdas para CEC verrucoso (1,5 CNAs). Embora não tenha sido possível a realização de análises estatísticas devido ao pequeno número de amostras em cada grupo avaliado, pode-se observar o perfil completamente distinto obtido para CECs verrucosos em relação aos demais tumores, o qual envolveu perdas em 16p11.2-p11.1 e Yq11.222-q11.223 e ganhos

em 22q13.33. O baixo número de CNAs encontradas para os CECs verrucosos possivelmente reflete as características patológicas relacionadas à baixa agressividade tumoral descritas em literatura, incluindo baixo grau com pequeno potencial invasor e ausência de metástase (EBLE et al. 2004). Devido a essas características, os tumores verrucosos são frequentemente comparados aos carcinomas *in situ*, lesão que corresponde aos estados iniciais dos carcinomas de pênis e permanece como um processo intraepitelial, ou seja, não invasivo (GREENBERG 2010). Pelo fato dos dois carcinomas *in situ* disponíveis nesse estudo (casos PA14T e PA25T) não apresentarem amostras de DNA disponível para a avaliação das alterações genômicas por aCGH, não pôde ser realizada a comparação com carcinomas verrucosos. No entanto, com base na semelhança descrita previamente e para evitar desvios nas análises, optou-se pela exclusão dos CECs verrucosos e CEC misto usual-verrucoso das análises posteriores.

Para os 38 CECs de pênis restantes (35 usuais, dois papilíferos e um misto usual-papilífero), foram encontradas 1.074 alterações com prevalência de perdas (54,9%), seguido de ganhos genômicos (39,0%), alto nível de ganhos (5,7%) e deleções homozigotas (0,4%). Essas alterações podem ser eventos cruciais no desenvolvimento e progressão dos CaPe, uma vez que os ganhos genômicos constituem um dos mecanismos pelos quais os proto-oncogenes podem ser ativados (TODD e WONG 1999). As perdas genômicas podem causar inativação de genes supressores tumorais. Em circunstâncias normais, genes supressores tumorais impedem o crescimento e a divisão celular e, quando perdidos, podem contribuir para o aumento da proliferação celular pela ausência do controle exercido por seus produtos (HIROHASHI e KANAI 2003; SHERR 2004). Essas regiões alteradas

podem ainda conter miRNAs, classe de pequenos RNAs não codificadores capazes de regular negativamente outros genes, os quais agem em diversos processos biológicos (ESQUELA-KERSCHER e SLACK 2006).

Para o nosso conhecimento não há relatos em literatura utilizando a metodologia de aCGH em amostras de carcinoma de pênis. ALVES et al. (2001) utilizaram CGH cromossômico, uma metodologia de menor resolução, em 26 CEC de pênis (sem especificação quanto ao subtipo histológico) e relataram ganhos com maior frequência em 8q24 (11/23 casos), 16p11-12 (11/23), 20q11-13 (11/23), 22q (10/23), 19q13 (9/23) e 5p15 (8/23). Os autores descreveram perdas em 13q21-22 (10/23), 4q21-32 (7/23) e ao longo do cromossomo X (7/23). No presente estudo, os ganhos mais frequentes e presentes em mais de 20% dos casos foram verificados em 3q, 5p, 8q, 9p, 9q, 20p e 21p, enquanto perdas foram mais frequentes em 3p, 8p, 9p, 21p, Yp e Yq. Entre essas alterações, somente ganhos em 8q24.3 e 5p15.33 foram concordantes com as regiões previamente descritas como alteradas em tumores de pênis por ALVES et al. (2001). Além disso, POETSCH et al. (2007) descreveram alta taxa de LOH para dois marcadores microssatélites, D9S1604 e D9S1748 (64,3% dos CaPe avaliados), ambos localizados na mesma região de 9p descrita com alta frequência de perdas no presente estudo.

Um achado interessante corresponde à perda completa ou parcial do cromossomo Y observada em alta frequência por aCGH (39% dos casos). Esses resultados foram confirmados por uma metodologia independente para sete casos avaliados, sendo quatro com perda do cromossomo Y e três CaPe sem alteração. Diversas evidências experimentais indicam que uma série de tumores está associada a perdas no cromossomo Y e alterações na expressão de genes aí mapeados

(BIANCHI et al. 2006). A nulissomia do cromossomo Y foi relatada em carcinomas de próstata (16-53% dos casos), CEC de cabeça e pescoço (85%), CEC de esôfago (62%), adenocarcinomas gástricos (60%), entre outros (HUNTER et al. 1993; KÖNIG et al. 1994; POETSCH et al. 1999; SZYFTER et al. 1999; ALERS et al. 2000; VAN DEKKEN et al. 2001; BÉRGAMO et al. 2005; VEIGA et al. 2012).

O papel exato dessas alterações em carcinomas humanos ainda é questão de intenso debate. Embora os efeitos das alterações no cromossomo Y na origem e evolução das doenças malignas ainda não estejam totalmente elucidados, BIANCHI (2009) propôs que as alterações no cromossomo Y nos diferentes tipos de câncer não devem ser relevantes na transformação celular maligna, uma vez que a falta de recombinação em regiões exclusivas desse cromossomo levaria ao surgimento de genes deletérios e esse fato seria compensado pela perda de vários desses genes. No entanto, alguns estudos indicam que genes localizados no cromossomo Y possuem o potencial de influenciar a proliferação celular e a transdução de sinais, além de regular a expressão gênica (YUAN et al. 2011).

Alguns autores sugerem que a perda do cromossomo Y é um evento relacionado à idade avançada dos pacientes e que não apresentaria qualquer papel no desenvolvimento dos tumores (JIN et al. 1993; STONE e SANDBERG 1995; WIKTOR et al. 2000). Para avaliar a frequência de perda do cromossomo Y e sua relação com a idade em pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço, VEIGA et al. (2012) analisaram 21 amostras tumorais por FISH, das quais 13 eram pareadas por idade com tecidos normais. Foi observada perda do cromossomo Y em 18 dos 21 carcinomas avaliados (85%) que se mostraram com maior frequência nos tumores em relação aos normais independentemente da idade dos indivíduos. Esses dados

corroboram a hipótese de que perdas do cromossomo Y estão associadas à progressão e desenvolvimento de tumores e reforçam a idéia da presença de genes importantes nesse cromossomo, o que o torna um relevante alvo molecular.

No presente estudo foi encontrada associação entre perdas no cromossomo Y e características clínicas e patológicas, incluindo variáveis de pior prognóstico (estadio clínico avançado, presença de recidiva). Um estudo prévio do grupo detectou perda do cromossomo Y em 26 de 58 carcinomas de cabeça e pescoço avaliados independente da idade dos indivíduos (BÉRGAMO et al. 2005). Entre os casos com perda do cromossomo Y, 24 apresentaram estadio T3-T4, 14 possuíam envolvimento linfonodal e 16 morreram pela doença. Embora esses dados não tenham sido significativos estatisticamente, os autores sugeriram associação entre perda do cromossomo Y e pior prognóstico, assim como descrito no presente trabalho. Embora mais estudos sejam necessários para elucidar o efeito das perdas do cromossomo Y em carcinomas humanos, os dados preliminares obtidos indicam pela primeira vez o envolvimento dessas alterações em tumores de pênis.

As análises de aCGH realizadas para CaPe revelaram ainda padrão similar de alterações envolvendo os cromossomos 3 e 8, com perdas em grandes regiões de 3p e 8p e ganhos em 3q e 8q. Especificamente no cromossomo 3, foram encontradas sete regiões de perdas e quatro ganhos genômicos ocorrendo em 42% dos casos avaliados. Esse mesmo padrão de alterações mostra-se extremamente frequente em outros tipos de CEC, incluindo cabeça e pescoço, orofaringe, cervical, pulmão, anal e nasofaríngeo (HESELMAYER et al. 1996; BOCKMÜHL et al. 1996; HESELMAYER et al. 1997; BJÖRKQVIST et al. 1998; REDON et al. 2001; BALDWIN et al. 2005; BOELENIS et al. 2009; KLUSSMANN et al. 2009; SMEETS

et al. 2009; AMBATIPUDI et al. 2011). Perdas em 3p foram descritas como eventos precoces na carcinogênese de cabeça e pescoço, ocorrendo inicialmente em lesões precursoras do tipo displasia (HESELMEYER et al. 1996). No presente estudo, além dos CECs, foi avaliada uma hiperplasia de pênis. Não foram encontradas alterações no cromossomo 3 nesse caso. No entanto, como foi avaliada apenas uma hiperplasia, os dados obtidos não permitem avaliar se alterações do cromossomo 3 correspondem a um evento precoce na carcinogênese dos tumores de pênis.

O mesmo padrão de alterações foi encontrado para o cromossomo 8, com perdas no braço curto e ganhos no braço longo em 66% dos casos avaliados. Esse mesmo padrão de alterações foi descrito em diversos tumores, incluindo próstata, cervix, ovário, mama, colorretal, pulmão e oral, sendo uma característica recorrente em carcinomas escamosos (VIRGIN et al. 1999; POLE et al. 2006; SPARANO et al. 2006; LAGERSTEDT et al. 2007; LOCKWOOD et al. 2007; BOELENS et al. 2009; DIMOVA et al. 2009; ISHKANIAN et al. 2009). Em tumores de próstata, LOH em 8p é frequentemente relatada tanto na lesão precursora (neoplasia intraepitelial prostática) quanto em tumores avançados e metastáticos, sugerindo ser um evento precoce na carcinogênese que pode também ter um papel relevante na progressão tumoral (EMMERT-BUCK et al. 1995; CHER et al. 1996). Já ganhos em 8q foram identificados em alta frequência em lesões prostáticas avançadas e metastáticas, mas não em tumores primários (BOVA et al. 1993; JOOS et al. 1995; VISAKORPI et al. 1995). No presente estudo, o perfil genômico de uma hiperplasia de pênis revelou perdas genômicas envolvendo todo o braço curto do cromossomo 8 (8p23.3-p11.21). Essa alteração foi encontrada em 50% (14/38 casos) dos CECs avaliados e, embora tenha sido analisada somente uma hiperplasia, este resultado parece indicar que

alterações em 8p surgem como um evento inicial também na carcinogênese de pênis. Para o nosso conhecimento, não há dados em literatura avaliando o perfil genômico de lesões precursoras de tumores invasivos de pênis.

A alta frequência de perdas e ganhos nos cromossomos 3 e 8 levanta a questão de qual seria o mecanismo responsável por esse padrão de alteração recorrente em diversos tumores. Uma das possíveis hipóteses está relacionada à presença de sítios frágeis (SF), os quais correspondem a *loci* cromossômicos específicos que possuem *gaps* ou perdas não randômicas ocorrendo em resposta a condições específicas de cultura ou exposição a determinados agentes químicos (DALL et al. 2008). É conhecido que esses sítios possuem alta taxa de recombinação e funcionam como locais preferenciais para a ocorrência de translocação cromossômica, deleções, ampliações e integração de DNAs virais em populações de células pré-neoplásicas e neoplásicas (ARLT et al. 2006). Além disso, a ativação dos sítios frágeis está associada com várias formas de instabilidade do DNA em células cancerosas e acredita-se que este seja um evento na geração de danos genômicos nos períodos iniciais da tumorigênese (BLUMRICH et al. 2011). LUKUSA e FRYNS (2008), em uma revisão dos sítios frágeis conhecidos, relataram quatro SFs mapeados no cromossomo 3: FRA3A (3p24.2), FRA3B (3p14.2), FRA3C (3q27) e FRA3D (3q25). A comparação entre os SFs descritos e os limites cromossômicos de perdas e ganhos no cromossomo 3 detectados neste estudo mostrou o FRA3D no limite da alteração detectada em 3q13.31-q25.31 (*Start*: 116.240.263, *End*: 157.523.060) e 3q25.31-q29 (*Start*: 157.878.836, *End*: 199.501.827) (3q25). Já o cromossomo 8 possui cinco SFs: FRA8A (8q22.3), FRA8B (8q22.1), FRA8C (8q24.1), FRA8D (8q24.3) e FRA8E (8q24.1). Em uma

comparação semelhante, verificou-se que o FRA8A está mapeado no limite da alteração detectada em 8q22.3 (*Start:* 101.799.120, *End:* 103.732.868) (8q22.3) e FRA8D em 8q21.2-q24.3 (*Start:*87.183.119, *End:* 146.274.826) (8q24.3). Dessa forma, é possível que a presença de SFs nos cromossomos 3 e 8 seja um dos fatores facilitadores das ampliações observadas em 3q e 8q em CaPe, o que por sua vez gera uma alta instabilidade genômica permissiva a alterações subsequentes.

A maior frequência de ganhos para o cromossomo 8 foi encontrada em 8q21.2-q24.3 (66% dos casos). Essa região contém o gene *MYC* (8q24.21), que está amplificado em diversos tumores sólidos, incluindo mama, próstata, fígado, colorretal, entre outros (AL-KURAYA et al. 2007; TAKAHASHI et al. 2007; CHOSCHZICK et al. 2010, KOH et al. 2010). Esse gene é responsável pela codificação de um fator de transcrição que regula aproximadamente 15% dos genes humanos e age em processos como crescimento e proliferação das células, progressão do ciclo celular, transcrição, diferenciação, apoptose e motilidade celular (DANG 2012). Devido a essa característica, a ativação de *MYC* em um oncogene está intimamente relacionada à etiologia e progressão dos tumores humanos (DANG 2012). No presente estudo, as alterações genômicas detectadas por aCGH na região contendo *MYC* foram confirmadas pela metodologia de FISH para sete CaPe avaliados (quatro ganhos e três casos normais), confirmando a importância da amplificação de *MYC* nos tumores de pênis.

Para o melhor de nosso conhecimento, dois trabalhos avaliaram alterações em *MYC* em CaPe (PETER et al. 2006; MASFERRER et al. 2012). PETER et al. (2006), utilizando uma linhagem de tumor peniano infectada pelo HPV, detectaram ampliações e aumento de expressão do gene *MYC* (12-17 cópias, expressão do

transcrito aumentada em 3-10). Embora não tenham encontrado qualquer associação com HPV, recentemente MASFERRER et al. (2012) avaliaram 68 tumores de pênis invasivos e detectaram ganhos de *MYC* em 49 casos avaliados (72%). Esses ganhos foram significativamente relacionados ao aumento da expressão da proteína *MYC* quando foram excluídos os casos positivos para infecção por HPV da análise. No entanto, os autores detectaram relação entre o aumento dos níveis protéicos de *MYC* e presença do vírus, sugerindo uma possível ativação direta da proteína pelo HPV. Assim como encontrado por MASFERRER et al. (2012), os dados genômicos desse estudo parecem não indicar qualquer relação entre alterações em *MYC* e infecção pelo HPV, uma vez que entre todos os casos avaliados por aCGH com alteração em *MYC* (n=25), sete eram positivos (54% dos casos HPV+) e 18 negativos para infecção por HPV (72% dos casos HPV-). Além disso, entre os oito CaPe avaliados simultaneamente por FISH e aCGH, somente dois apresentavam positividade para o HPV, sendo um deles com ganhos detectado pelas duas metodologias e outro sem qualquer alteração. Os dados de alteração de *MYC* obtidos correspondem a achados interessantes em CaPe, uma vez que esse gene vem sendo amplamente avaliado como alvo terapêutico para o tratamento do câncer (HERMEKING 2003). Sua relação com infecção por HPV deve ser avaliada com maiores detalhes.

A correlação entre as alterações presentes em mais de 20% dos casos avaliados por aCGH e os dados clínico-patológicos mostrou resultados interessantes para as perdas e ganhos presentes nos cromossomos 3 e 8. Perdas em 3p e 8p, especificamente em 3p13-p11.1, 3p14.1, 3p21.1-p14.3, 3p22.2, 3p22.2-p21.32, 3p24.3-p22.2 e 8p23.3-p11.21, correlacionaram-se com características de pior prognóstico, tais como estadio T e estadio clínico avançado (III-IV), morte pela

doença e presença de recidiva. Alguns relatos em literatura detectaram associação entre características de pior prognóstico e alterações nos cromossomos 3 e 8. BOELENIS et al. (2009) relataram frequentes perdas em 8p23 em amostras de pacientes com CEC de pulmão que apresentavam metástase à distância. Estudos em carcinomas de bexiga mostraram perdas em 8p12 e 8p23.3 e associação positiva com tumores grau III (EGUCHI et al. 2010). Perdas em 8p23 foram também correlacionadas à presença de metástase à distância em pacientes com CEC de pulmão (BOELENIS et al. 2009). DIMOVA et al. (2009) encontraram associação entre perdas em 8p21-p23 e 8p11-p12 e tumores de ovário mais avançados. Embora os dados para alterações em 3p e características clínicas sejam mais escassos, QIN et al. (2008) relataram perdas no cromossomo 3, especificamente em 3p22, em CEC de esôfago e associação entre esta alteração e estadió T avançado e metástases linfonodais. Em conjunto, estes dados sugerem que alterações envolvendo 3p e 8p são comuns a vários tumores epiteliais e devem contribuir para um fenótipo tumoral mais agressivo.

Em 26 pacientes foi possível a comparação entre sobrevivida (CCS) e o padrão de alterações genômicas mais frequentes. Foi observada CSS diminuída em pacientes com perdas em 3p14.1 (23 genes alterados), 3p21.1-p14.3 (15 genes alterados), 3p22.2 (nove genes alterados), 3p22.2-p21.32 (74 genes alterados), 3p24.3-p22.2 (109 genes alterados) e ganhos em 3q25.31-q29 (382 genes alterados). Nestas regiões estavam mapeados 15 miRNAs, os quais podem ter contribuído para o desenvolvimento dos tumores. A expressão de miRNAs foi descrita e associada a vários cânceres, podendo agir tanto como oncogenes quanto como supressores tumorais (ESQUELA-KERCHER e SLACK 2006). Dessa maneira, as perdas

genômicas podem levar à diminuição na expressão dos miRNAs que agem como supressores tumorais, enquanto ganhos alteram oncogenes, possibilitando a ação de moléculas que contribuem para a carcinogênese de pênis.

A relação entre alterações genômicas no cromossomo 3 e alteração na sobrevida foi também descrita em outros tumores. DANNER et al. (2011) reportaram associação entre alterações no cromossomo 3 e OS (do inglês, *Overall survival*) diminuída em pacientes portadores de carcinoma de pulmão não pequenas células. SHEU et al. (2009) realizaram aCGH para duas linhagens celulares de carcinoma nasofaríngeo e demonstraram perdas recorrentes em 3p12.3-14.1, além de ganhos em 3q26.2-26.32, e diminuição na OS. ASHMAN et al. (2003) e BOCKMÜHL et al. (2000), também por aCGH, relataram ganhos em 3q25-27 e 3q21-29, respectivamente, e associação significativa com DFS (do inglês, *disease-free survival*) diminuída em pacientes com CEC de cabeça e pescoço. Os dados obtidos nesse estudo confirmam a relevância de alterações no cromossomo 3, assim como descrito previamente em literatura, e revelam pela primeira vez a associação entre perdas e ganhos em regiões específicas de 3p e 3q, respectivamente, e sua relação com sobrevida diminuída em pacientes com tumores de pênis. Esse achado é relevante e revela marcadores moleculares de progressão tumoral que podem ser utilizados futuramente na prática clínica e auxiliar no tratamento dos CaPe.

Além da relação com CSS e correlação com características clínicas e patológicas, a comparação entre o perfil genômico de dois grupos classificados de acordo com características de pior prognóstico revelou resultados interessantes quanto ao padrão de alterações no cromossomo 3. Foi encontrada maior frequência de perdas em 3p em grupos de pacientes que apresentavam características de pior

prognóstico, incluindo a presença de recidiva, margens cirúrgicas comprometidas, morte pela doença e estadió clínico e T avançados (III-IV). Além disso, embora não tenha sido estatisticamente significativo, foi observada maior frequência de perdas em 3p para pacientes com metástases linfonodais. Mais uma vez pode-se observar associação entre alterações no cromossomo 3 e características de pior prognóstico em pacientes com tumores de pênis, o que demonstra a importância dessa região como marcador molecular para a progressão da doença.

Os resultados da *clusterização* hierárquica não supervisionada revelaram claramente a formação de quatro subgrupos (*clusters* 1, 2, 3 e 4). Foram detectadas alterações características a cada grupo tumoral, as quais se encontram em maior número no *cluster* 1 e diminuem progressivamente até o *cluster* 4. Embora não tenha sido detectada associação entre os dados clínicos e patológicos avaliados e o agrupamento hierárquico, a divisão encontrada de acordo com o perfil genômico sugere a presença de diferentes rotas para o surgimento do CaPe de acordo com características específicas, as quais, pelos métodos utilizados, não puderam ser identificadas.

A comparação das alterações genômicas quanto à infecção pelo HPV resultou em um número semelhante de CNAs entre casos positivos e negativos para a infecção viral. Embora não existam dados genômicos em larga escala descritos em literatura para CaPe, as análises realizadas em carcinomas de cabeça e pescoço revelam, com alta frequência, menor número de alterações genômicas em tumores positivos para infecção viral em relação a casos negativos (SMEETS et al. 2006; KLUSSMAN et al. 2009; JUNG et al. 2010). A discordância entre os dados obtidos nesse estudo e os relatos em literatura para carcinomas de cabeça e pescoço podem

indicar diferentes mecanismos de oncogênese mediada pelo HPV nesses dois tipos tumorais.

Embora sem diferença no número total de alterações, a comparação entre o perfil genômico dos grupos positivos e negativos para HPV resultou em 19 regiões significativamente diferenciais, incluindo ganhos em 8p, 9p, 16p e 19q e perdas em 2q, 3p, 4p, 5q e 17p. Todas essas regiões apresentaram maior frequência de alteração no grupo HPV positivo quando comparado aos casos negativos, indicando se tratar de um evento associado à infecção viral nos tumores de pênis. Estudos avaliaram o perfil genômico comparativo entre casos positivos e negativos para infecção pelo HPV em carcinomas de orofaringe, cabeça e pescoço e tonsila (DAHLGREN et al. 2003; SMEETS et al. 2006; KLUSSMANN et al. 2009; JUNG et al. 2010). As regiões diferenciais variam entre os estudos, mesmo quando avaliados tumores do mesmo tipo, o que pode ser consequência das diferentes metodologias aplicadas para a genotipagem do HPV, heterogeneidade dos grupos amostrais avaliados ou às diferenças metodológicas (CGH cromossômico, aCGH em plataformas de BAC, aCGH em plataformas com *oligorrays*). Não há consenso em literatura de ganhos ou perdas genômicos associados à infecção pelo HPV aos quais o dados de CaPe pudessem ser comparados. No entanto, entre as regiões diferenciais observadas nesse estudo para CaPe, merecem destaque as perdas em 17p13.1 (21,4% dos tumores HPV positivos e nenhum caso negativo). Nessa região estão presentes 55 genes, entre eles o *TP53*, o qual é frequentemente descrito como alterado quanto à expressão proteica em tumores HPV positivos (ZUR HAUSEN 2002). Isso porque é bem conhecido que a expressão da proteína E6 viral antagoniza a proteína supressora TP53 em carcinomas cervicais, interferindo no controle de ciclo celular e apoptose

(ZUR HAUSEN 2002). Especificamente em CaPe, LOPES et al. (2002) avaliaram a relação entre a proteína TP53 e a presença de DNA do HPV em 82 CaPe e não encontraram associação entre a imunoreatividade da proteína mutada e presença viral. No entanto, os autores descreveram diminuição na sobrevivência global para pacientes com tumores positivos simultaneamente para HPV e TP53, indicando que mais estudos são necessários para elucidar a relação entre essa proteína e a carcinogênese de pênis mediada pelo HPV.

Os perfis genômicos distintos entre tumores de pênis negativos e positivos para HPV aqui descritos indicam a presença de duas etiologias distintas para os tumores de pênis, sendo uma relacionada à infecção por HPV e outra determinada por algum outro fator de risco para a doença, como por exemplo má higiene pessoal, fimose ou uso do tabaco. Essa hipótese foi proposta anteriormente com base na existência de subtipos tumorais tipicamente associados à infecção pelo HPV (basalóides ou condilomatosos), enquanto outros praticamente não possuem o vírus (verrucosos), o que indica que esses grupos devem se desenvolver por vias patogênicas distintas (RUBIN et al. 2001; GROSS e PFISTER 2004). Além disso, em um estudo recente do nosso grupo foi detectado um perfil diferencial de metilação entre casos positivos e negativos para infecção por HPV (KUASNE 2013). Enquanto as moléculas alteradas nos casos HPV+ relacionaram-se principalmente com sistema imune e inflamação, em tumores HPV- houve prevalência de alteração em genes com função no desenvolvimento e células tronco, corroborando a existência de um mecanismo dependente e outro independente do HPV na carcinogênese dos tumores de pênis. Em resumo, nossos dados reforçam a hipótese de

que os tumores HPV positivos e negativos apresentam alterações genéticas distintas e que estariam associados com duas vias diferenciais de desenvolvimento tumoral.

Os HPVs de alto risco ocorrem, na maioria dos tumores, integrados ao genoma celular humano e mais de 200 sítios de integração dos HPVs subtipos 16 e 18 foram descritos, principalmente em linhagens de carcinoma cervical (WENTZENSEN et al. 2004). A comparação das 19 alterações diferenciais entre CaPe positivos e negativos para infecção pelo HPV revelou que nove coincidem com sítios de integração descritos previamente para tumores ou linhagens celulares cervicais (2q22.3-q33.3, 2q35, 2q36.3-q37.1, 3p21.1, 4p16.1-p15.2, 5q31.1, 8p12, 9p13.3 e 19q13.32). Além disso, 3/9 regiões alteradas correspondem a SFs do genoma (2q33.2-2q33.3: FRA2I, 5q31.1: FRA5C e 19q13.32:FRA19A). Existe somente um relato em literatura descrevendo a relação entre a infecção pelo HPV e o sítio de integração em CaPe. PETER et al. (2006) avaliaram uma linhagem celular peniana infectada pelo HPV quanto à integração viral próxima à região de *MYC*. Foi observada integração do HPV e conseqüentes ganhos e aumento de expressão de *MYC* na linhagem celular. Embora no presente estudo tenham sido detectados ganhos na região de *MYC* para sete de 13 casos HPV positivos avaliados, os mesmos não foram significativos quando comparados os casos HPV positivos e negativos. Certamente, este achado precisa ser validado em um maior número de amostras.

A associação dos dois grupos classificados quanto à presença ou ausência do HPV com dados clínico-patológicos não mostrou correlação com as características como grau tumoral, estadió clínico, estadió T, recidiva, metástase linfonodal e metástase à distância, indicando que a infecção pelo HPV não influenciou o prognóstico nos casos de CaPe avaliados. Concordante com o descrito no presente

estudo, WIENER et al. (1992), avaliando 29 pacientes com CEC de pênis, não encontraram relação entre os grupos com positividade ou negatividade para HPV 16 ou 18 e idade, origem étnica, grau histológico ou envolvimento linfonodal. No entanto, contrariamente a estes achados, GREGOIRE et al. (1995), entre 117 tumores de pênis avaliados, descreveram maior incidência de DNA do HPV em casos com alto grau tumoral, crescimento agressivo e localizados na glândula. BEZERRA et al. (2001) avaliaram a presença do HPV em 82 tumores de pênis e observaram associação positiva entre a infecção pelo HPV e tumores histológicos grau I e relação negativa entre a detecção do HPV, extensão da cirurgia do tumor primário (amputação parcial ou total) e embolização linfática. Estes resultados demonstram a necessidade de estudos contendo um número maior de casos para elucidar o papel da infecção do HPV em CaPe e na etiologia ou progressão da doença.

Em um caso deste estudo foi possível comparar o perfil genômico de um tumor de pênis primário e da recorrência obtidos do mesmo paciente. Trata-se de um paciente com 37 anos cuja recidiva foi detectada aproximadamente um ano e dez meses após a retirada do tumor primário de pênis. As amostras de tumor e recidiva obtidas eram negativas para infecção pelo HPV. O CaPe apresentava grau II e estadió T3 e o paciente não apresentou metástase linfonodal ou à distância. A análise de perdas e ganhos genômicos demonstrou um número inferior de CNAs para o tumor primário, sendo 13 alterações contra 30 registradas para a recidiva. Embora as duas amostras tenham apresentado CNAs em comum, foi possível notar alterações adicionais adquiridas pela recidiva e não detectadas no tumor primário, incluindo ganhos em 7q, 8q, 9p, 9q, 12p, 20q e Xq, e perdas em 1q, 2q, 3p, 8p, 12q, 15q, 16p, 19p e 21p. Esses dados evidenciam um perfil genômico similar e suportam a

expansão clonal das células neoplásicas. Os ganhos e perdas observados *de novo* na recorrência podem estar relacionados à progressão da doença.

Neste estudo, também foi avaliada a expressão gênica em 39 casos de CaPe (36 CECs subtipo usual, dois papilíferos e um misto usual-papilífero) com a utilização da plataforma de 4x44K (Agilent Technologies, CA, USA). Em seguida, foram selecionados somente os CECs de pênis usuais (n=36) e esses tumores foram classificados quanto à positividade (11 casos) ou negatividade do HPV (25 casos) para a avaliação do perfil de expressão gênica entre os dois subgrupos.

A caracterização geral das alterações para os 39 tumores de pênis em relação a glândulas normais revelou 875 transcritos diferencialmente expressos, dos quais 241 apresentaram aumento de expressão (27,5%) e 634 tiveram diminuição na expressão gênica (72,5%). Para o nosso conhecimento, apenas KROON et al. (2008) relataram a análise de CEC de pênis (36 com e 24 sem metástases linfonodais) por expressão gênica usando *arrays*. As amostras foram divididas em dois grupos: treinamento (n=30) e validação (n=26). Baseado nas alterações de expressão gênica entre indivíduos linfonodos-positivos e negativos no grupo de treinamento, um classificador gênico foi construído para prever metástases linfonodais, de forma que sua precisão foi testada aplicando-o em pacientes do grupo de validação. O classificador construído categorizou somente 56% dos pacientes pertencentes a esse grupo, demonstrando que essa assinatura não era capaz de prever o risco de metástases linfonodais em pacientes com CaPe. No presente estudo, dados de metástase linfonodal estavam disponíveis para 19 pacientes com CEC de pênis submetidos à linfadenotomia, sendo 10 casos com comprometimento linfonodal e nove casos negativos. O perfil de expressão gênica foi comparado entre os dois

grupos e a análise supervisionada revelou 21 genes diferencialmente expressos, todos com aumento de expressão no grupo positivo para metástase linfonodal (*COPZ1*, *LARS*, *DNAJB14*, *RPN1*, *C1orf9*, *FAM119B*, *RHOC*, *AY129015*, *BFAR*, *LASS6*, *DICER1*, *AF086045*, *ATF7IP*, *AK095727*, *SNRPB*, *STMN3*, *PIK3R3*, *SOCS2*, *ECHDC2*, *DPY19L1P1* e *M31157*). Esses genes estavam localizados principalmente nos cromossomos 1 e 12 (cinco genes em cada), além da presença de dois genes no cromossomo 20 e um gene para os cromossomos 2, 3, 4, 5, 7, 14, 16, 18 e 19. Não foi possível agrupar hierarquicamente os tumores segundo o *status* linfonodal. Entretanto, o número de casos é muito limitado para maiores conclusões. Seria interessante avaliar o perfil de expressão destes 21 genes em um subconjunto muito maior de CaPe para revelar seu papel como classificadores.

Experimentos de *microarrays* de expressão geram uma grande quantidade de dados e um dos maiores desafios dessa metodologia corresponde à distinção dos genes com importância funcional para o desenvolvimento do câncer. Assim, com a finalidade de identificar moléculas potencialmente envolvidas no CaPe, genes com alteração na expressão gênica foram submetidos a análise funcional *in silico* com a utilização do *software* IPA.

Assim como esperado, a maioria dos genes com alteração de expressão gênica significativa apresentou relação com moléculas descritas previamente associadas ao câncer. Além disso, a análise de funções revelou predominância de genes envolvidos em movimentação celular, duplicação, recombinação e reparo do DNA, desenvolvimento celular, crescimento e proliferação, ciclo celular e morte e sobrevivência da célula. HANAHAN e WEINBERG (2011) propuseram dez alterações principais na fisiologia celular que coletivamente são responsáveis pela

transformação maligna, sendo (1) auto-suficiência em sinais de crescimento, (2) insensibilidade a sinais inibitórios do crescimento, (3) evasão à resposta imunológica, (4) potencial replicativo indefinido, (5) geração de inflamação com capacidade promotora tumoral, (6) potencial invasivo e de geração de metástase, (7) indução de angiogênese, (8) instabilidade e mutações genômicas, (9) resistência à morte celular (apoptose) e (10) desregulação das propriedades energéticas celulares. Os autores propuseram que todas essas capacidades são comuns à maioria, se não a todos os tipos de tumores humanos, e que cada um desses mecanismos adquiridos durante o desenvolvimento tumoral representa o sucesso na transgressão de todas as defesas contra o câncer presentes em células e tecidos. A análise das principais funções celulares e moleculares alteradas no presente estudo permite que algumas delas sejam englobadas nos dez mecanismos descritos por HANAHAN e WEINBERG (2011), demonstrando que o agrupamento dos genes com expressão alterada em tumores de pênis apresentou alterações específicas em processos essenciais para o desenvolvimento de tumores.

Em complemento ao observado na análise de funções biológicas alteradas para o grupo de genes diferencialmente expressos para CaPe, foram encontradas alterações em vias canônicas relacionadas ao desenvolvimento de tumores. Entre as dez principais vias (maiores *scores*), foram detectadas alterações significativas em genes presentes na via de sinalização do câncer de bexiga [-Log(P-valor)=1,46E-01], sinalização do RhoGDI [-Log(P-valor)=8,63E-02] e na via de sinalização do receptor do aril hidrocarboneto [-Log(P-valor)=8,39E-02]. Assim, a alteração de expressão nestes genes e as vias que eles participam em CaPe é compartilhada com outros tumores malignos.

Os genes diferencialmente expressos foram também submetidos à análise de ativação ou inibição de reguladores transcricionais (RT). De acordo com as alterações de expressão detectadas nos genes regulados pelos RT, foi predita a ativação das proteínas FOXO1 e JUN e inativação de TP53. Os RTs correspondem a moléculas que se ligam a sequências específicas de DNA, controlando a transcrição do DNA (KARIN 1990). Essas proteínas podem ser ativadas ou desativadas em determinados domínios pelos seguintes mecanismos: (a) ligação de um ligante, (b) fosforilação ou (c) interação com outros RT, como, por exemplo, na formação de homo ou heterodímeros. Dessa maneira, a partir dos sinais obtidos pelos genes regulados é possível prever o estado de ativação da proteína, o que auxilia no entendimento das atividades biológicas. O efeito causal entre RT e gene regulado é derivado da literatura compilada no banco de dados do *software* IPA e a predição de ativação ou inativação é feita com utilização do algoritmo *Z-score*, o qual foi desenhado para reduzir a chance de que dados aleatórios gerem predições significativas. É importante ressaltar que a análise não leva em consideração o sinal de expressão gênica do RT para fazer predições, somente os genes por ele regulados. Uma vez que os RTs agem na forma protéica, a avaliação da expressão protéica de FOXO1, JUN e TP53 forneceria resultados interessantes sobre seu estado de ativação ou inativação em CaPe. No entanto, considerando que alterações transcricionais correspondem a um mecanismo responsável por alterações protéicas, optou-se pela avaliação da expressão dos genes *FOXO1*, *JUN* e *TP53* pela metodologia de RT-qPCR em CaPe, mesmo que esses genes não tenham sido identificados como significantes na análise de expressão gênica por *microarrays*.

O RT FOXO1 foi classificado como ativado devido à presença de 7/10 genes por ele regulados descritos como ativados com base em dados publicados anteriormente, sendo eles *KIFI8A*, *DLGAPS*, *CENPF*, *CDK1*, *CCNB1*, *BIRC5* e *ASPM* ($Z\text{-score}=2,590$). Todas essas moléculas apresentaram aumento de expressão na lista de genes alterados obtidas para CaPe. O gene *FOXO1* apresenta papel na regulação de diversos processos relacionados ao câncer e possui atividade supressora tumoral principalmente por sua habilidade em promover apoptose e parada do ciclo celular (HUANG et al. 2006; PAIK et al. 2007). É conhecido que o aumento da atividade transcricional da proteína FOXO1 desencadeia apoptose em linhagem celulares de glioblastoma e câncer de próstata quando estimuladas por compostos específicos (ZHANG et al. 2010; WENG et al. 2012). Embora não tenha sido detectada alteração na expressão de *FOXO1* por *microarray*, provavelmente devido a limitações metodológicas, as análises de RT-qPCR revelaram diminuição nos níveis de transcritos de *FOXO1*, o que está de acordo com sua atividade supressora tumoral e revela seu provável papel na carcinogênese dos tumores de pênis pela modulação da apoptose e ciclo celular. Estudos são necessários para elucidar o *status* protéico e sua relação com a alteração nos níveis de transcritos.

Devido à disponibilidade de dados genômicos obtidos por aCGH nesse estudo e do *status* de metilação avaliado em um outro estudo do grupo (KUASNE 2013), foi avaliada a possibilidade de CNAs e metilação na região contendo *FOXO1* constituírem um mecanismo de alteração transcricional. Embora não tenha sido detectada alteração no perfil de metilação de *FOXO1* nos CaPe avaliados, perdas ocorreram em três das 38 amostras avaliadas, o que corrobora o fato de se tratar de um gene supressor tumoral. Foi também realizada a busca de miRNA que regulam

FOXO1 e sua provável alteração genômica. A análise realizada nas ferramentas *TargetScan* e *PicTar* revelou somente o *hsa-miR-9* como regular de *FOXO1*, o qual não estava localizado em regiões genômicas com ganhos ou perdas detectadas por aCGH. Além disso, um estudo do grupo não revelou expressão diferencial desse miRNA em CaPe. Assim, somente os dados de perdas genômicas em *FOXO1* obtidos nesse estudo permitem prever um mecanismo que pode levar à alteração transcricional desse gene em um grupo de CaPe.

O gene *JUN* codifica um RT crítico na promoção da proliferação celular. Essa proteína foi descrita como ativada devido a alteração nos níveis de transcritos de 5/9 genes regulados por JUN, sendo eles *PTX3* (diminuição de expressão) e *MMP9*, *MMP1*, *IL1B*, *FOSL1* (aumento de expressão) (*Z-score*=2,191). Trata-se de uma proteína cuja ativação regula a atividade de uma série de genes envolvidos em processos que governam o crescimento celular, proliferação e desenvolvimento (SHAULIAN e KARIN 2002). Assim como observado no *microarray*, a análise de RT-qPCR não revelou alteração no padrão de expressão do gene *JUN* para CaPe em relação a amostras normais. Assim, alterações transcricionais não devem estar relacionadas a ativação de JUN predita pelo *software* IPA. Isso porque a fosforilação de domínios específicos vêm sendo propostas como a principal forma de regulação da proteína JUN (MADEO et al. 2010; WANG et al. 2010).

Devido à disponibilidade de dados para presença do HPV, foi realizada a comparação dos níveis de *JUN* entre dois grupos classificados quanto à positividade ou negatividade para DNA viral. Níveis aumentados de *JUN* foram encontrados para casos positivos para infecção em relação aos casos negativos, revelando uma possível associação entre esse gene e a tumorigênese mediada pelo vírus.

O gene *TP53* foi o primeiro gene supressor tumoral a ser identificado. Aproximadamente 50% dos tumores humanos apresentam perda ou expressam uma proteína inativa resultante de mutação no gene (TOLEDO e WAHL 2006). A proteína codificada pelo *TP53* foi descrita como inativada nesse estudo devido à inibição observada para 20/32 genes por ela regulados com alteração de expressão (incluindo *WDHD1*, *SORBS1*, *RRM2*, *PLK1*, *MMP9*, *MCM4*, *MAD2L1*, *KIAA0101*, *IL1A*, *ESRL*, *DBF4*, *CENPF*, *CDKN3*, *CDK1*, *CDC25A*, *CCNB1*, *CCNA2*, *BIRC5*, *BCL2* e *BAI3*) ($Z\text{-score}=-2,543$). A inativação de *TP53*, tanto em nível gênico quanto protéico, é uma característica recorrente dos tumores humanos e frequentemente ligada ao aumento do potencial maligno, diminuição da sobrevida e resistência ao tratamento (VOGELSTEIN et al. 2000; MUNRO et al. 2005). Essa molécula está relacionada a uma série de processos biológicos, incluindo reparo a danos no DNA, parada do ciclo celular, apoptose, autofagia, senescência, metabolismo e idade (BODNER et al. 1992; LEVINE 1997; RILEY et al. 2008). A regulação da proteína *TP53* frequentemente envolve alterações cromossômicas, repressão da transcrição ou degradação, alteração conformacional ou da distribuição celular da proteína (HAINAUT e WIMAN 2009). No presente estudo, a análise de expressão gênica revelou diminuição na expressão de *TP53* em CaPe, o que poderia explicar a inibição protéica predita pelo *software* IPA. Alterações na expressão do gene *TP53* não foram descritas previamente para CaPe e os estudos são restritos a avaliação do produto protéico e correlação com características clínicas e patológicas. LOPES et al. (2002) descreveram associação entre imonureatividade de *TP53* mutada (mais de 20% de marcações celulares nucleares) e grau de *TP53* (grau 1: 20-50% das células marcadas; grau 2: mais de 50% de células marcadas) e presença de metástase

linfonodal, assim como correlação entre positividade para TP53 e diminuição na sobrevida. Já MARTINS et al. (2002) relataram associação entre a marcação para TP53 (mais de 10% de células marcadas) e diferenciação celular, profundidade da lesão primária, metástases linfonodais e pior sobrevida. Embora análises protéicas não tenham sido realizadas nesse estudo, a correlação entre níveis de transcritos de *TP53* e características clínico-patológicas não revelou associação significativa, possivelmente devido ao pequeno número amostral.

Em seguida, foi avaliada a possibilidade da diminuição nos níveis de transcritos de *TP53* terem ocorrido devido a alterações genômicas, detectadas por aCGH nesse estudo, ou por perfil diferencial de metilação (KUASNE 2013). Três de 38 CaPe avaliados por aCGH apresentaram perdas genômicas envolvendo o gene *TP53* e este evento pode ter contribuído para sua inativação. A avaliação da plataforma de metilação demonstrou ausência de ilhas CpG na região de *TP53*, e por esse motivo alterações na metilação não devem corresponder a um mecanismo de inativação desse gene.

Além disso, foi avaliada a possibilidade de alterações genômicas no único miRNA predito como regulador de *TP53* com as ferramentas *Pictar e Target Scan*, o *hsa-miR-150*. Foram encontradas perdas da região genômica onde se mapeia esse miRNA em dois CaPe e ganhos em outros dois tumores. Um estudo paralelo do grupo não revelou expressão diferencial desse miRNA em CaPe. Em conjunto, perdas de *TP53* e alterações genômicas no miRNA regulador apresentaram alterações que podem afetar a atividade desse gene.

Após análise envolvendo todos os CaPe submetidos a metodologia de *microarray*, foi realizada a seleção dos 36 CECs usuais de pênis e divisão em dois

grupos baseados nos dados da genotipagem do HPV (25 casos positivos e 11 casos negativos). Foram utilizados somente CECs usuais devido à variação na etiologia dos tumores de pênis relacionada ao HPV de acordo com o subtipo histológico.

Foram encontrados 381 genes diferencialmente expressos, sendo 227 com aumento e 154 com diminuição de expressão em tumores positivos para o HPV. Semelhante ao descrito na análise de aCGH nos tumores de pênis positivos e negativos para o vírus, o perfil diferencial de expressão gênica encontrado entre os dois grupos reforça a hipótese de que esses tumores possuem etiologias distintas: uma determinada por alguns fatores de risco descritos para o tumor e outro relacionado à infecção pelo HPV.

Para avaliar a possibilidade da alteração na expressão dos transcritos (381 genes) entre casos HPV positivos e negativos ter ocorrido devido a alterações genômicas, as quais podem ocorrer, por exemplo, em sítios de integração do HPV, foi realizada a comparação entre os genes com CNAs descritas como diferenciais entre os dois grupos por aCGH citadas anteriormente (19 regiões, 452 genes) e as 381 moléculas detectadas como alteradas quanto à expressão gênica. Não foram encontrados genes significativamente alterados pelas duas metodologias, o que pode indicar (a) regulação viral na expressão de transcritos por outro mecanismo que não alterações diretas no gene, tal como regulação de miRNAs ou regulação gênica pelo próprio transcrito viral ou (b) não detecção das alterações por aCGH devido à sensibilidade da técnica ou as diferenças inerentes a cada uma das metodologias.

A análise de *clusterização* tem sido amplamente aplicada aos dados de *microarray* com a finalidade de agrupar os genes com padrão de expressão similar e separar amostras com perfis de expressão próximos (BRENTANI et al. 2005). No

presente estudo, o agrupamento não supervisionado não revelou grupos distintos baseados no perfil de expressão. No entanto, o agrupamento supervisionado quanto à presença ou ausência de infecção pelo HPV para os 381 genes revelou dois grupos principais denominados *cluster A*, com predominância de casos negativos para HPV, e *cluster B*, com maior número de tumores positivos para infecção viral. Dois tumores positivos para HPV (HPV16 e HPV16/40) foram classificados no *cluster A*. A inclusão no grupo com predominância de casos negativos para a infecção pode ter ocorrido devido à presença de HPVs não ativos transcricionalmente, ou seja, embora seja detectado DNA viral nesses tumores, o HPV não é capaz de codificar as proteínas E6 e E7 responsáveis pelo potencial oncogênico. Especificamente em CaPe, HEIDEMAN et al. (2007) detectaram mRNA de E6 somente em 18 de 24 CaPe positivos para DNA do HPV16 (75%). Além disso, JUNG et al. (2010) reportaram sobrevida diferencial entre tumores de orofaringe positivos para DNA e RNA do HPV em relação àqueles positivos para DNA e negativos para RNA, demonstrando a importância da atividade transcricional após a infecção viral. Do mais, uma amostra negativa para HPV foi classificada no *cluster B*, o qual é composto principalmente por tumores positivos para infecção viral. A análise de prontuário desse paciente revelou sugestão de infecção pelo HPV com base em análises patológicas e, com base nessa informação, levantou-se a hipótese de que esse tumor é positivo para infecção viral, a qual não foi detectada devido à baixa carga de DNA viral ou incapacidade de detecção pelo kit utilizado para genotipagem. A busca por dados presentes em literatura referentes à detecção do HPV revelou alguns iniciadores utilizados para essa finalidade, entre eles o par GP5+/GP6+ (DE RODA HUSMAN et al. 1995). Esses iniciadores se ligam à região L1 do vírus e são

capazes de detectar 23 subtipos virais, incluindo quatro não presentes no kit utilizado: HPV13, 30, 32 e 43. Este teste foi aplicado na amostra PA9T e foi verificado sinal de infecção viral. Assim, conclui-se que essa amostra deve ter positividade para algum dos subtipos do HPV não detectados pelo kit (HPVs 13, 30, 32 ou 43). A análise de *Southern blot* poderá indicar o subtipo viral específico. Em resumo, a análise de agrupamento hierárquico dos dados de expressão gênica dos CaPe corrobora os dados de aCGH (alterações genômicas diferenciais entre casos positivos e negativos para HPV) e reforça a existência de duas vias de carcinogênese para os tumores de pênis, sendo uma dependente e a outra independente do vírus (RUBIN et al. 2001; GROSS e PFISTER 2004; KUASNE 2013).

Com a finalidade de distinção das moléculas relevantes e que possam participar da etiologia do CaPe baseados na infecção pelo HPV, todos os 381 genes com expressão diferencial entre tumores positivos e negativos para HPV foram submetidos à análise funcional *in silico* do *software* IPA. Essa análise demonstrou alta significância para moléculas com expressão diferencial relacionadas ao câncer e associadas ao ciclo celular, desenvolvimento, crescimento e proliferação celular, morte e sobrevivência da célula, morfologia celular, função e manutenção da célula, além de duplicação, recombinação e reparo do DNA. Assim como observado para a análise tumor *versus* normal, essas funções estão associadas ao processo tumoral e relacionados a funções biológicas e moleculares descritas por HANAHAN e WEINBERG (2011).

A análise das 10 vias gênicas com maiores *scores* baseadas nos genes com expressão diferencial entre tumores positivos e negativos para infecção pelo HPV revelou o envolvimento dos genes alterados principalmente em vias relacionadas ao

ciclo celular, tais como as vias do reparo a erros de pareamento em eucariotos, papel do *BRCA1* na resposta a danos ao DNA e reparo a quebras de dupla fita por recombinação homóloga, além das vias associadas à resposta inflamatória conhecidas como apoptose de células-alvo mediada por linfócitos T citotóxicos, biosíntese da histamina e sinalização do OX40. A análise dessas vias confirmou os dados obtidos para a análise de funções celulares e moleculares, na qual se observou alterações recorrentes em processos relacionados ao ciclo celular, e evidenciou um novo mecanismo de oncogênese relacionado ao HPV em tumores de pênis, ou seja, alteração em processos de resposta inflamatória.

O maior índice de alteração (*score*) quanto aos genes alterados foi encontrado para a via do reparo a erros de pareamento em eucariotos, a qual apresentou expressão aumentada para os genes *MSH6*, *RFC4* e *PCNA* nos casos positivos para infecção pelo HPV em relação aos negativos. A via de MMR possui um papel bem estabelecido na reversão de mutações causadas pela duplicação do DNA (MARTIN et al. 2010). Apesar da relação bem estabelecida entre mutações ou silenciamento epigenético das moléculas que mediam o MMR e o aumento da predisposição ao câncer (HEWISH et al. 2010), o papel do HPV nesses genes e sua relação com o desenvolvimento de tumores é ainda pouco conhecida. Por esse motivo, a expressão gênica diferencial encontrada para os genes da via do MMR (incluindo *MSH6*, *RFC4* e *PCNA*) por *microarray* foi submetida à análise de RT-qPCR e confirmou-se o aumento nos níveis de transcritos para os três genes em casos HPV positivos em relação aos negativos.

A proteína MSH6 forma heterodímeros com outro membro do MMR, a proteína MSH2, resultando em um complexo conhecido como hMutS α . Esse

complexo, por sua vez, corresponde a uma ATPase que possui papel no reconhecimento de erros no pareamento entre duas bases (KUNKEL e ERIE 2005). Células obtidas de ratos *MSH6*^{-/-} foram incapazes de reparar erros de pareamento de nucleotídeo únicos, apesar de inserções e deleções serem corrigidas normalmente (EDELMANN et al. 1997). Além da importância na biologia dos CaPe, a correlação com características clínicas e patológicas realizada nesse estudo mostrou associação entre baixos níveis de *MSH6* e presença de margens cirúrgicas comprometidas, revelando a aplicação de *MSH6* como marcador de pior prognóstico em CaPe. Outro gene avaliado, *RFC4*, codifica uma proteína pouco conhecida que possui papel na ativação do complexo hMutSα e no reparo dirigido à extremidade 3' do DNA (KADYROV et al. 2006). Assim como detectado nesse estudo, altos níveis de *RFC4* foram encontrados em tumores de cabeça e pescoço HPV positivos (SLEBOS et al. 2006).

Com relação ao gene *PCNA*, trata-se de um cofator da DNA polimerase cuja expressão protéica indica intensa divisão celular e reparo do DNA (DELAHUNT et al. 1995). A proteína codificada por esse gene interage com MSH2 e MLH1 e é essencial no início dos passos de re-síntese do DNA durante o MMR (UMAR et al. 1996). Os efeitos da infecção pelo HPV na modulação de PCNA foram avaliados *in vitro* utilizando queratinócitos humanos infectados com um vetor expressando a proteína E7 do HPV16 (FUNK et al. 1997). Os autores demonstraram que células com expressão da proteína viral permaneciam no ciclo celular após danos ao DNA. Essa permanência ocorreu principalmente pela supressão da proteína p21, responsável pela parada do ciclo celular na resposta a danos, com conseqüente liberação de PCNA e estímulo da divisão celular.

Entre os três genes associados ao MMR avaliados nesse trabalho, a proteína PCNA foi a única descrita previamente em CaPe, embora a associação com infecção pelo HPV não tenha sido estabelecida. MARTINS et al. (2002) detectaram forte correlação entre altos níveis de PCNA e estadios avançados dos CaPe. Um outro estudo brasileiro demonstrou associação entre a expressão protéica de PCNA e metástases linfonodais em CaPe (GUIMARÃES et al. 2006). No presente estudo, não foi encontrada relação entre os níveis de transcrito de *PCNA* e características clínicas ou patológicas. Em conjunto, os dados relacionando infecção pelo HPV e alterações na via do MMR em CaPe demonstram um novo mecanismo responsável pela carcinogênese mediada pelo HPV nesses tumores.

O impacto da infecção pelo HPV no sistema imune e resposta inflamatória foi demonstrado devido a alteração em genes pertencentes a vias canônicas relacionadas a linfócitos T citotóxicos, histamina e OX40. Esse achado está de acordo com os dados de um estudo recente do grupo em que foi avaliado o perfil de metilação nos mesmos CaPe utilizados nesse projeto (KUASNE 2013). A análise funcional dos genes hiper ou hipometilados no grupo positivo para infecção pelo HPV revelou alteração frequente em moléculas relacionadas ao câncer, sistema imune e inflamação. A presença de inflamação foi descrita como um mecanismo necessário para o desenvolvimento de tumores, uma vez que células imunes inflamatórias podem promover angiogênese, proliferação e invasão (COFFELT et al. 2010; EGEBLAD et al. 2010; HANAHAN e WEINBERG 2011). Nesse contexto, a infecção pelo HPV possui papel na carcinogênese devido à habilidade viral em iniciar uma série de respostas inflamatórias causadas principalmente pela necessidade de evasão do sistema imune pelo vírus (revisado em BOCCARDO et al.

2010). A relevância dessa resposta imune pode ser observada a partir do momento em que fatores de necrose tumoral (do inglês, *Tumor necrosis factor* – TNF), interleucinas (IL)-1 e interferons (IFN)-a e b inibem a transcrição de oncogenes virais *in vitro*, diminuindo o crescimento de linhagens celulares que possuem o genoma do HPV (DELVENNE et al. 1995; KIM et al. 2000). Embora a relação entre a infecção pelo HPV e a alteração de genes envolvidos na resposta imune e inflamação em carcinomas cervicais tenha sido frequentemente descrita (HERDMAN et al. 2006), para o nosso conhecimento o presente estudo e outro do nosso grupo (KUASNE 2013) são os primeiros relatados em CaPe. Trata-se de uma contribuição importante que revela um dos mecanismos associados ao potencial oncogênico do HPV em tumores de pênis e que, futuramente, poderá ser utilizado para o tratamento diferencial dos pacientes infectados.

Em resumo, os dados de expressão gênica em larga escala analisados para os 39 CaPe e em seguida para dois grupos baseados na presença (n=11) ou ausência do HPV (n=25) e a posterior análise funcional *in silico* possibilitaram a detecção de alterações em genes específicos envolvidos principalmente em funções relacionadas ao câncer e inflamação, os quais podem contribuir para o fenótipo tumoral.

Adicionalmente às análises em larga escala para a avaliação da expressão gênica, sete genes foram selecionados para avaliação dos níveis de transcritos por RT-qPCR com base em associação ao câncer descrita previamente em literatura, sendo eles *.CAVI*, *FLI1*, *IFIT2*, *MMP1*, *PI3*, *SBF1* e *STAT1*. Todos esses genes apresentaram alteração no número de cópias detectada por aCGH em pelo menos um CaPe e duas moléculas possuíam também alteração na expressão gênica por *microarray* (*MMP1* e *STAT1*). Todos os genes foram comparados entre dois grupos

contendo amostras tumorais *versus* normais (prepúncios) e tumores HPV positivos *versus* negativos.

Aumento de expressão foi observado para o gene *MMP1*, confirmando os resultados obtidos por *microarray*. Esse gene apresentou ganho genômico somente em um CaPe e provavelmente esse não corresponde a um mecanismo frequente de alteração na expressão gênica nesses tumores. O gene *MMP1* pertence à família das metaloproteinases (MMP), endopeptidases que podem clivar virtualmente qualquer componente da matriz extracelular (do inglês, *Extracellular matrix* - ECM) (EGEBLAD e WERB 2002). A associação entre aumento na expressão de MMPs, assim como observado nesse estudo, e o desenvolvimento do câncer ocorre principalmente pela proteólise de componentes da ECM pelas MMPs e conseqüente invasão de células cancerosas e desenvolvimento de metástases (LIOTTA et al. 1980).

Embora o gene *MMP1* e seu produto protéico não tenham sido avaliados previamente em CaPe, há relatos em outros membros da família das MMPs. CAMPOS et al. (2006) descreveram aumento de expressão protéica de MMP9 como um fator de risco independente para recorrência em CaPe. SOARES et al. (2006) associaram a alta expressão de MMP2 e MMP9 com tumores com menor diferenciação e com um padrão de invasão aumentado e em pequenos grupos de células. No presente estudo, não foi observada associação significativa entre os níveis do transcrito *MMP1* e características clínicas e patológicas. MMP9, que apresentou aumento na expressão protéica nos trabalhos citados acima de CAMPOS et al. (2006) e SOARES et al. (2006), embora não tenha sido submetidas a avaliação

por RT-qPCR, apresentaram aumento na expressão gênica detectada por *microarray* nesse estudo.

Foi também verificada diminuição significativa na expressão de *CAVI*, *FLII* e *SBFI* em CaPe quando comparados a controles normais. Todos esses genes apresentaram perdas genômicas detectadas por aCGH em cinco CaPe e esse pode ser um mecanismo responsável pela diminuição de expressão observada. Infelizmente as análises em larga escala não puderam detectar alteração na expressão para os genes *CAVI*, *FLII* e *SBFI*, provavelmente devido às limitações da técnica, e novas metodologias devem ser aplicadas para validar esse achado. O gene *CAVI* é um dos membros da família das caveolinas, principais proteínas componentes da cavéola localizada na superfície da maioria dos tipos celulares (HNASKO e LISANTI 2003). Experimentos utilizando células NIH-3T3 (fibroblasto embrionário murino) indicaram que a supressão de *CAVI* promove o crescimento independente de ancoragem e formação de tumores em ratos *nude*, o que é revertido pela restauração da expressão desse gene (GALBIATI et al. 1998). Dessa maneira, a diminuição de expressão observada para *CAVI* em CaPe deve estar relacionada à transformação oncogênica dos fibroblastos, promovendo o escape do crescimento celular controlado.

O gene *FLII* apresenta características oncogênicas, uma vez que é bem caracterizado que altos níveis gênicos e protéicos de *FLII* são capazes de inibir a apoptose e aumentar a sobrevivência celular (PEREIRA et al. 1999). Foi demonstrado que o gene *FLII* é capaz de diminuir a expressão de *RBI*, levando à transição das células pela fase S do ciclo celular (TAMIR et al. 1999). Esse gene é bem conhecido em sarcoma de Ewing, em que ocorre um rearranjo genético onde *FLII* torna-se

justaposto na extremidade 3' do gene *EWS*, resultando em uma proteína de fusão cuja atividade transcricional de *FLII* é aumentada em relação à forma selvagem (DELATTRE et al. 1992). No presente estudo foi encontrada diminuição na expressão de *FLII* em tumores de pênis em relação aos normais avaliados. Não temos conhecimento de outros relatos que avaliaram o papel deste gene em carcinomas de pênis. Utilizando fibroblastos embrionários murinos e fibroblastos dérmicos humanos, foi demonstrado que a repressão do gene *FLII* é capaz de aumentar o nível de mRNA dos constituintes da família de colágenos tipo I *COL1A1* e *COL1A2* (KUBO et al. 2003; NAKERAKANTI et al. 2006). Sabe-se que as proteínas codificadas por esses genes são constituintes da matriz extracelular (ECM) e a perda do controle de seus membros é uma característica marcante na progressão para invasividade tumoral (TYSNES e MAHESPARAN 2001). Esses dados indicam que, embora frequentemente descrito como oncogene, a expressão gênica de *FLII* depende do contexto celular avaliado e rotas alternativas de atuação desse gene podem ocorrer em CaPe.

Foi também detectada diminuição significativa nos níveis do transcrito *SBF1* por RT-qPCR. O gene *SBF1* codifica uma pseudofosfatase da família das miotubularinas, muitas das quais têm sido relacionadas ao crescimento e diferenciação celular. FIRESTEIN e CLEARY (2001) demonstraram que deleções na região N-terminal de SBF1 levam à transformação de células NIH-3T3, indicando o importante papel dessa molécula na modulação do crescimento celular. Além disso, a expressão de SBF1 na mesma linhagem celular foi capaz de inibir a proliferação. Assim, a diminuição nos níveis de transcritos encontrada para *SBF1* nos tumores de pênis deve estar relacionada ao estímulo da proliferação nas células tumorais.

Todos os genes avaliados por RT-qPCR devido à sua relevância no câncer (*CAVI*, *FLII*, *IFIT2*, *MMP1*, *PI3*, *SBF1* e *STAT1*) foram correlacionados a dados clínicos e patológicos e resultados significativos foram encontrados para o gene *PI3*. Embora sem alteração na comparação tumor *versus* normal, a diminuição de expressão para *PI3* foi encontrada nos CaPe com pior prognóstico, especificamente nos grupos com presença de invasão angiolinfática (P=0,0410), estadió clínico III-IV (P=0,000), grau tumoral III<II<I (P=0,028), estadió T III-IV (P=0,028), presença de recorrência (P=0,017) e morte pela doença (P=0,037). Trata-se de um gene responsável pela codificação da proteína conhecida como SKALP/ESI/Elafin, a qual está envolvida na inflamação e cicatrização de feridas (WILLIAMS et al. 2006). A proteína SKALP apresenta propriedades antimicrobianas e papel na regulação do sistema imune inato (WILLIAMS et al. 2006). Dessa forma, acredita-se que a diminuição na expressão de *PI3* possa estar relacionada à desregulação de moléculas do sistema imune, o que enfraqueceria a defesa do indivíduo e contribuiria para o desenvolvimento de um fenótipo tumoral mais agressivo.

A análise de integração dos dados genômicos e transcriptômicos pode contribuir para compreender melhor o desenvolvimento de diversos tipos de tumores e auxiliar na identificação de genes *driver* que possam ser utilizados como marcadores moleculares robustos, assim como alvos terapêuticos importantes nos CaPe. Por esse motivo, foi realizada a análise integrada dos dados genômicos (aCGH) e transcriptômicos em CaPe. Todas as análises de *microarray* foram realizadas em plataformas 4x44K (Agilent Technologies, CA, USA) e a integração ocorreu para 37 CaPe com resultados disponíveis para alteração no número de cópias e expressão gênica.

As análises estatísticas correspondem a uma fonte de limitações nos diferentes estudos de análise integrada. O número limitado de ferramentas de bioinformática disponíveis para este fim dificulta a comparação com outros dados. Há diferentes abordagens descritas para a integração dos dados, tais como correlação de *Pearson* ou de *Spearman*, regressão robusta, teste de *Fischer*, além de diferentes *softwares* disponíveis (LO et al. 2007; LO et al. 2008; SADIKOVIC et al. 2008; BECK et al. 2010; BERG et al. 2010; AMBATIPUDI et al. 2012, entre outros). Com base na análise destes relatos e na consistência dos resultados obtidos, optou-se pela realização da correlação de *Pearson*.

A integração realizada para os 5.018 genes com alterações genômicas e 6.117 genes com expressão gênica diferencial para os 37 CaPe revelou oito combinações: ganhos genômicos/diminuição de expressão gênica, ganhos/aumento de expressão, perdas/diminuição de expressão, perdas/aumento de expressão, ganho/sem alteração de expressão, perda/sem alteração de expressão, sem alteração genômica/aumento de expressão, sem alteração genômica/diminuição de expressão. O **Quadro 11** indica as possíveis combinações dos resultados obtidos para as duas metodologias submetidas à análise integrada e as possíveis explicações para cada um dos eventos. Para facilitar a discussão destes dados, as combinações foram numeradas e serão descritas de acordo com essa numeração.

Quadro 11 - Combinação entre os resultados de aCGH e expressão gênica em larga escala após análise integrada e possíveis explicações para os eventos encontrados.

Evento	aCGH	Expressão gênica	Possíveis explicações
1 Sentido inverso entre alteração no número de cópias e expressão ou somente alteração na expressão gênica	Ganho	Diminuição	Mutação em ponto, rearranjo intra e intercromossômico, evento epigenético, inserção e expressão de sequências virais no genoma humano, regulação por miRNAs, modificações pós-transcricionais, limitação metodológica
	Perda	Aumento	
	Normal	Diminuição	
	Normal	Aumento	
2 Somente alteração no número de cópias	Ganho	Normal	Regulação por miRNA, modificações pós-transcricionais, limitação metodológica, expressão do alelo restante (perdas)
	Perda	Normal	
3 Concordância entre número de cópias e expressão	Ganho	Aumento	Expressão gênica dirigida por alteração no número de cópias genômicas, limitação metodológica
	Perda	Diminuição	

A combinação **número 1** envolve alterações inversas entre CNAs e expressão do transcrito, ou seja, ganhos genômicos/diminuição na expressão ou perdas/aumento na expressão de transcritos ou a presença de alterações na expressão gênica sem qualquer variação no número de cópias genômicas. Nesses casos é evidente que alterações na expressão gênica não são dirigidas por alterações no número de cópias genômicas e outros mecanismos moleculares não detectados por aCGH devem ser capazes de alterar o padrão de expressão gênica. Entre esses mecanismos podemos citar (a) mutações em ponto, (b) rearranjos intra e intercromossômicos, (c) eventos epigenéticos, (d) inserção e expressão de sequências virais no genoma humano (d) regulação por miRNAs ou (e) modificações pós-transcricionais.

Além de alterações no número de cópias genômicas, a célula tumoral pode apresentar diferentes classes de variações na sequência de DNA, incluindo mutações em ponto e rearranjos inter- e intracromossômicos (STRATTON et al. 2009). A

disponibilidade do sequenciamento genômico levou os pesquisadores à análise de diversos produtos da PCR para detecção de substituições de base ou pequenas inserções ou deleções, as chamadas mutações em ponto, presentes, por exemplo, em éxons de genes codificadores de proteínas. Esses estudos permitiram identificar alterações em genes com relevância clínica como *BRCA1* em câncer de mama, *MSH2*, *MLH1* e *MSH6* em câncer colorretal, *CDKN2A* em melanoma familiar, *TP53* na síndrome de Li-Fraumeni, entre muitos outros (KATBALLE et al. 2002; LALLOO et al. 2003; WHITTEMORE et al. 2004; PHO et al. 2006). Esses achados demonstram a importância das mutações em ponto para o fenótipo tumoral e indicam que esse tipo de alteração genômica é também capaz de alterar a expressão de transcritos. Já os rearranjos intra- e intercromossômicos envolvem a quebra de sequências específicas do genoma e ligação a outro fragmento de DNA no mesmo cromossomo ou em outro lugar do genoma e caracterizam-se principalmente pelas inversões e translocações. Em nível molecular, essas alterações podem levar à ativação de um oncogene devido a seu posicionamento próximo a um promotor forte ou gerar fusões entre dois diferentes genes e originar um transcrito com propriedades tumorigênicas (LENGAUER et al. 1998). Um exemplo clássico é a translocação presente em um grande número de casos na leucemia mielóide crônica originando o cromossomo *Philadelphia*, resultante da fusão da extremidade C-terminal do gene *ABL* (cromossomo 9) à extremidade N-terminal do gene *BCR* (cromossomo 22), o que resulta em um transcrito quimérico (NOWELL 1997).

Alterações epigenéticas também são capazes de alterar a estrutura da cromatina e expressão gênica e se manifestam frequentemente como alterações na metilação de alguns resíduos de citosina (STRATTON et al. 2009). Diversos genes

com hipermetilação aberrante da região promotora foram identificados em tumores, incluindo reguladores do ciclo celular, genes de reparo a danos no DNA, genes associados a apoptose, angiogênese e muitos outros (MOMPARLER e BOVENZI 2000). A hipometilação foi também descrita e é comumente relatada em diversos tumores sólidos, incluindo CaPe (FERREUX et al. 2003; GUERRERO et al. 2008; YANAGAWA et al. 2008).

Além disso, as células podem adquirir regiões genômicas exógenas, frequentemente derivadas de vírus como HPV, Epstein Barr (EBV) ou Hepapite B (HBV), os quais possuem sequências capazes de regular a transcrição gênica humana e estão implicados na gênese de diversos tumores (TALBOT et al. 2004). Especificamente para HPV, é bem descrito que a integração ao genoma humano e conseqüente expressão dos oncogenes virais *E6* e *E7* é responsável por alterações na expressão dos transcritos relacionados às vias do p14^{ARF}/MDM2/TP53 e p16^{INK4a}/ciclina D/RB1 (SARKAR et al. 1992; ZUR HAUSEN 2002). Assim, é possível que a integração do HPV no genoma da célula hospedeira contribuiu para alterar a expressão de alguns transcritos.

Outro possível regulador da expressão gênica em humanos corresponde aos miRNAs, pequenos RNAs contendo de 20 a 25 nucleotídeos codificados por genes específicos e que exercem sua atividade principalmente pela repressão da tradução ou promoção da degradação do RNA (GROSSHANS e FILIPOWICZ 2008). Até o momento, 21.264 miRNAs foram preditos no genoma humano de acordo com o banco de dados *mirBase* (<http://www.mirbase.org>, dados coletados em 12/02/2013). A expressão de miRNAs foi descrita e associada a vários cânceres, podendo agir tanto como oncogenes quanto como supressores tumorais (ESQUELA-KERCHER e

SLACK 2006). A presença de miRNAs atuando como reguladores da expressão gênica é um dos mecanismos que pode explicar as diferenças entre os resultados de alterações do número de cópias genômicas e a expressão destes transcritos. Após a realização da análise integrada para os 37 CaPe, foram identificados os miRNAs que regulam os genes sem concordância entre as metodologias de aCGH e expressão gênica em larga escala e correlação positiva (ganhos/perda de expressão ou perdas/aumento na expressão). Essa análise resultou em 287 miRNAs reguladores, dos quais 110 estão localizados em regiões de ganhos ou perdas genômicas detectadas nos mesmos casos por aCGH (38,3%). Essas alterações podem ter levado à função desordenada desses miRNAs. Um estudo recente do grupo (MUÑOZ 2011) avaliou a associação entre alterações nos níveis de transcritos de miRNAs específicos (*hsa-miR-22*, *hsa-miR-23b*, *hsa-miR-26b*, *hsa-miR-27b*, *hsa-miR-133b* e *hsa-miR223*) e genes potencialmente regulados por esses miRNAs pertencentes a família de carreadores de soluto SLC (*SLC1A3*, *SLC8A1*, *SLC25A4*, *SLC25A16*, *SLC25A25* e *SLC27A4*) em 33 CaPe. A comparação entre tumores e tecidos normais mostrou que *hsa-miR-23b*, *hsa-miR-26b*, *hsa-miR-27b* e *hsa-miR-133b* apresentavam expressão significativamente diminuída, enquanto *hsa-miR-223* apresentava expressão aumentada na comparação com as amostras normais. Além disso, os genes *SLC8A1* e *SLC27A4* apresentaram diminuição de expressão e se correlacionaram negativamente com seus miRNAs reguladores (diminuição de *SLC8A1* e aumento de *hsa-miR-223* em CaPe e aumento de *SLC27A* e diminuição de *hsa-miR-133b*), sugerindo que regulação da expressão desses genes é controlada por miRNAs em CaPe.

A regulação pós-transcricional é outro fator que pode alterar a expressão de transcritos sem a influência das alterações genômicas. Nesse contexto, merecem

destaque as proteínas de ligação ao RNA (do inglês, *RNA-binding protein* - RBP), as quais são capazes de se ligar ao mRNA e alterar qualquer aspecto do processamento dos transcritos, desde o mecanismo de *splicing* alternativo até a estabilidade e tradução da molécula (PASCALE e GOVONI 2012). Como as proteínas RBPs estão envolvidas na expressão de diversos genes responsáveis pelo crescimento e proliferação celular, alterações nessas moléculas podem alterar os RNAs a que se ligam e levar ao desenvolvimento do câncer (KIM et al. 2009). Entre os processos que podem ser alterados pelas RBPs, merece destaque o *splicing* alternativo, que corresponde à manutenção de éxons distintos durante o processamento dos mRNAs para posterior síntese protéica. O *splicing* anormal leva à produção de mRNAs que não são produzidos nas células normais, os quais, por sua vez, podem produzir proteínas com potencial oncogênico (SCHOLZOVÁ et al. 2007). Assim, alterações na maquinaria de regulação pós-transcricional pode alterar os mRNAs celulares na ausência de alteração genômica.

As limitações metodológicas podem explicar todos os diferentes eventos observados após análise integrada. Alterações em genes específicos quanto à alterações genômicas ou expressão gênica podem não ter sido detectadas devido aos critérios utilizados nas análises de aCGH e expressão gênica em larga escala. Entre os critérios utilizados para aCGH podemos citar *threshold* de significância, espaçamento entre sondas, quantidade de sondas alteradas e limiares de ganhos e perdas, enquanto a análise de expressão gênica envolve a remoção de *outliers*, exclusão de *not available*, valor de $P \leq 0,05$, entre outros.

A combinação **número 2** refere-se à presença de ganhos ou perdas em regiões cromossômicas específicas e ausência de alteração na expressão de

transcritos. Nessa situação, além da possibilidade da expressão dos transcritos ser regulada por miRNAs ou por mecanismos pós-transcricionais, duas outras explicações podem ser consideradas. Uma delas corresponde a limitações metodológicas após análise dos dados de expressão gênica em larga escala, a qual envolve o preenchimento de critérios específicos. Outra possível explicação para a não concordância encontrada após análise integrada relaciona-se às perdas genômicas e ausência de expressão gênica diferencial. No presente experimento, 2.384 genes apresentaram alterações genômicas e ausência de alterações na expressão de transcritos, dos quais 1.568 estavam em regiões de perda. Nenhum desses genes apresentou deleções homozigotas entre os casos avaliados. Uma explicação alternativa é que o alelo remanescente seria suficiente para promover o aumento na expressão do transcrito.

A combinação **número 3** corresponde a resultados concordantes entre as duas metodologias (ganhos/aumento de expressão ou perdas/diminuição de expressão). Essas alterações foram encontradas com significância estatística e $r \geq 0,5$ para 187 genes (90 genes com ganho/aumento de expressão e 97 com perda/diminuição de expressão) e indicam que essa parcela de alterações no RNA pode ser atribuída a ganhos e perdas genômicas. Esses dados contribuem enormemente para a compreensão dos mecanismos moleculares responsáveis pela iniciação e progressão do CaPe.

Para melhor caracterização das 187 moléculas alteradas após análise integrada, esses genes foram submetidos à análise *in silico* no *software* IPA para verificação do impacto biológico de tais alterações. Além da presença significativa de moléculas alteradas relacionadas ao câncer, a análise das funções revelou alteração

em diversos processos associados ao desenvolvimento e progressão de tumores, tais como organização e montagem celular, manutenção e funcionamento da célula, sinalização e interação célula-célula, entre outros. Assim como descrito para a análise de expressão gênica, essas funções são capazes de alterar alguns dos dez processos necessários para a transformação maligna (HANAHAN e WEINBERG 2011) e demonstram a importância do grupo de genes obtidos após análise integrada.

A verificação da capacidade dos 187 genes quanto a alterações em vias canônicas descritas previamente revelou alta significância para duas vias alteradas em diversos tumores: as vias de sinalização do PTEN e mTOR. Devido a alterações no número de cópias e expressão gênica de genes individuais, essas vias podem ter contribuído para o desenvolvimento e progressão dos CaPe.

A via de sinalização do PTEN contém os genes com perda/diminuição na expressão *TGFBR2*, *RAF1*, *INPP5F*, *FGFR1*, *FGFR2* e ganho/aumento nos níveis de transcritos para o gene *SHARPIN*. É interessante notar as perdas e níveis de transcritos diminuídos obtidos para os receptores de fatores de crescimento *TGFBR2*, *FGFR1* e *FGFR2*. A ligação de fatores de crescimento a receptores específicos de membrana inicia a ativação de numerosas e complexas vias de transdução de sinais que levam à transcrição gênica e modulação de funções celulares, tais como crescimento e proliferação. Os fatores TGF β (do inglês, *Transforming growth factor beta*) correspondem a um grupo de proteínas multifuncionais que regulam diversos processos celulares pela ligação a três tipos de receptores: tipo 1 (TGFBR1), tipo 2 (TGFBR2), e tipo 3 (TGFBR3) (HU et al. 1998). Esses fatores apresentam atividade supressora tumoral principalmente pela indução da parada do crescimento e apoptose, e sua inativação ocorre pela redução na expressão gênica, mutações de perda de

função ou inativação funcional dos TGFBRs ou outros membros *downstream* (KLEEFF et al. 1999; HALDER et al. 2005). Nesse trabalho, foi descrita pela primeira vez em CaPe perdas como mecanismo de diminuição na expressão de *TGFBR2*, os quais podem contribuir para alteração na via do PTEN e alterações na apoptose e crescimento das células. A baixa expressão protéica dos receptores de TGF β foram descritas para diversos tumores, incluindo colon (MARKOWITZ et al. 1995), mama (SUN et al. 1994) e próstata (GUO e KYPRIANOU 1998).

Perdas/diminuição de expressão foram também detectadas para os receptores FGF (do inglês, *Fibroblast growth factor*) *FGFR1* e *FGFR2*, os quais são também constituintes da via de sinalização do PTEN. A família FGF consiste em 18 ligantes que se ligam a quatro receptores FGFR homólogos (FGFR1–FGFR4) (revisado em WESCHE et al. 2011). Apesar dos membros dessa família serem frequentemente reconhecidas como oncogenes em diversos tumores (CHANG et al. 2005; CHIN et al. 2006; FREIER et al. 2007), os FGFRs foram também identificados como supressores tumorais em câncer de bexiga (RICOL et al. 1999), câncer de próstata (GIRI et al. 1999), adenocarcinomas salivares (ZHANG et al. 2001) e melanoma (GARTSIDE et al. 2009), o que está de acordo com as perdas e diminuição de expressão descritas nesse trabalho para *FGFR1* e *FGFR2*, com um padrão de expressão dependendo do contexto avaliado. Estudos utilizando linhagens celulares de bexiga e modelos animais de meduloblastoma revelaram associação entre a expressão da proteína FGFR e bloqueio da proliferação celular (RICOL et al. 1999; FOGARTY et al. 2007). Esses dados demonstram perdas como mecanismo de diminuição na expressão de fatores de crescimento em CaPe, os quais são

possivelmente capazes de alterar uma importante via canônica e contribuir para a carcinogênese em pênis.

Com relação à via de sinalização do mTOR, foram encontradas perdas/diminuição de expressão para os genes *RPS4Y1*, *STK11* e *RHOA*, além de ganhos/aumento na expressão de *MAPKAP1*, *PPKCI*, *PPP2R4* e *PIK3R4*. A ativação de mTOR está relacionada à aquisição do potencial proliferativo e a via de sinalização do mTOR corresponde a um importante alvo terapêutico utilizando a droga Rapamicina. Nesse trabalho, não foram encontrados genes *drivers* alterados que funcionem como alvo da Rapamicina (FK506 e complexo mTORC2: mTOR, GβL, mSIN1, protor e rictor), mas ganho e aumento de expressão foram observados para o gene *upstream PIK3R4*, membro do complexo PI3K. As proteínas PI3K são responsáveis pela regulação de mTOR pela inativação dos reguladores negativos de mTOR conhecidos como TSC2 (INOKI et al. 2002). Os ganhos/aumento de expressão em *PIK3R4* devem estar relacionados à inibição de TSC2 e ativação de mTOR. Além disso, o gene *MAPKAP1* (proteína SIN1), que apresentou ganho/aumento de expressão, é essencial para a integridade do complexo mTORC2 (JACINTO et al. 2006). Apesar da necessidade da confirmação desses dados em nível protéico, esse trabalho descreveu pela primeira vez a importância da sinalização de mTOR em CaPe.

A análise de biomarcadores realizada para os 187 genes revelou 16 moléculas com alterações genômicas e transcriptômicas com aplicação descrita previamente no diagnóstico, prognóstico, progressão, eficácia de drogas, segurança de medicamentos e resposta à terapia e tumores. Alterações no número de cópias e níveis de RNA não foram descritas até o momento para essas moléculas em CaPe e sua aplicação como

biomarcadores não foi avaliada. Nesse conjunto gênico, é interessante notar as perdas/diminuição de expressão obtidas para os biomarcadores *MLH1* e *MGMT*, ambos relacionados ao reparo do DNA. A proteína MLH1 forma heterodímeros com PMS2, PMS1 ou MLH3 e resulta em complexos que apresentam papel no reparo do DNA pela regulação da terminação da excisão causada pelo reparo a erros e por exercer atividade endonuclease na extremidade 3' do DNA (ZHANG et al. 2005; KADYROV et al. 2006). Animais mutantes para o gene *MLH1* são suscetíveis ao câncer e apresentam instabilidade genômica, o que reflete um sistema de reparo de DNA deficiente (BAKER et al. 1996; LIPKIN et al. 2002). Mutações em *MLH1* correspondem ao principal mecanismo responsável pelo desenvolvimento de câncer colorretal hereditário sem polipose (NICOLAIDES et al. 1994). Já o gene *MGMT* codifica uma proteína responsável pelo reparo do DNA pela transferência de um grupo metil localizado na posição O⁶ de uma guanina para uma cisteína acceptora (PEGG 2000). Como consequência, a redução nos níveis de transcritos de *MGMT*, como descrito nesse estudo, reduz a capacidade de correção de erros de pareamento de bases devido à hipermetilação. Apesar de metilação ter sido proposta como o principal mecanismo responsável pela diminuição na expressão de *MGMT* (ESTELLER et al. 1999; SMITH-SØRENSEN et al. 2002; SHEN et al. 2005; LIU et al. 2006; LEE et al. 2009; KORDI-TAMANDANI et al. 2010; LEE et al. 2011), esse trabalho detectou perdas em *MGMT* para 24% dos CaPe avaliados com alta correlação positiva com a diminuição de expressão deste transcrito. Além disso, um estudo paralelo realizado no grupo não encontrou alterações no *status* de metilação para *MGMT* utilizando os mesmos tumores de pênis avaliados nesse estudo (KUASNE 2013), sugerindo que a perda é um mecanismo significativo de alteração

do *MGMT* em CaPe. Em resumo, o uso extensivo de *MLH1* e *MGMT*, assim como outras moléculas, como biomarcadores revela resultados interessantes em CaPe e esses genes *drivers* devem ser avaliados em mais detalhes em estudos futuros.

A localização dos genes *driver* detectados pela análise integrada principalmente nos cromossomos 3 e 8 correspondem a outro fator relevante, uma vez que essas regiões foram associadas a pior prognóstico e sobrevida na análise de aCGH. Com base nesses achados, quatro moléculas localizadas nessas regiões foram selecionadas para validação genômica e transcriptômica e avaliação do impacto no prognóstico. Perdas e diminuição na expressão foram avaliadas para *PPARG* (3p25) e *DLC1* (8p22) e ganhos/aumento na expressão para *LAMP3* (3q26.3-q27) e *TNFSF10* (3q26). Foram selecionados somente genes com ausência de CNAs descritas previamente no banco de dados DGV e/ou em uma população normal de 100 mulheres brasileiras normais, o que demonstra que uma alteração genômica rara que pode contribuir para o fenótipo tumoral. Devido à indisponibilidade de tumores penianos adicionais, a confirmação dos dados foi realizada para o mesmo grupo amostral utilizado nas análises de *microarray*.

A análise de expressão gênica por RT-qPCR confirmou a diminuição nos níveis de transcritos detectada por *microarray* para *PPARG* e o aumento de expressão para *LAMP3* e *TNFSF10* em relação a amostras normais. Com relação às alterações genômicas, entre as 18 regiões avaliadas para os quatro genes por qPCR (*PPARG*: 4 regiões; *LAMP3*: 2 regiões; *TNFSF10*: 4 regiões e *DLC1*: 8 regiões), oito demonstraram alteração após análises de qPCR, o que corresponde a 6/9 regiões coincidentes com a localização das sondas por aCGH (66,6% de confirmação) e 2/9 segmentos flanqueadores. A discrepância observada pode ter ocorrido principalmente

devido a diferenças na sensibilidade das metodologias utilizadas. No entanto, todos os quatro genes apresentaram o mesmo tipo de alteração detectado no *microarray* em pelo menos uma das regiões avaliadas, o que confirma a alteração detectada em larga escala.

Embora tenham sido observadas alterações em regiões de éxons, as quais possuem significado funcional bem estabelecido por estarem envolvidas na codificação de proteínas, os genes *PPARG* e *LAMP3* apresentaram alterações confirmadas em regiões intrônicas. Sabe-se atualmente que os íntrons contêm diversos tipos de RNAs não codificadores, porém funcionais, os chamados ncRNAs (do inglês, *Noncoding RNA*). Esse grupo de RNAs é dividido em duas classes maiores com base no tamanho dos transcritos: os *small* ncRNA (sncRNA) e *long* ncRNA (lncRNA). Os sncRNAs são representados por diversas espécies de RNAs, tais como os RNAs de mamíferos conhecidos como snoRNA (do inglês, *Small nucleolar RNA*), os quais estão localizados em regiões de íntron e são produzidos durante o processamento pós *splicing* do RNA intrônico (HÜTTENHOFER et al. 2002; HIROSE et al. 2003). Mais da metade dos snoRNAs estão localizados em íntron de genes codificadores de proteínas, enquanto os outros estão presentes em íntrons de genes não codificadores, os quais não possuem éxons funcionais e cuja função primária deve ser simplesmente expressar esses pequenos RNAs funcionais (FILIPOWICZ e POGACIC 2002). Além disso, outro tipo de sncRNA frequentemente localizado em íntrons corresponde aos miRNA e estima-se que aproximadamente três quartos dos miRNAs humanos localizam-se em regiões intrônicas (PANG et al. 2006; BARTEL 2009).

Já os lncRNAs correspondem a transcritos que variam entre 200 nucleotídeos e cerca de 100Kb (kilobases) e que não possuem ORF (revisado em GIBB et al. 2011). O pequeno número de lncRNAs descritos até o momento está associado com diversos processos biológicos, tais como epigenética, *splicing* alternativo, presença como componentes estruturais ou precursores de pequenos RNAs (COSTA 2010). Além disso, alguns lncRNAs são capazes de diminuir os níveis de miRNAs nas células, os chamados “esponjas de miRNAs”. Como exemplo, podemos citar o lncRNA *HULC*, cujo aumento de expressão é frequentemente detectado em tumores renais (WANG et al. 2010). Estudos demonstraram que o principal mecanismo para aumento de *HULC* está associado com a capacidade dessa molécula em seqüestrar o *hsa-miR-372*, possibilitando o aumento nos níveis gênicos da proteína CREB e consequente estímulo da transcrição de *HULC*.

Esses dados demonstram a importância das alterações no número de cópias presentes em íntrons e sugerem que, pelo menos em um subconjunto de casos de CaPe, essas alterações podem ser funcionais e contribuir para a etiologia dos carcinomas de pênis.

Com relação aos genes alterados, perda e diminuição de expressão foram confirmadas para o gene *PPARG*, um receptor hormonal que age como fator de transcrição ativado por ligantes (MANGELSDORF et al. 1995). A diminuição nos níveis de transcritos foi também detectada para *PPARG* em carcinomas de esôfago e pulmão (SASAKI et al. 2002; TERASHITA et al. 2002). SILVEIRA et al. (2009) detectaram perdas em 3p25.1, região onde está localizado o gene *PPARG*, em 17 de 19 casos de síndrome mielodisplásica avaliados, com diminuição na expressão gênica para alguns desses tumores. A principal relevância do gene *PPARG* está em

sua aplicação como alvo terapêutico. Estudos utilizando linhagens celulares de câncer de pulmão indicaram que a administração de ligantes sintéticos a esse receptor pode ativar a rota de *PPARG* e levar à diferenciação, inibição do crescimento e apoptose de células tumorais (SATOHI et al. 2002; KESHAMOUNI et al. 2004). Recentemente, foi demonstrado que a expressão ectópica de *PPARG* pelo vetor Ad-PPAR ou seu agonista Rosiglitazol é capaz de inibir a atividade metastática *in vitro* e *in vivo* utilizando modelos de carcinoma hepatocelular, principalmente pela diminuição da invasão e migração celular (SHEN et al. 2012). No presente estudo foi detectada a diminuição nos níveis de transcritos desencadeada por perdas genômicas, o que torna o gene *PPARG* uma molécula interessante em CaPe que deve ser avaliada futuramente como alvo terapêutico.

Apesar de perdas genômicas terem sido confirmadas para algumas regiões de *DLCL1*, a avaliação dos níveis de transcritos não validou a diminuição de expressão detectada por *microarray* quando comparados tumores de pênis e quatro glândulas normais avaliadas por RT-qPCR. Entretanto, para verificar uma possível alteração de *DLCL1* que não pôde ser detectada devido aos normais utilizados, foi realizada a comparação dos níveis de transcritos obtidos para os CaPe com 13 prepúncios normais, os quais haviam sido utilizados para validação em outros genes. Foi verificado nível diminuído do transcrito *DLCL1*, confirmando os dados em larga escala. No entanto, novas metodologias devem ser aplicadas para confirmar esse achado. Perdas e diminuição de expressão são esperadas para *DLCL1*, uma vez que se trata de um importante gene supressor tumoral cuja expressão está diminuída em uma série de tumores, incluindo esôfago, cervix, fígado, mama, pulmão, ovário, rim, cólon, estômago e próstata (KIM et al. 2003; PLAUMANN et al. 2003; WONG et al.

2003; ULLMANNOVA e POPESCU 2006; SENG et al. 2007; ZHANG et al. 2009). Estudos utilizando linhagens celulares de carcinoma hepatocelular, câncer de mama e meningioma demonstraram que *DLC1* é uma proteína RhoGAP responsável pela inibição da proliferação celular pela diminuição da migração e invasão das células, além da indução da apoptose (YUAN et al. 2003; ZHOU et al. 2004, HANKINS et al. 2008, ROESSLER et al. 2012). A construção de um modelo celular de fibroblastos embrionários murinos homocigoto para o gene *DLC1* demonstrou transformação neoplásica após longos períodos de incubação, além de crescimento a altas densidades e formação de tumores quando injetadas em ratos imunocomprometidos, confirmando a atividade supressora tumoral de *DLC1* (QIAN et al. 2012). No presente trabalho, foram descritas perdas de um alelo de *DLC1* em 50% dos CaPe como um mecanismo responsável pela alteração dos níveis de transcritos do gene. Deleções heterozigotas em *DLC1* foram também descritas em cerca de 50% de tumores de fígado, cólon e pulmão (revisado em XUE et al. 2008). É interessante notar que a razão de deleções heterozigotas em *DLC1* em alguns tipos de tumores (50%) é semelhante àquela encontrada para o gene *TP53*, o que confirma seu papel como gene supressor tumoral relevante (XUE et al. 2008).

Além de influenciar os níveis de transcritos, foi demonstrado que as alterações genômicas em *DLC1* ocorreram em regiões exônicas associadas a características de pior prognóstico (invasão perineural e margens cirúrgicas comprometidas), o que confirma a importância de *DLC1* nos CaPe e demonstra pela primeira vez o papel deste gene na carcinogênese de pênis. A associação entre alterações no número de cópias no gene *DLC1* e fatores clínico-patológicos não foi anteriormente descrita em CaPe ou outros tipos de câncer e os relatos em literatura

restringem-se a avaliação de regiões genômicas mais amplas de 8p que contém o gene *DLCL1*. ROESSLER et al. (2012) demonstraram associação entre o tempo de sobrevida reduzido para pacientes com perdas em regiões específicas de 8p, enquanto DIMOVA et al. (2009) relataram associação entre perdas em 8p21-p23 e desenvolvimento de tumores de ovário mais avançados. Além disso, nas análises de aCGH realizadas nesse trabalho, foi detectada associação entre perdas no braço curto do cromossomo 8 (8p23.3-p11.21), local em que está *DLCL1*, e presença de recorrência nos CaPe.

Ganhos dirigindo a alteração na expressão de transcritos foram confirmados para os genes *LAMP3* e *TNFSF10*. Devido à sua localização em 3q27, uma região frequentemente amplificada em tumores, o gene *LAMP3* foi proposto como candidato a oncogene em 3p. Assim como nesse estudo, OZAKI et al. (1998) descreveram expressão aumentada de *LAMP3* em uma série de tumores, incluindo esôfago, cólon, reto, uretra, estômago, mama, tubas de falópio, tireóide e parótida. KANAOKA et al. (2005) detectaram associação entre o aumento de expressão de *LAMP3* e altos níveis de migração celular e metástase *in vitro* e *in vivo*, respectivamente. Além disso, altos níveis de *LAMP3* foram detectados em células de carcinomas mamários sob condições de hipóxia e seu aumento de expressão foi relacionado a tumores de mama ER negativos mais agressivos, tumores positivos para metástase linfonodal e recorrência locorregional (NAGELKERKE et al. 2011). A associação entre os níveis de transcritos de *LAMP3* ou alterações genômicas não revelou resultados significativos para CaPe. No entanto, os dados encontrados por outros autores revelam a importância de *LAMP3* e sua implicação como fator prognóstico deve ser avaliado em um maior número de casos de CaPe.

Já o gene *TNFSF10* codifica uma proteína conhecida como TRAIL que é capaz de induzir a apoptose em uma variedade de tumores (WILEY et al. 1995). As características pró-apoptóticas e a diminuição na expressão de TRAIL em tumores é bem estabelecida e tornam essa molécula um interessante alvo terapêutico (ASHKENAZI 2002). No presente estudo, entretanto, foram encontrados ganhos e aumento nos níveis de transcritos de *TNFSF10*. Apesar da necessidade de avaliação da expressão protéica, esses achados pressupõem que, pelo menos para CaPe, outros mecanismos envolvendo o gene *TNFSF10* devem estar relacionados à carcinogênese de pênis. Estudos revelam que a proteína TRAIL é capaz de ativar NF- κ B por promover o recrutamento de outras proteínas e formação de um complexo celular que ativa IKK (VARFOLOMEEV et al. 2005). A ativação de IKK, por sua vez, leva à degradação de inibidores de Kb (I- κ B) e translocação de NF- κ B para o núcleo, onde é estimulada a transcrição de diversos genes, incluindo os anti-apoptóticos *FLIP*, *IAP1*, *IAP2*, *XIAP* e *BCL2* (LIN et al. 2000). Dessa forma, acredita-se que a ativação de NF- κ B funcione como agonista à apoptose induzida por TRAIL e foi demonstrado que a ativação de NF- κ B induzida por TRAIL pode promover aumento de sobrevivência, proliferação e invasividade em algumas linhagens celulares de câncer resistentes à apoptose induzida por TRAIL (EHRHARDT et al. 2003; ISHIMURA et al. 2006). A proteína TRAIL é capaz também de estimular outras cascatas de sinalização, incluindo as vias JNK, MAPK e PKB/Akt, e sua significância deve ainda ser estabelecida (LIN et al. 2000; SECCHIERO et al. 2003; VARFOLOMEEV et al. 2005). Dessa forma, devido aos ganhos e aumento de expressão detectados para *TNFSF10* nesse estudo e apesar de estudos funcionais e protéicos serem necessários, é possível propor que esse gene deve exercer seu potencial oncogênico em CaPe

devido à ativação de vias alternativas que não estão relacionadas à atividade pró-apoptótica frequentemente descrita para TRAIL.

Os resultados obtidos nesse estudo demonstram que análises de aCGH e expressão gênica em larga escala são ferramentas úteis na identificação de genes relacionados aos CaPe. Foi possível identificar genes específicos responsáveis por um perfil genético diferencial entre os grupos positivo e negativo para a infecção pelo HPV. A análise integrada entre dados genômicos e transcriptômicos revelou genes *driver* relevantes e possivelmente envolvidos na alteração de vias canônicas, além da aplicação como biomarcadores. Um grupo de genes e regiões específicas alteradas quanto ao número de cópias e/ou expressão gênica foi selecionado para avaliação por metodologias adicionais e confirmou sua relevância em CaPe. Essa análise levou à identificação de marcadores moleculares robustos, assim como alvos terapêuticos importantes que podem ser utilizados futuramente na prática clínica contra esse tumor agressivo e com severo impacto psicológico.



Conclusões

7 CONCLUSÕES

Foi verificada a positividade para o HPV em 33,3% dos CaPe avaliados, em um caso de HP, uma metástase e dois CIS. Infecções múltiplas foram detectadas em três CECs e um CIS.

A avaliação de alterações no número de cópias genômicas determinou um perfil genômico distinto de acordo com o subtipo histológico. Foi observada associação entre alterações no cromossomo 3 e pior prognóstico e/ou CSS diminuída. Quatro grupos de tumores foram encontrados com base no perfil de ganhos e perdas genômicas. Observou-se um perfil genômico diferencial entre dois grupos classificados quanto à infecção pelo HPV. Ganhos no gene *MYC* e perdas no cromossomo Y foram confirmados por metodologias adicionais.

A análise de transcritos determinou expressão gênica diferencial para os reguladores transcricionais *FOXO1* e *TP53*. Foi observada influência do HPV em genes relacionados ao ciclo celular e resposta inflamatória e relação entre presença viral e aumento de expressão para os genes da via do reparo a erros de pareamento em eucariotos *MSH6*, *PCNA*, *RFC4*. Genes envolvidos em processos relacionados ao câncer apresentaram expressão diferencial entre amostras tumorais e normais (*MMP1*, *CAVI*, *FLII* e *SBF1*). Níveis diminuídos do gene *PI3* foram associados a pior prognóstico.

A análise integrada de dados genômicos e transcriptômicos revelou genes cuja expressão é dirigida por alterações genômicas em CaPe. Moléculas cuja expressão não possui explicação em CNAs podem apresentar regulação por

miRNAs. Alterações genômicas e expressão diferencial foram confirmadas para os genes *DLC1*, *LAMP3*, *PPARG* e *TNFSF10* utilizando metodologias adicionais. Perdas em regiões específicas de *DLC1* foram associadas a pior prognóstico.

Foram encontrados diversos marcadores com possível aplicação na prática clínica. Perdas genômicas em 3p e 8p, ganhos em 3q, perdas em regiões exônicas do gene *DLC1*, além da diminuição na expressão dos genes *PI3* e *MSH6* foram descritos como **fatores prognósticos** devido à sua associação com pior prognóstico e/ou CSS reduzida. Alteração gênica/transcriptômica em genes pertencentes à via do mTOR (alvo: Rapamicina) e nas moléculas alvos de drogas *FGFR1*, *FGFR2*, *MGMT*, *PPARG*, *RAF1* (perda/diminuição de expressão) e *RXRA* (ganho/aumento de expressão) revelaram importantes **alvos terapêuticos** para CaPe. Alterações gênicas/transcriptômicas foram também descritas em moléculas utilizadas no **diagnóstico, marcadores de progressão, prognóstico, resposta à terapia, segurança de medicamentos e resposta a drogas** para outros tumores (*DLC1*, *FGFR1*, *FGFR2*, *GLI3*, *MGMT*, *MLH1*, *PCDH11Y*, *PPARG*, *PTGES*, *RAF1*, *RPS4Y1*, *RXRA*, *SIAH2*, *STK11*, *TGFBR2*, *TNFSF10*).



*Referências
Bibliográficas*

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afonso LA, Moyses N, Alves G, et al. Prevalence of human papillomavirus and Epstein-Barr virus DNA in penile cancer cases from Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2012; 107:18-23.

Alers JC, Rochat J, Krijtenburg PJ, et al. Identification of genetic markers for prostatic cancer progression. **Lab Invest** 2000; 80:931-42.

Al-Kuraya K, Novotny H, Bavi P, et al. HER2, TOP2A, CCND1, EGFR and C-MYC oncogene amplification in colorectal cancer. **J Clin Pathol** 2007; 60:768-72.

Alves G, Heller A, Fiedler W, et al. Genetic imbalances in 26 cases of penile squamous cell carcinoma. **Genes Chromosomes Cancer** 2001; 31:48-53.

Ambatipudi S, Gerstung M, Gowda R, et al. Genomic profiling of advanced-stage oral cancers reveals chromosome 11q alterations as markers of poor clinical outcome. **PLoS One** 2011; 6:e17250.

Ambatipudi S, Gerstung M, Pandey M, et al. Genome-wide expression and copy number analysis identifies driver genes in gingivobuccal cancers. **Genes Chromosomes Cancer** 2012; 51:161-73.

Andersson P, Kolaric A, Windahl T, Kirrander P, Söderkvist P, Karlsson MG. PIK3CA, HRAS and KRAS gene mutations in human penile cancer. **J Urol** 2008; 179:2030-4.

Arlt MF, Durkin SG, Ragland RL, Glover TW. Common fragile sites as targets for chromosome rearrangements. **DNA Repair (Amst)** 2006; 5:1126-35.

Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:420-30.

Ashman JN, Patmore HS, Condon LT, Cawkwell L, Stafford ND, Greenman J. Prognostic value of genomic alterations in head and neck squamous cell carcinoma detected by comparative genomic hybridisation. **Br J Cancer** 2003; 89:864-9.

Aynaud O, Ionesco M, Barrasso R. Penile intraepithelial neoplasia. Specific clinical features correlate with histologic and virologic findings. **Cancer** 1994; 74:1762-7.

Backes DM, Bleeker MC, Meijer CJ, et al. Male circumcision is associated with a lower prevalence of human papillomavirus-associated penile lesions among Kenyan men. **Int J Cancer** 2012; 130:1888-97.

Backes DM, Kurman RJ, Pimenta JM, Smith JS. Systematic review of human papillomavirus prevalence in invasive penile cancer. **Cancer Causes Control** 2009; 20:449-57.

Baker SM, Plug AW, Prolla TA, et al. Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. **Nat Genet** 1996; 13:336-42.

Baldwin C, Garnis C, Zhang L, Rosin MP, Lam WL. Multiple microalterations detected at high frequency in oral cancer. **Cancer Res** 2005; 65:7561-7.

Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell** 2009; 136:215-33.

Beck AH, Lee CH, Witten DM, et al. Discovery of molecular subtypes in leiomyosarcoma through integrative molecular profiling. **Oncogene** 2010; 29:845-54.

Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate - a practical and powerful approach to multiple testing. **J R Stat Soc Ser B Stat Methodol** 1995; 57:289-300.

Berg M, Agesen TH, Thiis-Evensen E, et al. Distinct high resolution genome profiles of early onset and late onset colorectal cancer integrated with gene expression data identify candidate susceptibility loci. **Mol Cancer** 2010; 9:100.

Bérgamo NA, da Silva Veiga LC, dos Reis PP, et al. Classic and molecular cytogenetic analyses reveal chromosomal gains and losses correlated with survival in head and neck cancer patients. **Clin Cancer Res** 2005; 11:621-31.

Bezerra AL, Lopes A, Santiago GH, Ribeiro KC, Latorre MR, Villa LL. Human papillomavirus as a prognostic factor in carcinoma of the penis: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy. **Cancer** 2001; 91:2315-21.

Bianchi NO, Richard SM, Pavicic W. Y chromosome instability in testicular cancer. **Mutat Res** 2006; 612:172-88.

Bianchi NO. Y chromosome structural and functional changes in human malignant diseases. **Mutat Res** 2009; 682:21-7.

Björkqvist AM, Husgafvel-Pursiainen K, Anttila S, et al. DNA gains in 3q occur frequently in squamouscell carcinoma of the lung, but not in adenocarcinoma. **Genes Chromosomes Cancer** 1998; 22:79-82.

Blumrich A, Zapatka M, Brueckner L, Zheglo D, Schwab M, Savelyeva L. The FRA2C common fragile site maps to the borders of MYCN amplicons in neuroblastoma and is associated with gross chromosomal rearrangements in different cancers. **Hum Mol Genet** 2011; 20:1488-501.

Boccardo E, Lepique AP, Villa LL. The role of inflammation in HPV carcinogenesis. **Carcinogenesis** 2010; 31:1905-12.

Bockmühl U, Schlüns K, Küchler I, Petersen S, Petersen I. Genetic imbalances with impact on survival in head and neck cancer patients. **Am J Pathol** 2000; 157:369-75.

Bockmühl U, Schwendel A, Dietel M, Petersen I. Distinct patterns of chromosomal alterations in high- and low-grade head and neck squamous cell carcinomas. **Cancer Res** 1996; 56:5325-9.

Bodner SM, Minna JD, Jensen SM, et al. Expression of mutant p53 proteins in lung cancer correlates with the class of p53 gene mutation. **Oncogene** 1992; 7:743-9.

Boelens MC, Kok K, van der Vlies P, et al. Genomic aberrations in squamous cell lung carcinoma related to lymph node or distant metastasis. **Lung Cancer** 2009; 66:372-8.

Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **J Clin Pathol** 2002; 55:244-65.

Bova GS, Carter BS, Bussemakers MJ, et al. Homozygous deletion and frequent allelic loss of chromosome 8p22 loci in human prostate cancer. **Cancer Res** 1993; 53:3869-73.

Braakhuis BJ, Snijders PJ, Keune WJ, et al. Genetic patterns in head and neck cancers that contain or lack transcriptionally active human papillomavirus. **J Natl Cancer Inst** 2004; 96:998-1006.

Brentani RR, Carraro DM, Verjovski-Almeida S, et al. Gene expression arrays in cancer research: methods and applications. **Crit Rev Oncol Hematol** 2005; 54:95-105.

Brinton LA, Li JY, Rong SD, et al. Risk factors for penile cancer: results from a case-control study in China. **Int J Cancer** 1991; 47:504-9.

Calmon MF, Tasso Mota M, Vassallo J, Rahal P. Penile carcinoma: risk factors and molecular alterations. **ScientificWorldJournal** 2011; 11:269-82.

Campos RS, Lopes A, Guimarães GC, Carvalho AL, Soares FA. E-cadherin, MMP-2, and MMP-9 as prognostic markers in penile cancer: analysis of 125 patients. **Urology** 2006; 67:797-802.

Castonguay A, Tjälve H, Hecht SS. Tissue distribution of the tobacco-specific carcinogen 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and its metabolites in F344 rats. **Cancer Res** 1983; 43:630-8.

Chang H, Stewart AK, Qi XY, Li ZH, Yi QL, Trudel S. Immunohistochemistry accurately predicts FGFR3 aberrant expression and t(4;14) in multiple myeloma. **Blood** 2005; 106:353-5.

Cher ML, Bova GS, Moore DH, et al. Genetic alterations in untreated metastases and androgen-independent prostate cancer detected by comparative genomic hybridization and allelotyping. **Cancer Res** 1996; 56:3091-102.

Chin K, DeVries S, Fridlyand J, et al. Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiologies. **Cancer Cell** 2006; 10:529-41.

Choschick M, Lassen P, Lebeau A, et al. Amplification of 8q21 in breast cancer is independent of MYC and associated with poor patient outcome. **Mod Pathol** 2010; 23:603-10.

Coffelt SB, Lewis CE, Naldini L, Brown JM, Ferrara N, De Palma M. Elusive identities and overlapping phenotypes of proangiogenic myeloid cells in tumors. **Am J Pathol** 2010; 176:1564-76.

Costa FF. Non-coding RNAs: Meet thy masters. **Bioessays** 2010; 32:599-608.

Cubilla AL, Reuter VE, Gregoire L, et al. Basaloid squamous cell carcinoma: a distinctive human papilloma virus-related penile neoplasm: a report of 20 cases. **Am J Surg Pathol** 1998; 22:755-61.

Cubilla AL, Velazquez EF, Young RH. Epithelial lesions associated with invasive penile squamous cell carcinoma: a pathologic study of 288 cases. **Int J Surg Pathol** 2004; 12:351-64.

Dahlgren L, Mellin H, Wangsa D, et al. Comparative genomic hybridization analysis of tonsillar cancer reveals a different pattern of genomic imbalances in human papillomavirus-positive and -negative tumors. **Int J Cancer** 2003; 107:244-9.

Dai B, Ye DW, Kong YY, Yao XD, Zhang HL, Shen YJ. Predicting regional lymph node metastasis in Chinese patients with penile squamous cell carcinoma: the role of histopathological classification, tumor stage and depth of invasion. **J Urol** 2006; 176:1431-5.

Daling JR, Madeleine MM, Johnson LG, et al. Penile cancer: importance of circumcision, human papillomavirus and smoking in in situ and invasive disease. **Int J Cancer** 2005; 116:606-16.

Daling JR, Sherman KJ, Hislop TG, et al. Cigarette smoking and the risk of anogenital cancer. **Am J Epidemiol** 1992; 135:180-9.

Dall KL, Scarpini CG, Roberts I, et al. Characterization of naturally occurring HPV16 integration sites isolated from cervical keratinocytes under noncompetitive conditions. **Cancer Res** 2008; 68:8249-59.

Dang CV. MYC on the path to cancer. **Cell** 2012; 149:22-35.

Danner BC, Hellms T, Jung K, et al. Prognostic value of chromosomal imbalances in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung. **Ann Thorac Surg** 2011; 92:1038-43.

de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. **J Gen Virol** 1995; 76:1057-62.

de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. **Virology** 2004; 324:17-27.

Delahunt B, Bethwaite PB, Thornton A, Ribas JL. Proliferation of renal cell carcinoma assessed by fixation-resistant polyclonal Ki-67 antibody labeling. Correlation with clinical outcome. **Cancer** 1995; 75:2714-9.

Delattre O, Zucman J, Plougastel B, et al. Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. **Nature** 1992; 359:162-5.

Delvenne P, al-Saleh W, Gilles C, Thiry A, Boniver J. Inhibition of growth of normal and human papillomavirus-transformed keratinocytes in monolayer and organotypic cultures by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. **Am J Pathol** 1995; 146:589-98.

Demeter LM, Stoler MH, Bonnez W, et al. Penile intraepithelial neoplasia: clinical presentation and an analysis of the physical state of human papillomavirus DNA. **J Infect Dis** 1993; 168:38-46.

Dianzani C, Bucci M, Pierangeli A, Calvieri S, Degener AM. Association of human papillomavirus type 11 with carcinoma of the penis. **Urology** 1998; 51:1046-8.

Dillner J, von Krogh G, Horenblas S, Meijer CJ. Etiology of squamous cell carcinoma of the penis. **Scand J Urol Nephrol Suppl** 2000; 205:189-93.

Dimova I, Orsetti B, Negre V, et al. Genomic markers for ovarian cancer at chromosomes 1, 8 and 17 revealed by array CGH analysis. **Tumori** 2009; 95:357-66.

Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. **Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs**. Lyon: IARC Press; 2004. (IARC WHO Classification of Tumours, n° 7).

Edelmann W, Yang K, Umar A, et al. Mutation in the mismatch repair gene Msh6 causes cancer susceptibility. **Cell** 1997; 91:467-77.

Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. **Dev Cell** 2010; 18:884-901.

Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:161-74.

Eguchi S, Yamamoto Y, Sakano S, et al. The loss of 8p23.3 is a novel marker for predicting progression and recurrence of bladder tumors without muscle invasion. **Cancer Genet Cytogenet** 2010; 200:16-22.

Ehrhardt H, Fulda S, Schmid I, Hiscott J, Debatin KM, Jeremias I. TRAIL induced survival and proliferation in cancer cells resistant towards TRAIL-induced apoptosis mediated by NF-kappaB. **Oncogene** 2003; 22:3842-52.

Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1998; 95:14863-8.

Eklund C, Zhou T, Dillner J, et al. Global proficiency study of human papillomavirus genotyping. **J Clin Microbiol** 2010; 48:4147-55.

Emmert-Buck MR, Vocke CD, Pozzatti RO, et al. Allelic loss on chromosome 8p12-21 in microdissected prostatic intraepithelial neoplasia. **Cancer Res** 1995; 55:2959-62.

Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. **Nat Rev Cancer** 2006; 6:259-69.

Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. **Cancer Res** 1999; 59:793-7.

Favorito LA, Nardi AC, Ronalsa M, Zequi SC, Sampaio FJ, Glina S. Epidemiologic study on penile cancer in Brazil. **Int Braz J Urol** 2008; 34:587-91.

Ferreux E, Lont AP, Horenblas S, et al. Evidence for at least three alternative mechanisms targeting the p16INK4A/cyclin D/Rb pathway in penile carcinoma, one of which is mediated by high-risk human papillomavirus. **J Pathol** 2003; 201:109-18.

Ficarra V, Zattoni F, Cunico SC, et al. Lymphatic and vascular embolizations are independent predictive variables of inguinal lymph node involvement in patients with squamous cell carcinoma of the penis: Gruppo Uro-Oncologico del Nord Est (Northeast Uro-Oncological Group) Penile Cancer data base data. **Cancer** 2005; 103:2507-16.

Fife KH, Cramer HM, Schroeder JM, Brown DR. Detection of multiple human papillomavirus types in the lower genital tract correlates with cervical dysplasia. **J Med Virol** 2001; 64:550-9.

Filipowicz W, Pogacić V. Biogenesis of small nucleolar ribonucleoproteins. **Curr Opin Cell Biol.** 2002; 14:319-27.

Firestein R, Cleary ML. Pseudo-phosphatase Sbf1 contains an N-terminal GEF homology domain that modulates its growth regulatory properties. **J Cell Sci** 2001; 114:2921-7.

Fogarty MP, Emmenegger BA, Grasdeder LL, Oliver TG, Wechsler-Reya RJ. Fibroblast growth factor blocks Sonic hedgehog signaling in neuronal precursors and tumor cells. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2007; 104:2973-8.

Freier K, Schwaenen C, Sticht C, et al. Recurrent FGFR1 amplification and high FGFR1 protein expression in oral squamous cell carcinoma (OSCC). **Oral Oncol** 2007; 43:60-6.

Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. **Genes Dev** 1997; 11:2090-100.

Galbiati F, Volonte D, Engelman JA, et al. Targeted downregulation of caveolin-1 is sufficient to drive cell transformation and hyperactivate the p42/44 MAP kinase cascade. **EMBO J** 1998; 17:6633-48.

Gargiulo F, De Francesco MA, Schreiber C, et al. Prevalence and distribution of single and multiple HPV infections in cytologically abnormal cervical samples from Italian women. **Virus Res** 2007; 125:176-82.

Gartside MG, Chen H, Ibrahimi OA, et al. Loss-of-function fibroblast growth factor receptor-2 mutations in melanoma. **Mol Cancer Res** 2009; 7:41-54.

Gentile V, Vicini P, Giacomelli L, Cardillo MR, Pierangeli A, Degener AM. Detection of human papillomavirus DNA, p53 and ki67 expression in penile carcinomas. **Int J Immunopathol Pharmacol** 2006; 19:209-15.

Gibb EA, Brown CJ, Lam WL. The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas. **Mol Cancer** 2011; 10:38.

Giri D, Ropiquet F, Ittmann M. Alterations in expression of basic fibroblast growth factor (FGF) 2 and its receptor FGFR-1 in human prostate cancer. **Clin Cancer Res** 1999; 5:1063-71.

Goel TC, Singh B. Carcinoma-penis in muslims. **Ind Med Gaz** 1977; 57: 202-4.

Golijanin D, Tan JY, Kazior A, et al. Cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase-1 are overexpressed in squamous cell carcinoma of the penis. **Clin Cancer Res** 2004; 10:1024-31.

Greenberg RE. Surgical management of carcinoma of the penis. **Urol Clin North Am** 2010; 37:369-78.

Gregoire L, Cubilla AL, Reuter VE, Haas GP, Lancaster WD. Preferential association of human papillomavirus with high-grade histologic variants of penile-invasive squamous cell carcinoma. **J Natl Cancer Inst** 1995; 87:1705-9.

Gross G, Pfister H. Role of human papillomavirus in penile cancer, penile intraepithelial squamous cell neoplasias and in genital warts. **Med Microbiol Immunol** 2004; 193:35-44.

Grosshans HB, Filipowicz W. Molecular biology: the expanding world of small RNAs. **Nature** 2008; 451:414-6.

Grossman HB. Premalignant and early carcinomas of the penis and scrotum. **Urol Clin North Am** 1992; 19:221-6.

Guerrero D, Guarch R, Ojer A, et al. Hypermethylation of the thrombospondin-1 gene is associated with poor prognosis in penile squamous cell carcinoma. **BJU Int** 2008; 102:747-55.

Guimarães GC, Lopes A, Campos RS, et al. Front pattern of invasion in squamous cell carcinoma of the penis: new prognostic factor for predicting risk of lymph node metastases. **Urology** 2006; 68:148-53.

Guimarães GC, Rocha RM, Zequi SC, Cunha IW, Soares FA. Penile cancer: epidemiology and treatment. **Curr Oncol Rep** 2011; 13:231-9.

Guo Y, Kyprianou N. Overexpression of transforming growth factor (TGF) beta1 type II receptor restores TGF-beta1 sensitivity and signaling in human prostate cancer cells. **Cell Growth Differ** 1998; 9:185-93.

Hainaut P, Wiman KG. 30 years and a long way into p53 research. **Lancet Oncol** 2009; 10:913-9.

Halder SK, Beauchamp RD, Datta PK. A specific inhibitor of TGF-beta receptor kinase, SB-431542, as a potent antitumor agent for human cancers. **Neoplasia** 2005; 7:509-21.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**. 2011; 144:646-74.

Hankins GR, Sasaki T, Lieu AS, et al. Identification of the deleted in liver cancer 1 gene, DLC1, as a candidate meningioma tumor suppressor. **Neurosurgery** 2008; 63:771-80.

Hartwig S, Syrjänen S, Dominiak-Felden G, Brotons M, Castellsagué X. Estimation of the epidemiological burden of human papillomavirus-related cancers and non-malignant diseases in men in Europe: a review. **BMC Cancer** 2012; 12:30.

Heideman DA, Waterboer T, Pawlita M, et al. Human papillomavirus-16 is the predominant type etiologically involved in penile squamous cell carcinoma. **J Clin Oncol** 2007; 25:4550-6.

Hellberg D, Valentin J, Eklund T, Nilsson S. Penile cancer: is there an epidemiological role for smoking and sexual behaviour? **Br Med J (Clin Res Ed)** 1987; 295:1306-8.

Herdman MT, Pett MR, Roberts I, et al. Interferon-beta treatment of cervical keratinocytes naturally infected with human papillomavirus 16 episomes promotes rapid reduction in episome numbers and emergence of latent integrants. **Carcinogenesis** 2006; 27:2341-53.

Hermeking H. The MYC oncogene as a cancer drug target. **Curr Cancer Drug Targets** 2003; 3:163-75. Review.

Heselmeyer K, Schröck E, du Manoir S, et al. Gain of chromosome 3q defines the transition from severe dysplasia to invasive carcinoma of the uterine cervix. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1996; 93:479-84.

Heselmeyer K, Macville M, Schröck E, et al. Advanced-stage cervical carcinomas are defined by a recurrent pattern of chromosomal aberrations revealing high genetic instability and a consistent gain of chromosome arm 3q. **Genes Chromosomes Cancer** 1997; 19:233-40.

Hewish M, Lord CJ, Martin SA, Cunningham D, Ashworth A. Mismatch repair deficient colorectal cancer in the era of personalized treatment. **Nat Rev Clin Oncol** 2010; 7:197-208.

Hillman RJ, Giuliano AR, Palefsky JM, et al. Immunogenicity of the quadrivalent human papillomavirus (type 6/11/16/18) vaccine in males 16 to 26 years old. **Clin Vaccine Immunol** 2012; 19:261-7.

Hirohashi S, Kanai Y. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. **Cancer Sci** 2003; 94:575-81.

Hirose T, Shu MD, Steitz JA. Splicing-dependent and -independent modes of assembly for intron-encoded box C/D snoRNPs in mammalian cells. **Mol Cell** 2003; 12:113-23.

Hnasko R, Lisanti MP. The biology of caveolae: lessons from caveolin knockout mice and implications for human disease. **Mol Interv** 2003; 3:445-64.

Horenblas S, van Tinteren H, Delemarre JF, et al. Squamous cell carcinoma of the penis. III. Treatment of regional lymph nodes. **J Urol** 1993; 149:492-7.

Hu PP, Datto MB, Wang XF. Molecular mechanisms of transforming growth factor-beta signaling. **Endocr Rev** 1998; 19:349-63.

Huang H, Regan KM, Lou Z, Chen J, Tindall DJ. CDK2-dependent phosphorylation of FOXO1 as an apoptotic response to DNA damage. **Science** 2006; 314:294-7.

Hunter S, Gramlich T, Abbott K, Varma V. Y chromosome loss in esophageal carcinoma: an in situ hybridization study. **Genes Chromosomes Cancer** 1993; 8:172-7.

Hüttenhofer A, Brosius J, Bachellerie JP. RNomics: identification and function of small, non-messenger RNAs. **Curr Opin Chem Biol** 2002; 6:835-43.

[IARC] International Agency for Research on Cancer. **A review of human carcinogens. Part B: biological agents.** Lyon: IARC; 2009.

Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. **Nat Cell Biol** 2002; 4:648-57.

Ishimura N, Isomoto H, Bronk SF, Gores GJ. Trail induces cell migration and invasion in apoptosis-resistant cholangiocarcinoma cells. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 2006; 290:G129-36.

Ishkanian AS, Malloff CA, Ho J, et al. High-resolution array CGH identifies novel regions of genomic alteration in intermediate-risk prostate cancer. **Prostate** 2009; 69:1091-100.

Isinger-Ekstrand A, Johansson J, Ohlsson M, et al. Genetic profiles of gastroesophageal cancer: combined analysis using expression array and tiling array--comparative genomic hybridization. **Cancer Genet Cytogenet** 2010; 200:120-6.

Jacinto E, Facchinetti V, Liu D, et al. SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. **Cell** 2006; 127:125-37.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. **CA Cancer J Clin** 2007; 57:43-66.

Jeon S, Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1995; 92:1654-8.

Jin Y, Mertens F, Mandahl N, et al. Chromosome abnormalities in eighty-three head and neck squamous cell carcinomas: influence of culture conditions on karyotypic pattern. **Cancer Res** 1993; 53:2140-6.

Joos S, Bergerheim US, Pan Y, et al. Mapping of chromosomal gains and losses in prostate cancer by comparative genomic hybridization. **Genes Chromosomes Cancer** 1995; 14:267-76.

Jung AC, Briolat J, Millon R, et al. Biological and clinical relevance of transcriptionally active human papillomavirus (HPV) infection in oropharynx squamous cell carcinoma. **Int J Cancer** 2010; 126:1882-94.

Kadyrov FA, Dzantiev L, Constantin N, Modrich P. Endonucleolytic function of MutLalpha in human mismatch repair. **Cell** 2006; 126:297-308.

Kalantari M, Blennow E, Hagmar B, Johansson B. Physical state of HPV16 and chromosomal mapping of the integrated form in cervical carcinomas. **Diagn Mol Pathol** 2001; 10:46-54.

Kamil M. Analysis of current tools available for microrna target prediction. **IJEIT** 2012; 2:70-4.

Kanao H, Enomoto T, Kimura T, et al. Overexpression of LAMP3/TSC403/DC-LAMP promotes metastasis in uterine cervical cancer. **Cancer Res** 2005; 65:8640-5.

Karin M. Too many transcription factors: positive and negative interactions. **New Biol** 1990; 2:126-31.

Katballe N, Christensen M, Wikman FP, Ørntoft TF, Laurberg S. Frequency of hereditary non-polyposis colorectal cancer in Danish colorectal cancer patients. **Gut** 2002; 50:43-51.

Keshamouni VG, Reddy RC, Arenberg DA, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation inhibits tumor progression in non-small-cell lung cancer. **Oncogene** 2004; 23:100-8.

Kim KY, Blatt L, Taylor MW. The effects of interferon on the expression of human papillomavirus oncogenes. **J Gen Virol** 2000; 81:695-700.

Kim MY, Hur J, Jeong S. Emerging roles of RNA and RNA-binding protein network in cancer cells. **BMB Rep** 2009; 42:125-30.

Kim TY, Jong HS, Song SH, et al. Transcriptional silencing of the DLC-1 tumor suppressor gene by epigenetic mechanism in gastric cancer cells. **Oncogene** 2003; 22:3943-51.

Kleeff J, Ishiwata T, Maruyama H, et al. The TGF-beta signaling inhibitor Smad7 enhances tumorigenicity in pancreatic cancer. **Oncogene** 1999; 18:5363-72.

Klussmann JP, Mooren JJ, Lehnen M, et al. Genetic signatures of HPV-related and unrelated oropharyngeal carcinoma and their prognostic implications. **Clin Cancer Res** 2009; 15:1779-86.

Koh CM, Bieberich CJ, Dang CV, Nelson WG, Yegnasubramanian S, De Marzo AM. MYC and Prostate Cancer. **Genes Cancer** 2010; 1:617-28.

Koifman L, Vides AJ, Koifman N, Carvalho JP, Ornellas AA. Epidemiological aspects of penile cancer in Rio de Janeiro: evaluation of 230 cases. **Int Braz J Urol** 2011; 37:231-40.

König JJ, Teubel W, van Dongen JW, Romijn JC, Hagemeyer A, Schröder FH. Loss and gain of chromosomes 1, 18, and Y in prostate cancer. **Prostate** 1994; 25:281-91.

Kordi-Tamandani DM, Moazeni-Roodi AK, Rigi-Ladiz MA, Hashemi M, Birjandian E, Torkamanzahi A. Promoter hypermethylation and expression profile of MGMT and CDH1 genes in oral cavity cancer. **Arch Oral Biol** 2010; 55:809-14.

Kroon BK, Leijte JA, van Boven H, et al. Microarray gene-expression profiling to predict lymph node metastasis in penile carcinoma. **BJU Int** 2008; 102:510-5.

Kuasne H. **Perfil de metilação em amostras de câncer de pênis**. Londrina; 2013. [Tese de Doutorado-Universidade Estadual de Londrina].

Kubo M, Czuwara-Ladykowska J, Moussa O, et al. Persistent down-regulation of Fli1, a suppressor of collagen transcription, in fibrotic scleroderma skin. **Am J Pathol** 2003; 163:571-81.

Kunkel TA, Erie DA. DNA mismatch repair. **Annu Rev Biochem** 2005; 74:681-710.

Laloo F, Varley J, Ellis D, et al. Prediction of pathogenic mutations in patients with early-onset breast cancer by family history. **Lancet** 2003; 361:1101-2.

Lam KY, Chan AC, Chan KW, Leung ML, Srivastava G. Expression of p53 and its relationship with human papillomavirus in penile carcinomas. **Eur J Surg Oncol** 1995; 21:613-6.

Lam KY, Chan KW. Molecular pathology and clinicopathologic features of penile tumors: with special reference to analyses of p21 and p53 expression and unusual histologic features. **Arch Pathol Lab Med** 1999; 123:895-904.

Lee BB, Lee EJ, Jung EH, et al. Aberrant methylation of APC, MGMT, RASSF2A, and Wif-1 genes in plasma as a biomarker for early detection of colorectal cancer. **Clin Cancer Res** 2009; 15:6185-91.

Lee KH, Lee JS, Nam JH, et al. Promoter methylation status of hMLH1, hMSH2, and MGMT genes in colorectal cancer associated with adenoma-carcinoma sequence. **Langenbecks Arch Surg** 2011; 396:1017-26.

Leijte JA, Kirrander P, Antonini N, Windahl T, Horenblas S. Recurrence patterns of squamous cell carcinoma of the penis: recommendations for follow-up based on a two-centre analysis of 700 patients. **Eur Urol** 2008; 54:161-8.

Leis PF, Stevens KR, Baer SC, Kadmon D, Goldberg LH, Wang XJ. A c-rasHa mutation in the metastasis of a human papillomavirus (HPV)-18 positive penile squamous cell carcinoma suggests a cooperative effect between HPV-18 and c-rasHa activation in malignant progression. **Cancer** 1998; 83:122-9.

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. **Nature** 1998; 396:643-9.

Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. **Cell** 1997; 88:323-31.

Licklider S. Jewish penile carcinoma. **J Urol** 1961; 86:98.

Liehr T, Ries J, Wolff E, et al. Gain of DNA copy number on chromosomes 3q26-pter and 5p14-pter is a frequent finding in head and neck squamous cell carcinomas. **Int J Mol Med** 1998; 2:173-9.

Lin Y, Devin A, Cook A, Keane MM, Kelliher M, Lipkowitz S, Liu ZG. The death domain kinase RIP is essential for TRAIL (Apo2L)-induced activation of IkappaB kinase and c-Jun N-terminal kinase. **Mol Cell Biol** 2000; 20:6638-45.

Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, et al. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. **Nature** 1980; 284:67-8.

Liu Y, Lan Q, Siegfried JM, Luketich JD, Keohavong P. Aberrant promoter methylation of p16 and MGMT genes in lung tumors from smoking and never-smoking lung cancer patients. **Neoplasia** 2006; 8:46-51.

Lo KC, Rossi MR, Burkhardt T, Pomeroy SL, Cowell JK. Overlay analysis of the oligonucleotide array gene expression profiles and copy number abnormalities as determined by array comparative genomic hybridization in medulloblastomas. **Genes Chromosomes Cancer** 2007; 46:53-66.

Lo KC, Stein LC, Panzarella JA, Cowell JK, Hawthorn L. Identification of genes involved in squamous cell carcinoma of the lung using synchronized data from DNA copy number and transcript expression profiling analysis. **Lung Cancer** 2008; 59:315-31.

Lockwood WW, Coe BP, Williams AC, MacAulay C, Lam WL. Whole genome tiling path array CGH analysis of segmental copy number alterations in cervical cancer cell lines. **Int J Cancer** 2007; 120:436-43

Lont AP, Kroon BK, Horenblas S, et al. Presence of high-risk human papillomavirus DNA in penile carcinoma predicts favorable outcome in survival. **Int J Cancer** 2006; 119:1078-81.

Lopes A, Hidalgo GS, Kowalski LP, Torloni H, Rossi BM, Fonseca FP. Prognostic factors in carcinoma of the penis: multivariate analysis of 145 patients treated with amputation and lymphadenectomy. **J Urol** 1996; 156:1637-42.

Lopes A, Bezerra AL, Pinto CA, Serrano SV, de Mello CA, Villa LL. p53 as a new prognostic factor for lymph node metastasis in penile carcinoma: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy. **J Urol** 2002; 168:81-6.

Lu B, Viscidi RP, Lee JH, et al. Human papillomavirus (HPV) 6, 11, 16, and 18 seroprevalence is associated with sexual practice and age: results from the multinational HPV Infection in Men Study (HIM Study). **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2011; 20:990-1002.

Lu TP, Lai LC, Tsai MH, et al. Integrated analyses of copy number variations and gene expression in lung adenocarcinoma. **PLoS One** 2011; 6:e24829.

Lukusa T, Fryns JP. Human chromosome fragility. **Biochim Biophys Acta** 2008; 1779:3-16.

Maden C, Sherman KJ, Beckmann AM, et al. History of circumcision, medical conditions, and sexual activity and risk of penile cancer. **J Natl Cancer Inst** 1993; 85:19-24.

Madeo A, Vinciguerra M, Lappano R, et al. c-Jun activation is required for 4-hydroxytamoxifen-induced cell death in breast cancer cells. **Oncogene** 2010; 29:978-91.

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. **Cell** 1995; 83:835-9.

Markowitz LE, Dunne EF, Saraiya M, Lawson HW, Chesson H, Unger ER. Quadrivalent human papillomavirus vaccine: recommendations of the advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **MMWR Recomm Rep** 2007; 56:1-24.

Markowitz S, Wang J, Myeroff L, et al. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. **Science** 1995; 268:1336-8.

Martin SA, Lord CJ, Ashworth A. Therapeutic targeting of the DNA mismatch repair pathway. **Clin Cancer Res** 2010; 16:5107-13.

Martins AC, Faria SM, Cologna AJ, Suaid HJ, Tucci S Jr. Immunoexpression of p53 protein and proliferating cell nuclear antigen in penile carcinoma. **J Urol** 2002; 167:89-92; discussion 92-3.

Masferrer E, Ferrándiz-Pulido C, Lloveras B, et al. MYC copy number gains are associated with poor outcome in penile squamous cell carcinoma. **J Urol** 2012; 188:1965-71.

Micali G, Nasca MR, Innocenzi D, Schwartz RA. Penile cancer. **J Am Acad Dermatol** 2006; 54:369-91; quiz 391-4.

Miralles-Guri C, Bruni L, Cubilla AL, Castellsagué X, Bosch FX, de Sanjosé S. Human papillomavirus prevalence and type distribution in penile carcinoma. **J Clin Pathol** 2009; 62:870-8.

Misra S, Chaturvedi A, Misra NC. Penile carcinoma: a challenge for the developing world. **Lancet Oncol** 2004; 5:240-7.

Momparler RL, Bovenzi V. DNA methylation and cancer. **J Cell Physiol** 2000; 183:145-54.

Mosconi AM, Roila F, Gatta G, Theodore C. Cancer of the penis. **Crit Rev Oncol Hematol** 2005; 53:165-77.

Muñoz JJA. **Análise de micro-RNAs reguladores de membros da família de transportadores SLC e de seus genes alvo em carcinomas de pênis**. São Paulo; 2011. [Dissertação de Mestrado - Fundação Antônio Prudente].

Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **N Engl J Med** 2003; 348:518-27.

Munro AJ, Lain S, Lane DP. P53 abnormalities and outcomes in colorectal cancer: a systematic review. **Br J Cancer** 2005; 92:434-44.

Nagelkerke A, Mujcic H, Bussink J, et al. Hypoxic regulation and prognostic value of LAMP3 expression in breast cancer. **Cancer** 2011; 117:3670-81.

Nakerakanti SS, Kapanadze B, Yamasaki M, Markiewicz M, Trojanowska M. Fli1 and Ets1 have distinct roles in connective tissue growth factor/CCN2 gene regulation and induction of the profibrotic gene program. **J Biol Chem** 2006; 281:25259-69.

Natrajan R, Weigelt B, Mackay A, et al. An integrative genomic and transcriptomic analysis reveals molecular pathways and networks regulated by copy number aberrations in basal-like, HER2 and luminal cancers. **Breast Cancer Res Treat** 2010; 121:575-89.

Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, et al. Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. **Nature** 1994; 371:75-80.

Novara G, Galfano A, De Marco V, Artibani W, Ficarra V. Prognostic factors in squamous cell carcinoma of the penis. **Nat Clin Pract Urol** 2007; 4:140-6.

Nowell PC. Genetic alterations in leukemias and lymphomas: impressive progress and continuing complexity. **Cancer Genet Cytogenet** 1997; 94:13-9.

Ozaki K, Nagata M, Suzuki M, et al. Isolation and characterization of a novel human lung-specific gene homologous to lysosomal membrane glycoproteins 1 and 2: significantly increased expression in cancers of various tissues. **Cancer Res** 1998; 58:3499-503.

Paik JH, Kollipara R, Chu G, et al. FoxOs are lineage-restricted redundant tumor suppressors and regulate endothelial cell homeostasis. **Cell** 2007; 128:309-23.

Panda K, Nayak CR. Clinicopathological studies on cancer penis (a review of 120 cases). **J Indian Med Assoc** 1980; 75:25-8.

Pandey D, Mahajan V, Kannan RR. Prognostic factors in node-positive carcinoma of the penis. **J Surg Oncol** 2006; 93:133-8.

Pang KC, Frith MC, Mattick JS. Rapid evolution of noncoding RNAs: lack of conservation does not mean lack of function. **Trends Genet** 2006; 22:1-5.

Pascale A, Govoni S. The complex world of post-transcriptional mechanisms: is their deregulation a common link for diseases? Focus on ELAV-like RNA-binding proteins. **Cell Mol Life Sci** 2012; 69:501-17.

Pascual A, Pariente M, Godínez JM, et al. High prevalence of human papillomavirus 16 in penile carcinoma. **Histol Histopathol** 2007; 22:177-83.

Pegg AE. Repair of O(6)-alkylguanine by alkyltransferases. **Mutat Res** 2000; 462:83-100.

Pereira R, Quang CT, Lesault I, Dolznig H, Beug H, Ghysdael J. FLI-1 inhibits differentiation and induces proliferation of primary erythroblasts. **Oncogene** 1999; 18:1597-608.

Peter M, Rosty C, Couturier J, Radvanyi F, Teshima H, Sastre-Garau X. MYC activation associated with the integration of HPV DNA at the MYC locus in genital tumors. **Oncogene** 2006; 25:5985-93.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res** 2001; 29:e45.

Pho L, Grossman D, Leachman SA. Melanoma genetics: a review of genetic factors and clinical phenotypes in familial melanoma. **Curr Opin Oncol** 2006; 18:173-9.

Pizzocaro G, Algaba F, Horenblas S, et al. European Association of Urology (EAU) Guidelines Group on Penile Cancer. EAU penile cancer guidelines 2009. **Eur Urol** 2010; 57:1002-12.

Plaumann M, Seitz S, Frege R, Estevez-Schwarz L, Scherneck S. Analysis of DLC-1 expression in human breast cancer. **J Cancer Res Clin Oncol** 2003; 129:349-54.

Poetsch M, Kleist B, Lorenz G, Herrmann FH. Different numerical chromosomal aberrations detected by FISH in oropharyngeal, hypopharyngeal and laryngeal squamous cell carcinoma. **Histopathology** 1999; 34:234-40.

Poetsch M, Schuart BJ, Schwesinger G, Kleist B, Protzel C. Screening of microsatellite markers in penile cancer reveals differences between metastatic and nonmetastatic carcinomas. **Mod Pathol** 2007; 20:1069-77.

Pole JC, Courty-Cahen C, Garcia MJ, et al. High-resolution analysis of chromosome rearrangements on 8p in breast, colon and pancreatic cancer reveals a complex pattern of loss, gain and translocation. **Oncogene** 2006; 25:5693-706.

Poljak M. Review of 20 years of HPV research in Slovenia. **Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat** 2011; 20:99-112.

Pow-Sang JE, Benavente V, Pow-Sang JM, Pow-Sang M. Bilateral ilioinguinal lymph node dissection in the management of cancer of the penis. **Semin Surg Oncol** 1990; 6:241-2.

Pow-Sang MR, Ferreira U, Pow-Sang JM, Nardi AC, Destefano V. Epidemiology and natural history of penile cancer. **Urology** 2010; 76:S2-6.

Protzel C, Knoedel J, Zimmermann U, Woenckhaus C, Poetsch M, Giebel J. Expression of proliferation marker Ki67 correlates to occurrence of metastasis and prognosis, histological subtypes and HPV DNA detection in penile carcinomas. **Histol Histopathol** 2007; 22:1197-204.

Protzel C, Kakies C, Kleist B, Poetsch M, Giebel J. Down-regulation of the metastasis suppressor protein KAI1/CD82 correlates with occurrence of metastasis, prognosis and presence of HPV DNA in human penile squamous cell carcinoma. **Virchows Arch** 2008; 452:369-75.

Qian X, Durkin ME, Wang D, et al. Inactivation of the Dlc1 gene cooperates with downregulation of p15INK4b and p16Ink4a, leading to neoplastic transformation and poor prognosis in human cancer. **Cancer Res** 2012; 72:5900-11.

Qin YR, Fu L, Sham PC, et al. Single-nucleotide polymorphism-mass array reveals commonly deleted regions at 3p22 and 3p14.2 associate with poor clinical outcome in esophageal squamous cell carcinoma. **Int J Cancer** 2008; 123:826-30.

Redon R, Muller D, Caulee K, Wanherdrick K, Abecassis J, du Manoir S. A simple specific pattern of chromosomal aberrations at early stages of head and neck squamous cell carcinomas: PIK3CA but not p63 gene as a likely target of 3q26-qter gains. **Cancer Res** 2001; 61:4122-9.

Reisinger KS, Block SL, Lazcano-Ponce E, et al. Safety and persistent immunogenicity of a quadrivalent human papillomavirus types 6, 11, 16, 18 L1 virus-like particle vaccine in preadolescents and adolescents: a randomized controlled trial. **Pediatr Infect Dis J** 2007; 26:201-9.

Ricol D, Cappellen D, El Marjou A, et al. Tumour suppressive properties of fibroblast growth factor receptor 2-IIIb in human bladder cancer. **Oncogene** 1999; 18:7234-43.

Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2008; 9:402-12.

Roessler S, Long EL, Budhu A, et al. Integrative genomic identification of genes on 8p associated with hepatocellular carcinoma progression and patient survival. **Gastroenterology** 2012; 142:957-966.e12.

Rubin MA, Kleter B, Zhou M, et al. Detection and typing of human papillomavirus DNA in penile carcinoma: evidence for multiple independent pathways of penile carcinogenesis. **Am J Pathol** 2001; 159:1211-8.

Sadikovic B, Yoshimoto M, Al-Romaih K, Maire G, Zielenska M, Squire JA. In vitro analysis of integrated global high-resolution DNA methylation profiling with genomic imbalance and gene expression in osteosarcoma. **PLoS One** 2008; 3:e2834.

Saeed S, Keehn CA, Khalil FK, Morgan MB. Immunohistochemical expression of Bax and Bcl-2 in penile carcinoma. **Ann Clin Lab Sci** 2005; 35:91-6.

Salazar EL, Mercado E, Calzada L. Human papillomavirus hpv-16 DNA as a epitheliotropic virus that induces hyperproliferation in squamous penile tissue. **Arch Androl** 2005; 51:327-34.

Sarkar FH, Miles BJ, Plieth DH, Crissman JD. Detection of human papillomavirus in squamous neoplasm of the penis. **J Urol** 1992; 147:389-92.

Sasaki H, Tanahashi M, Yukiue H, et al. Decreased peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene expression was correlated with poor prognosis in patients with lung cancer. **Lung Cancer** 2002; 36:71-6.

Saslow D, Castle PE, Cox JT, et al. American Cancer Society Guideline for human papillomavirus (HPV) vaccine use to prevent cervical cancer and its precursors. **CA Cancer J Clin** 2007; 57:7-28.

Sasson IM, Haley NJ, Hoffmann D, Wynder EL, Hellberg D, Nilsson S. Cigarette smoking and neoplasia of the uterine cervix: smoke constituents in cervical mucus. **N Engl J Med** 1985; 312:315-6.

Satoh T, Toyoda M, Hoshino H, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma stimulates the growth arrest and DNA-damage inducible 153 gene in non-small cell lung carcinoma cells. **Oncogene** 2002; 21:2171-80.

Scheiner MA, Campos MM, Ornellas AA, Chin EW, Ornellas MH, Andrada-Serpa MJ. Human papillomavirus and penile cancers in Rio de Janeiro, Brazil: HPV typing and clinical features. **Int Braz J Urol** 2008; 34:467-74.

Schellhammer PF, Jordan GH, Robey EL, Spaulding JT. Premalignant lesions and nonsquamous malignancy of the penis and carcinoma of the scrotum. **Urol Clin North Am** 1992; 19:131-42.

Scholzová E, Malík R, Sevcík J, Kleibl Z. RNA regulation and cancer development. **Cancer Lett** 2007; 246:12-23.

Secchiero P, Gonelli A, Carnevale E, et al. TRAIL promotes the survival and proliferation of primary human vascular endothelial cells by activating the Akt and ERK pathways. **Circulation** 2003; 107:2250-6.

Seng TJ, Low JS, Li H, et al. The major 8p22 tumor suppressor DLC1 is frequently silenced by methylation in both endemic and sporadic nasopharyngeal, esophageal, and cervical carcinomas, and inhibits tumor cell colony formation. **Oncogene** 2007; 26:934-44.

Shaulian E, Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death. **Nat Cell Biol** 2002; 4:E131-6.

Shen B, Chu ES, Zhao G, et al. PPARgamma inhibits hepatocellular carcinoma metastases in vitro and in mice. **Br J Cancer** 2012; 106:1486-94.

Shen L, Kondo Y, Rosner GL, et al. MGMT promoter methylation and field defect in sporadic colorectal cancer. **J Natl Cancer Inst** 2005; 97:1330-8.

Sherr CJ. Principles of tumor suppression. **Cell** 2004; 116:235-46.

Sheu JJ, Lee CH, Ko JY, et al. Chromosome 3p12.3-p14.2 and 3q26.2-q26.32 are genomic markers for prognosis of advanced nasopharyngeal carcinoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2009; 18:2709-16.

Silveira CG, Oliveira FM, Valera ET, et al. New recurrent deletions in the PPARgamma and TP53 genes are associated with childhood myelodysplastic syndrome. **Leuk Res** 2009; 33:19-27.

Slebos RJ, Yi Y, Ely K, et al. Gene expression differences associated with human papillomavirus status in head and neck squamous cell carcinoma. **Clin Cancer Res** 2006; 12:701-9.

Smeets SJ, Braakhuis BJ, Abbas S, et al. Genome-wide DNA copy number alterations in head and neck squamous cell carcinomas with or without oncogene-expressing human papillomavirus. **Oncogene** 2006; 25:2558-64.

Smeets SJ, Brakenhoff RH, Ylstra B, et al. Genetic classification of oral and oropharyngeal carcinomas identifies subgroups with a different prognosis. **Cell Oncol** 2009; 31:291-300.

Smith-Sørensen B, Lind GE, Skotheim RI, et al. Frequent promoter hypermethylation of the O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT) gene in testicular cancer. **Oncogene** 2002; 21:8878-84.

Sobin L, Wittekind C. **TNM Classification of malignant tumours**. 6 ed. New York: Wiley-Liss; 2002. Pênis; p.187-9.

Soares FA, da Cunha IW, Guimarães GC, Nonogaki S, Campos RS, Lopes A. The expression of metalloproteinases-2 and -9 is different according to the patterns of growth and invasion in squamous cell carcinoma of the penis. **Virchows Arch** 2006; 449:637-46.

Sobel H, Plaut A. The assimilation of cholesterol by mycobacterium smegmatis. **J Bacteriol** 1949; 57:377-82.

Sobin L, Wittekind C. **TNM Classification of malignant tumours**. 6^a ed. New York: Wiley-Liss; 2002. Pênis; p.187-9.

Sparano A, Quesnelle KM, Kumar MS, et al. Genome-wide profiling of oral squamous cell carcinoma by array-based comparative genomic hybridization. **Laryngoscope** 2006; 116:735-41.

Stankiewicz E, Kudahetti SC, Prowse DM, et al. HPV infection and immunochemical detection of cell-cycle markers in verrucous carcinoma of the penis. **Mod Pathol** 2009; 22:1160-8.

Stankiewicz E, Prowse DM, Ktori E, et al. The retinoblastoma protein/p16 INK4A pathway but not p53 is disrupted by human papillomavirus in penile squamous cell carcinoma. **Histopathology** 2011a; 58:433-9.

Stankiewicz E, Prowse DM, Ng M, et al. Alternative HER/PTEN/Akt pathway activation in HPV positive and negative penile carcinomas. **PLoS One** 2011b; 6:e17517.

Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. **Gynecol Oncol** 2010; 117:S5-10.

Stone JF, Sandberg AA. Sex chromosome aneuploidy and aging. **Mutat Res** 1995; 338:107-13.

Storey JD, Tibshirani R. Statistical significance for genomewide studies. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2003; 100:9440-5.

Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. **Nature** 2009; 458:719-24.

Sun L, Wu G, Willson JK, et al. Expression of transforming growth factor beta type II receptor leads to reduced malignancy in human breast cancer MCF-7 cells. **J Biol Chem** 1994; 269:26449-55.

Szyfter K, Szmeja Z, Szyfter W, et al. Molecular and cellular alterations in tobacco smoke-associated larynx cancer. **Mutat Res** 1999; 445:259-74.

Takahashi Y, Kawate S, Watanabe M, Fukushima J, Mori S, Fukusato T. Amplification of c-myc and cyclin D1 genes in primary and metastatic carcinomas of the liver. **Pathol Int** 2007; 57:437-42.

Talbot SJ, Crawford DH. Viruses and tumours--an update. **Eur J Cancer** 2004; 40:1998-2005.

Tamir A, Howard J, Higgins RR, et al. Fli-1, an Ets-related transcription factor, regulates erythropoietin-induced erythroid proliferation and differentiation: evidence for direct transcriptional repression of the Rb gene during differentiation. **Mol Cell Biol** 1999; 19:4452-64.

Terashita Y, Sasaki H, Haruki N, et al. Decreased peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene expression is correlated with poor prognosis in patients with esophageal cancer. **Jpn J Clin Oncol** 2002; 32:238-43.

Todd R, Wong DT. Oncogenes. **Anticancer Res** 1999; 19:4729-46.

Toledo F, Wahl GM. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. **Nat Rev Cancer** 2006; 6:909-23.

Tsen HF, Morgenstern H, Mack T, Peters RK. Risk factors for penile cancer: results of a population-based case-control study in Los Angeles County (United States). **Cancer Causes Control** 2001; 12:267-77.

Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98:5116-21.

Tysnes BB, Mahesparan R. Biological mechanisms of glioma invasion and potential therapeutic targets. **J Neurooncol** 2001; 53:129-47.

Ullmannova V, Popescu NC. Expression profile of the tumor suppressor genes DLC-1 and DLC-2 in solid tumors. **Int J Oncol** 2006; 29:1127-32.

Umar A, Buermeyer AB, Simon JA, et al. Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis. **Cell** 1996; 87:65-73.

van Dekken H, Alers JC, Riegman PH, Rosenberg C, Tilanus HW, Vissers K. Molecular cytogenetic evaluation of gastric cardia adenocarcinoma and precursor lesions. **Am J Pathol** 2001; 158:1961-7.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol** 2002; 3:RESEARCH0034.

Varfolomeev E, Maecker H, Sharp D, et al. Molecular determinants of kinase pathway activation by Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. **J Biol Chem** 2005; 280:40599-608.

Veiga LC, Bérnago NA, Reis PP, Kowalski LP, Rogatto SR. Loss of Y-chromosome does not correlate with age at onset of head and neck carcinoma: a case-control study. **Braz J Med Biol Res** 2012; 45:172-8.

Vesikari T, Van Damme P, Lindblad N, et al. An open-label, randomized, multicenter study of the safety, tolerability, and immunogenicity of quadrivalent human papillomavirus (types 6/11/16/18) vaccine given concomitantly with diphtheria, tetanus, pertussis, and poliomyelitis vaccine in healthy adolescents 11 to 17 years of age. **Pediatr Infect Dis J** 2010; 29:314-8.

Virgin JB, Hurley PM, Nahhas FA, et al. Isochromosome 8q formation is associated with 8p loss of heterozygosity in a prostate cancer cell line. **Prostate** 1999; 41:49-57.

Visakorpi T, Kallioniemi AH, Syvänen AC, et al. Genetic changes in primary and recurrent prostate cancer by comparative genomic hybridization. **Cancer Res** 1995; 55:342-7.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. **Nature** 2000; 408:307-10.

Wadlow R, Ramaswamy S. DNA microarrays in clinical cancer research. **Curr Mol Med** 2005; 5:111-20.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J Pathol** 1999; 189:12-9.

Wang J, Kuitse I, Lee AV, Pan J, Giuliano A, Cui X. Sustained c-Jun-NH2-kinase activity promotes epithelial-mesenchymal transition, invasion, and survival of breast cancer cells by regulating extracellular signal-regulated kinase activation. **Mol Cancer Res** 2010; 8:266-77.

Wang J, Liu X, Wu H, et al. CREB up-regulates long non-coding RNA, HULC expression through interaction with microRNA-372 in liver cancer. **Nucleic Acids Res** 2010;38:5366-83.

Weng HY, Hsu MJ, Wang CC, et al. Zerumbone suppresses IKK α , Akt, and FOXO1 activation, resulting in apoptosis of GBM 8401 cells. **J Biomed Sci** 2012; 5;19:86.

Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. **Cancer Res** 2004; 64:3878-84.

Wesche J, Haglund K, Haugsten EM. Fibroblast growth factors and their receptors in cancer. **Biochem J** 2011; 437:199-213.

Whittemore AS, Gong G, John EM, et al. Prevalence of BRCA1 mutation carriers among U.S. non Hispanic Whites. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2004; 13:2078-83.

Wieland U, Jurk S, Weissenborn S, Krieg T, Pfister H, Ritzkowsky A. Erythroplasia of queyrat: coinfection with cutaneous carcinogenic human papillomavirus type 8 and genital papillomaviruses in a carcinoma in situ. **J Invest Dermatol** 2000; 115:396-401.

Wiener JS, Effert PJ, Humphrey PA, Yu L, Liu ET, Walther PJ. Prevalence of human papillomavirus types 16 and 18 in squamous-cell carcinoma of the penis: a retrospective analysis of primary and metastatic lesions by differential polymerase chain reaction. **Int J Cancer** 1992; 50:694-701.

Wiktor A, Rybicki BA, Piao ZS, et al. Clinical significance of Y chromosome loss in hematologic disease. **Genes Chromosomes Cancer** 2000; 27:11-6.

Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. **Immunity** 1995; 3:673-82.

Williams SE, Brown TI, Roghanian A, Sallenave JM. SLPI and elafin: one glove, many fingers. **Clin Sci (Lond)** 2006; 110:21-35.

Winkelstein W Jr. Smoking and cancer of the uterine cervix: hypothesis. **Am J Epidemiol** 1977; 106:257-9.

Wolff E, Girod S, Liehr T, et al. Oral squamous cell carcinomas are characterized by a rather uniform pattern of genomic imbalances detected by comparative genomic hybridisation. **Oral Oncol** 1998; 34:186-90.

Wong CM, Lee JM, Ching YP, Jin DY, Ng IO. Genetic and epigenetic alterations of DLC-1 gene in hepatocellular carcinoma. **Cancer Res** 2003; 63:7646-51.

Woo HG, Park ES, Lee JS, et al. Identification of potential driver genes in human liver carcinoma by genomewide screening. **Cancer Res** 2009; 69:4059-66.

Xue W, Krasnitz A, Lucito R, et al. DLC1 is a chromosome 8p tumor suppressor whose loss promotes hepatocellular carcinoma. **Genes Dev** 2008; 22:1439-44.

Yanagawa N, Osakabe M, Hayashi M, Tamura G, Motoyama T. Detection of HPV-DNA, p53 alterations, and methylation in penile squamous cell carcinoma in Japanese men. **Pathol Int** 2008; 58:477-82.

Yuan BZ, Durkin ME, Popescu NC. Promoter hypermethylation of DLC-1, a candidate tumor suppressor gene, in several common human cancers. **Cancer Genet Cytogenet** 2003; 140:113-7.

Yuan Z, Sun X, Liu H, Xie J. MicroRNA genes derived from repetitive elements and expanded by segmental duplication events in mammalian genomes. **PLoS One** 2011; 6:e17666.

Zequi SD, Guimarães GC, da Fonseca FP, et al. Sex with Animals (SWA): behavioral characteristics and possible association with penile cancer. a multicenter study. **J Sex Med** 2012; 9:1860-7.

Zhang P, Liu W, Zhang J, et al. Gene expression profiles in the PC-3 human prostate cancer cells induced by NKX3.1. **Mol Biol Rep** 2010; 37:1505-12.

Zhang T, Zheng J, Liu C, Lu Y. Expression of DLC-1 in clear cell renal cell carcinoma: prognostic significance for progression and metastasis. **Urol Int** 2009; 82:380-7.

Zhang Y, Wang H, Toratani S, et al. Growth inhibition by keratinocyte growth factor receptor of human salivary adenocarcinoma cells through induction of differentiation and apoptosis. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98:11336-40.

Zhang Y, Yuan F, Presnell SR, et al. Reconstitution of 5'-directed human mismatch repair in a purified system. **Cell** 2005; 122:693-705.

Zhou X, Thorgeirsson SS, Popescu NC. Restoration of DLC-1 gene expression induces apoptosis and inhibits both cell growth and tumorigenicity in human hepatocellular carcinoma cells. **Oncogene** 2004; 23:1308-13.

zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:342-50.

zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. **Virology** 2009; 384:260-5.



Anexo

Anexo 1 - Detalhe das metodologias aplicadas para a genotipagem do HPV e avaliação das alterações moleculares para cada amostra obtida no presente estudo (n=48)*.

Amostra	Histologia	Genotipagem HPV (n=47)	aCGH (n=43)	Expressão gênica global (n=42)	Validação		
					RT-qPCR (n=38)	qPCR (n=34)	FISH (n=7)
PA1T	CEC verrucoso						
PA5T	CEC usual						
PA6T	CEC usual						
PA7T	CEC usual						
PA9T	CEC usual						
PA10T	CEC usual						
PA11T	Recidiva						
PA12T	CEC usual						
PA13T	CEC usual						
PA14T	Carcinoma <i>in situ</i>						
PA17T	CEC usual						
PA19T	CEC usual						
PA20T	CEC usual						
PA22T	CEC usual						
PA24T	CEC misto (usual-verrucoso)						
PA25T	Carcinoma <i>in situ</i>						
PA26T	CEC usual						
PA27T	Metástase						
PA29T	CEC usual						
PE1T	CEC usual						
PE2T	CEC usual						
PE3T	Hiperplasia						
PE4T	CEC usual						
PE5T	CEC verrucoso						
PE6T	CEC misto (usual-papilífero)						

Amostra	Histologia	Genotipagem HPV (n=47)	aCGH (n=43)	Expressão gênica global (n=42)	Validação		
					RT-qPCR (n=38)	qPCR (n=34)	FISH (n=7)
PE8T	CEC papilífero						
PE9T	CEC usual						
PE10T	CEC usual						
PE11T	CEC usual						
PE12T	CEC usual						
PE15T	CEC usual						
PE16T	CEC usual						
PE17T	CEC usual						
PE18T	CEC usual						
PE19T	CEC usual						
PE21T	CEC usual						
PE22T	CEC papilífero						
PE23T	CEC usual						
PE24T	CEC usual						
PE25T	CEC usual						
PE26T	CEC usual						
1388	CEC usual						
1389	CEC usual						
1410	CEC usual						
1411	CEC usual						
PL1	CEC usual						
PL2	CEC usual						
PL3	CEC usual						

* As amostras submetidas às metodologias descritas em cada coluna estão marcadas em branco, enquanto amostras com DNA/RNA insuficiente ou ausência de blocos de parafina estão representadas em cada coluna com a cor cinza.