

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CÉLULAS
CD44^{high}/CD24^{low} E TCD3+, E DA EXPRESSÃO DOS
FATORES DE TRANSCRIÇÃO SOX2 E STAT3 NO
CARCINOMA ESCAMOSO DE PÊNIS**

FELIPE DUBOURCQ DE BARROS

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interinstitucional em Oncologia da Fundação
Antônio Prudente em parceria com o Hospital de
Câncer de Pernambuco, para obtenção do título de
Doutor em Ciências
Área de Concentração em Oncologia**

**Orientador: Dr. Gustavo Cardoso Guimarães
Coorientadora: Dra. Leuridan Cavalcante Torres**

São Paulo

2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Barros, Felipe Dubourcq

Avaliação dos níveis de células CD44^{high}/CD24^{low} e TCD3+, e da expressão dos fatores de transcrição SOX2 e STAT3 no carcinoma escamoso de pênis /
Felipe Dubourcq Barros. São Paulo; 2019.

99p.

Tese (Doutorado)-Programa de Pós-Graduação Interinstitucional em Oncologia da Fundação Antônio Prudente em parceria com o Hospital de Câncer de Pernambuco

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

Orientador: Gustavo Cardoso Guimarães

Descritores: 1. Fatores de transcrição/Transcription Factors. 2. Neoplasias Penianas/Penile Neoplasms. 3. Citometria de Fluxo/Flow Cytometry. 4. Linfócitos T/T Lymphocytes. 5. Fator de Transcrição STAT3/STAT3/Transcription Factor. 6. Antígenos CD44/Antigen, CD44.

Nuncadesista de seussonhos
Never give up on your dreams

Nuncaabandonestussueños

Somnia non deficere

N'abandonne jamais tesrêves

Gib niemalsdeineTräume auf

לעולםלא לוותרעלהחלומותשלך

لا تستسلم أبداً عن أحلامك

никогданеразочаровывайся в своихмечтах

nátabhair suas do bhrionglóidíriamh

Maşefi ara reşileloriawon ala re

永遠不要放棄你的夢想

никогашнесеоткажувашодтвоитесоништа

夢をあきらめないで

DEDICATÓRIA

À família ...

A Patrícia, minha amiga, minha companheira, meu amor, pela cumplicidade, incentivo, paciência e participação em cada etapa desta construção e realização deste projeto.

Aos meus dois tesouros, **Luís e Beatriz**, minhas maiores inspirações para lutar, e viver.

Aos meus pais: Laura, por dedicar sua vida aos seus filhos, além de muito carinho, educação e apoio incondicional, transmitindo preciosos valores através de seus exemplos; **Feliciano**, pelo apoio e incentivo nesta jornada.

Aos meus irmãos: Frederico, pelo apoio, presença, parceria e ajuda; **Tatiana, Feliciano, Mirela e Rafael**, pelo incentivo.

A todas as pessoas especiais da minha família, as quais contribuíram nestes 54 anos de vida.

Aos pacientes do Hospital de Câncer de Pernambuco, pelas várias lições de vida ao longo desses anos de vida médica, além de tornar possível a realização desta tese.

AGRADECIMENTOS

A DEUS ...

Ao Dr. Gustavo Cardoso Guimarães, pela confiança depositada, dedicação, eficiência e ensinamentos na elaboração desta tese.

À Dra. Leuridan Torres, minha coorientadora, grande incentivadora, que tornou possível a minha vinda para este grupo de doutorandos e mestrados. Pela amizade e auxílio fundamental na realização dos experimentos envolvidos nesta tese, o que fez a minha admiração e gratidão, pela amizade, ajuda, ensinamentos, paciência e incentivo desde o início até o final desta realização, minha eterna gratidão.

Ao Prof. Dr. Stênio de Cássio Zequi, diretor do Departamento de Urologia do A.C. Camargo Cancer Center, pela sua amizade.

À Superintendência Geral do Hospital de Câncer de Pernambuco, na figura de Dr. Iran Costa, incentivador deste projeto, responsável por minha presença no grupo da pós-graduação e Dr. Helio Fonseca, atual diretor e incentivador deste projeto.

À Superintendência de Ensino e Pesquisa do Hospital de Câncer de Pernambuco, em primeiro plano na pessoa de Dr. José Peixoto, chefe do departamento na época da minha inclusão no grupo de doutoramento do A.C. Camargo Cancer Center e, na sequência dos trabalhos, a todos os integrantes do departamento, como Sônia de Ratis e Solange Alves, pela ajuda na lida diária das rotinas do serviço que tornou possível este trabalho. A Dr. Guilherme Costa, hoje responsável pela Superintendência.

A Sra. Suely Francisco, bibliotecária do A.C. Camargo Cancer Center, pelas sugestões, orientações e revisão desta tese. Pela simpatia e atenção que exaltam ainda mais as suas qualidades.

À biblioteca do Hospital de Câncer de Pernambuco, na pessoa de Edna Meireiles e de todos os funcionários, pela incansável busca pelos artigos mais difíceis, de forma eficiente e amigável.

Aos meus colegas do Departamento de Urologia do Hospital de Câncer de Pernambuco, Dr. Leônidas Rabelo, Dr. Gustavo Gouveia, Dr. Mauro Marques, Dr. André Maciel, Dr. Rômulo Vasconcelos, Dr. Clóvis Fraga, Dr. Luís Paulo e Dr. Luiz

Henrique, aos fellows, Dr. Michel Bredow e Dr. Fabrício Ramos, e a todos os integrantes, pela disponibilidade.

Ao Departamento de Serviço Social do Hospital de Câncer de Pernambuco, nas pessoas de Cláudia Beltrão, Luciana Caldas, Taciana Silva, Fátima Filgueira, Cristiana Monteiro, e a todos os integrantes, pela ajuda incomensurável na lida com os pacientes e com as rotinas do serviço.

Ao Departamento de Patologia do Hospital de Câncer de Pernambuco, na pessoa de Dr. Sérgio Ricardo Soares Moura, chefe do departamento, pela eficiência, dedicação e empenho na avaliação dos espécimes patológicos, e a todos os integrantes, pela ajuda na lida com as rotinas do serviço que tornou possível este trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, do Departamento de Patologia do A.C. Camargo Cancer Center, pela sua amizade, incentivo e auxílio fundamental na fase final da elaboração desta tese.

À Dra. Carolline de Araújo Mariz, pelas horas de ajuda na coleta de espécimes, no ambulatório, com os pacientes e os dados dos mesmos, pela colaboração, dedicação primorosa e ajuda no levantamento dos prontuários por meio do Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME), e com os residentes e alunos da LIACON (Liga Acadêmica de Oncologia do Hospital de Câncer de Pernambuco), meu muito obrigado.

Ao A.C. Camargo Cancer Center, excelência em ensino e pesquisa, instituição que prima não apenas pela docência, mas também pelo alto nível de suas publicações internacionais.

Ao Prof. Dr. Sami Arap, *in memoriam*, professor titular da cadeira de urologia da Universidade de São Paulo, grande incentivador e figura determinante no projeto de doutorado, bem como ao Prof. Dr. Antônio Carlos de Lima Pompeu, pelas intermináveis horas dedicadas a minha dissertação de mestrado, pela competência e disponibilidade. Ao Prof. Dr. Cristiano Gomes, bem como a todos que fazem a URPUSP, local onde fui recebido desde 1994, uma escola médica completa. Obrigado pelos ensinamentos.

Ao Dr. Luís Numeriano, *in memoriam*, bem como ao Dr. Gil Maurício, pelo início da minha vida na urologia. Vocês foram fundamentais na minha formação médica, sempre incentivando e apoiando as escolhas, residência e pós-residência, meu eterno agradecimento.

Ao Centro Urológico Luís Numeriano, aos seus *staffs* e funcionários, colegas de trabalho de residência e formação, Dr. André Dubeux, Dr. Ricardo Lira, Dr. Sílvio Mota, Dr. Marcílio Machado, Dr. Eduardo Moraes, Dra. Wanda Nava, Luciana Beltrão, Alessandra Macedo e a todos os funcionários que compõem a unidade.

Ao Hospital Getúlio Vargas Recife-Pernambuco, aos seus professores e preceptores, residentes e funcionários, onde fui recebido em 1992, como residente e desde então minha segunda casa, em especial a clínica de urologia, na figura do chefe do serviço de urologia, Dr. Evandro Falcão, e aos residentes do departamento de urologia, pela ajuda nas horas de mais dificuldades.

Aos amigos e companheiros de trabalho, Dr. Alexandre Dubeux, Dra. Ana Paula Simões, e a todo o grupo de anestesistas do Hospital de Câncer de Pernambuco. A todos os funcionários do bloco cirúrgico, do departamento de patologia.

Ao Prof. Dr. Anuar Mítre, Prof. Dr. Alvaro Sarkis, Prof. Dr. Amílcar Giron, pela amizade, carinho e por me “adotarem” desde minha chegada à UROUSP.

Ao laboratório de patologia do A.C.Camargo Cancer Center e a todos os colaboradores, pela fundamental ajuda na realização deste trabalho.

A Sra. Karla Cristina Brito de Barros, Luciana Pitombeira, Vanuza Rodrigues e Ana Maria Kunari da pós-graduação do A.C.Camargo Cancer Center, pelo cuidado, organização e competência.

RESUMO

Barros FD. **Avaliação dos níveis de células CD44^{high}/CD24^{low} E TCD3+, e da expressão dos fatores de transcrição SOX2 e STAT3 no carcinoma escamoso de pênis.** São Paulo; 2019. [Tese de Doutorado-Programa de Pós-Graduação em Oncologia da Fundação Antônio Prudente, em Parceria com o Hospital de Câncer de Pernambuco].

Introdução: O câncer de pênis (CaPe) tem uma alta incidência em alguns países subdesenvolvidos. O tratamento padrão é a remoção do tumor primário e a linfadenectomia inguinal, em alguns pacientes. O fator prognóstico mais importante é a doença linfonodal, porém os métodos de estadiamento, disponíveis na atualidade são pouco precisos, e a alta taxa de morbidade da linfadenectomia tem estimulado o estudo de biomarcadores preditivos de metástases em linfonodos, selecionando os pacientes que necessitam da linfadenectomia. Os marcadores STAT3 e CD44, CD24, e SOX2+ são conhecidos por serem considerados marcadores de diagnóstico e prognóstico em outros cânceres, mas sem estudos no câncer de pênis. **Objetivo:** Avaliar os níveis das células CD44^{high}/CD24^{low} E TCD3+, e a expressão dos fatores de transcrição SOX2 e STAT3 no carcinoma escamoso de pênis. **Métodos:** Estudo transversal realizado no Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP) e Laboratório de Pesquisa Translacional do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), no período de março de 2015 a dezembro de 2017 em uma população de 38 pacientes com CaPe e controles. Foram realizadas análises de SOX2, STAT3, CD24 e CD44 no sangue e tecido tumoral por citometria de fluxo. **Resultados:** A mediana da idade foi de 61 anos (37 - 80 anos). A maioria dos pacientes apresentou tumor localizado na glândula (76,3%), tipo histológico usual (71,0%), de grau 1 (86,8%), sem invasão vascular e perineural (86,8% e 68,4%), sem presença de metástases (86,8%). Com relação ao estadiamento, 55,3% dos pacientes apresentavam estágio pT2 e 34,2% pT1. Foram encontrados níveis elevados de CD44^{high}CD24^{low}, CD44^{high}CD24^{low}pSTAT3⁺ e CD44^{high}CD24^{low}SOX2⁺ nos pacientes, quando comparados aos controles (p<0,05). Foram observados níveis percentuais reduzidos de leucócitos SOX2⁺ e

TCD3⁺/SOX2⁺, e elevados leucócitos pSTAT3 nos pacientes, quando comparados aos dos controles saudáveis. Foram constatados níveis elevados de CD44^{high}CD24^{low} e de leucócitos SOX2⁺ no grupo de pacientes com invasão perineural, tamanho tumoral > 3 cm e em estágio pT2 (p<0,05). Foram encontradas: associação dos níveis de células CD44^{high}/CD24^{low} e no sangue periférico com o tamanho do tumor (p=0,04) e *status* de sobrevida (p=0,01) e de CD44^{high}/CD24^{low}SOX2⁺ no sangue e tumor com *status* de sobrevida nos pacientes; expressão reduzida de pSTAT3 no sangue de pacientes com invasão perineural e elevados no tecido tumoral no grupo em estágio pT1; alta expressão de TCD3⁺ no sangue e tecido tumoral de pacientes com tumor ≤3cm; aumento de TCD3⁺SOX2⁺ no sangue de pacientes sem invasão perineural e em estágio pT1. Observou-se correlação de CD44^{high}CD24^{low}pSTAT3⁺ (r=0,669; p=0,024), de pSTAT3 (r=0,487; p=0,018) e de TCD3⁺SOX2⁺ (r=0,404; p=0,029) entre o sangue e o tecido tumoral. **Conclusão:** As moléculas CD44, CD24 e SOX2 foram marcadores de doença avançada, sendo associados ao pior prognóstico no câncer de pênis, porém, p-STAT3 e TCD3⁺ foram associados a um prognóstico mais favorável neste estudo.

Descritores: Fatores de transcrição, Neoplasias Penianas, Citometria de Fluxo, Linfócitos T. Fator de Transcrição STAT3, Antígenos CD44

SUMMARY

Barros FD. [Evaluation of CD44^{high}CD24^{low} and TCD3 + cell levels, and expression of SOX2 and STAT3 transcription factors in penile squamous cell carcinoma]. São Paulo; 2019. [Tese de Doutorado-Programa de Pós-Graduação em Oncologia da Fundação Antônio Prudente, em Parceria com o Hospital de Câncer de Pernambuco].

Introduction: Penile cancer (CaPe) has a high incidence in some underdeveloped countries. The standard treatment is removal of the primary tumor and inguinal lymphadenectomy in some patients. At the moment, the most important prognostic factor is lymph node disease, but the staging methods currently available are not very accurate and the high morbidity rate of lymphadenectomy has prompted the study of biomarkers that may predict lymph node metastasis, and aid in the selection of patients who need lymphadenectomy. The markers STAT3 and CD44, CD24, SOX2 + are known to be markers of diagnosis and prognosis in other cancers, but there are no such studies on penile cancer. **Aim:** To evaluate the levels of CD44^{high}/ CD24^{low} and TCD3+ cells, and the expression of SOX2 and STAT3 transcription factors in squamous cell carcinoma of the penis. **Methods:** A cross-sectional study was conducted at the Hospital de Cancer de Pernambuco (HCP) and Translational Research Laboratory at the Prof. Fernando Figueira Institute of Integral Medicine (IMIP), from March 2015 to December 2017 of a population of 38 patients with CaPe and controls. Analyses of SOX2, STAT3, CD24 and CD44 were performed on blood and tumor tissue by flow cytometry. **Results:** The median age was 61 years (37-80 years). Most of the patients presented tumor localized in the glans (76.3%), histological type (71.0%), grade 1 (86.8%), without vascular and perineural invasion (86.8% and 68.4% %), without metastases (86.8%). Regarding staging, 55.3% of the patients had pT2 and 34.2% pT1. High levels of CD44^{high}CD24^{low}, CD44^{high}CD24^{low}pSTAT3+and CD44^{high}CD24^{low},SOX2+ were found in the patients compared to the controls (p <0.05). Reduced percentage levels of SOX2+ and TCD3+ / SOX2+ leukocytes and high pSTAT3 leukocytes were observed in the patients when compared to healthy

controls. There were elevated levels of CD44^{high}CD24^{low} and SOX2+ leukocytes in the group of patients with perineural invasion, tumor size > 3 cm and at pT2 stage (p < 0.05). Peripheral blood CD44^{high}CD24^{low} levels were found to be associated with the tumor size (p = 0.04) and survival status (p = 0.01) and CD44^{high}CD24^{low}SOX2+ levels in the blood and tumor with survival status in patients. Reduced levels of pSTAT3 in the blood of patients with perineural invasion and elevated tumor tissue in the pT1 stage. There were elevated levels of TCD3 + in the blood and tumor tissue of patients with tumors of ≤ 3 cm. Increased TCD3 + SOX2 + was found in the blood of patients without perineural and pT1 stage invasion. CD44^{high}CD24^{low}pSTAT3 + (r = 0.669; p = 0.024), pSTAT3 (r = 0.487, p = 0.018) and TCD3 + SOX2 + (r = 0.404, p = 0.029) correlations were observed between blood and tumor tissue. **Conclusion:** CD44, CD24 and SOX2 molecules were markers of advanced disease, and were associated with the worst prognosis in penile cancer. However, p-STAT3 and TCD3 + were associated with a more favorable prognosis in this study.

Key-words: Transcription Factors, Penile Neoplasms, Flow Cytometry, T Lymphocytes. STAT3 Transcription Factor, Antigen, CD44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Análise da incidência por câncer de pênis por região geográfica...	2
Figura 2	Os países com maior incidência de câncer de pênis (taxa padronizada por idade, casos por 100 mil pessoas-ano).....	3
Figura 3	Sítios anatômicos dos tumores de pênis	8
Figura 4	A proteína SOX2 afeta numerosos processos de células cancerígenas.....	13
Figura 5	Ativação de via JAK-STAT e indução da transcrição gênica após estimulação por citocinas.....	16
Figura 6	Ativação constitutiva de STAT3 em tumores humanos	17
Figura 7	A sinalização JAK / STAT é crítica para a diferenciação de células T CD4+	27
Figura 8	A sinalização STAT3 fosforilada (pSTAT3) no microambiente tumoral	28
Figura 9	Fluxograma de captação dos pacientes e controles.....	34

Figura 10	Visão geral da imunofenotipagem por citometria de fluxo	38
Figura 11	Níveis percentuais de células CD44 ^{high} CD24 ^{low} , CD44 ^{high} CD24 ^{low} pSTAT3+ e CD44 ^{high} CD24 ^{low} SOX2+ no sangue periférico dos pacientes com carcinoma escamoso de pênis e controles.....	44
Figura 12	Níveis percentuais de células CD44 ^{high} CD24 ^{low} , CD44 ^{high} CD24 ^{low} pSTAT3+ e CD44 ^{high} CD24 ^{low} SOX2+ no sangue periférico dos pacientes com invasão perineurale sem invasão perineural no carcinoma escamoso de pênis.....	47
Figura 13	Níveis percentuais de células CD44 ^{high} CD24 ^{low} , CD44 ^{high} CD24 ^{low} pSTAT3+ e CD44 ^{high} CD24 ^{low} SOX2+ no sangue periférico de grupos de pacientes com tamanho do tumor ≤ 3,5cm e >3,5cm no carcinoma escamoso de pênis	47
Figura 14	Níveis percentuais de células CD44 ^{high} CD24 ^{low} , CD44 ^{high} CD24 ^{low} pSTAT3+ e CD44 ^{high} CD24 ^{low} SOX2+ no sangue periférico de pacientes com carcinoma escamoso de pênis em estadiamento pT1 e pT2	48
Figura 15	Níveis percentuais de células CD44 ^{high} CD24 ^{low} , CD44 ^{high} CD24 ^{low} pSTAT3+ e CD44 ^{high} CD24 ^{low} SOX2+ no tecido tumoral dos pacientes com invasão perineural e sem invasão perineural no carcinoma escamoso de pênis.....	50

Figura 16	Níveis percentuais de células CD44 ^{high} CD24 ^{low} , CD44 ^{high} CD24 ^{low} pSTAT3 ⁺ e CD44 ^{high} CD24 ^{low} SOX2 ⁺ no tecido tumoral de grupos de pacientes com tamanho do tumor ≤ 3,5cm e >3,5cm no carcinoma escamoso de pênis.....	50
Figura 17	Níveis percentuais de células CD44 ^{high} CD24 ^{low} , CD44 ^{high} CD24 ^{low} pSTAT3 ⁺ e CD44 ^{high} CD24 ^{low} SOX2 ⁺ no tecido tumoral de pacientes com carcinoma escamoso de pênis em estadiamento pT1 e pT2	51
Figura 18	Níveis percentuais de expressão de leucócitos SOX2 ⁺ , leucócitos pSTAT3 ⁺ TCD3 ⁺ , TCD3 ⁺ SOX2 ⁺ e TCD3 ⁺ pSTAT3 ⁺ no sangue periférico dos pacientes com carcinoma escamoso de pênis e controles.....	58
Figura 19	Níveis percentuais de expressão de leucócitos SOX2 ⁺ , leucócitos pSTAT3 ⁺ , TCD3 ⁺ , TCD3 ⁺ SOX2 ⁺ e TCD3 ⁺ pSTAT3 ⁺ no sangue periférico dos pacientes com invasão perineural e sem invasão perineural no carcinoma escamoso de pênis.....	60
Figura 20	Níveis percentuais de expressão de leucócitos SOX2 ⁺ , leucócitos pSTAT3 ⁺ , TCD3 ⁺ , TCD3 ⁺ SOX2 ⁺ e TCD3 ⁺ pSTAT3 ⁺ no sangue periférico de grupos de pacientes com tamanho do tumor ≤ 3,5cm e > 3,5 cm no carcinoma escamoso de pênis	61
Figura 21	Níveis percentuais de expressão de leucócitos SOX2 ⁺ , leucócitos pSTAT3 ⁺ , TCD3 ⁺ , TCD3 ⁺ SOX2 ⁺ e TCD3 ⁺ pSTAT3 ⁺ no sangue periférico de pacientes com carcinoma escamoso de pênis em estadiamento pT1 e pT2.....	62

Figura 22	Níveis percentuais de expressão de leucócitos SOX2+, leucócitos pSTAT3+, TCD3+, TCD3+ SOX2+ e TCD3+ pSTAT3+ no tecido tumoral de grupos de pacientes com e sem invasão perineural no câncer de pênis.....	64
Figura 23	Níveis percentuais de expressão de leucócitos SOX2+, leucócitos pSTAT3+, TCD3+, TCD3+ SOX2+ e TCD3+ pSTAT3+ no tecido tumoral de grupos de pacientes com tamanho do tumor $\leq 3,5$ cm e $>3,5$ cm no câncer de pênis.....	65
Figura 24	Níveis percentuais de expressão de leucócitos SOX2+, leucócitos pSTAT3+, TCD3+, TCD3+ SOX2+ e TCD3+ pSTAT3+ no tecido tumoral de pacientes com carcinoma escamoso de pênis em estadiamento pT1 e pT2.....	66
Figura 25	Análise da correlação dos níveis TCD3+, CD44 ^{high} CD24 ^{low} e de SOX2+ e pSTAT3+ entre o sangue periférico e o tecido tumoral de pênis.....	74

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Definição e categorização das variáveis clínicas	35
Tabela 1	Distribuição das frequências absolutas e relativas das características clínicas de 38 pacientes com câncer de pênis. Hospital de Câncer de Pernambuco (2015-2017)	43
Tabela 2	Análises da associação das características clínicas de acordo as medianas dos valores relativos de células CD44 ^{high} /CD24 ^{low} encontradas no sangue periférico e no tecido tumoral dos pacientes com câncer de pênis	53
Tabela 3	Análises da associação das características clínicas de acordo com as medianas dos valores relativos de células CD44 ^{high} /CD24 ^{low} SOX2 ⁺ e CD44 ^{high} /CD24 ^{low} pSTAT3 ⁺ encontradas no sangue periférico e no tecido tumoral dos pacientes com câncer de pênis	55
Tabela 4	Análises da associação das características clínicas de acordo as medianas dos valores relativos de SOX2 ⁺ e TCD3 ⁺ SOX2 ⁺ encontradas no sangue periférico e tecido tumoral dos pacientes com câncer de pênis	68
Tabela 5	Análises da associação das características clínicas de acordo as medianas dos valores relativos de pSTAT3 ⁺ e TCD3 ⁺ pSTAT3 ⁺ encontradas no sangue periférico e tecido tumoral dos pacientes com câncer de pênis	71

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AKT	<i>Activated serine-threonine proteinkinase</i>
APC	<i>Antagonist Pathway Cell</i>
AUA	<i>American Urological Association</i>
CaPe	Pacientes com carcinoma escamoso de pênis
CAAE	Certificado de apresentação para apreciação ética
CD11	<i>Cluster of differentiation 11</i>
CD24	<i>Cluster of differentiation 24</i>
CD44	<i>Cluster of differentiation 44</i>
CEC	Carcinoma escamocelular
COX2	<i>Cyclooxygenase 2</i>
CTRL	Controles
CTE	Células-tronco embrionárias
CTT	Células-tronco tumorais
DNA	<i>Deoxyribonucleicacid</i>
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
HCP	Hospital de Câncer de Pernambuco
HER2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor2(oncology)</i>
HepG2	<i>Humam hepato carcinoma Cell</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPV	Papiloma vírus humano
HTLV	<i>Human T-lymphotropicvirus</i>

ILND	Linfadenectomia inguinal (<i>Inguinal lymphadenectomy nodes dissection</i>)
IMIP	Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IPN+	Com invasão perineural
IPN-	Sem invasão perineural
JAK	<i>Janus Kinase</i>
LASER	<i>do inglês Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
KLF4	<i>Krüppel-likefamily</i>
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
OCT-4	<i>Octamer-binding transcription factor Z</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAAF	Punção e aspiração com agulha fina
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Reações de cadeia de polimerase
PET-CT	Tomografia por emissão de positrões
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-Kinase</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RNM	Ressonância nuclear magnética
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SMAD4	<i>Gene similar Drosophila Mothers Decapentaplegic</i>
SOX2	<i>Sex determining region Y-box 2</i>
SPCC	Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer

STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TC	Tomografia computadorizada
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TT	Tamanho do tumor
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR-2	<i>VEGF receptor 2</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer de pênis.....	1
1.1.1	Epidemiologia.....	1
1.1.2	Fatores de risco e tipo histológico.....	4
1.1.3	Diagnóstico e fatores de prognóstico.....	5
1.1.4	Tratamento.....	9
1.2	Mecanismos moleculares no câncer.....	12
1.2.1	<i>Sex determining region Y-box 2 (SOX2)</i>	12
1.2.2	<i>Signal transducer and activator of transcription (STAT)</i>	14
1.2.3	Marcadores de superfície celular CD44 e CD24.....	18
1.3	Sistema imune e câncer.....	24
1.3.1	Imunidade inata.....	24
1.3.2	Imunidade adaptativa.....	25
2	JUSTIFICATIVA	29
3	OBJETIVOS	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1	Tipo de estudo, local e período, e aspectos éticos.....	31
4.2	População do estudo.....	31
4.3	Crítérios de elegibilidade.....	32
4.3.1	Crítérios de inclusão.....	32
4.3.2	Crítérios de exclusão.....	32
4.4	Procedimentos de captação de pacientes e controles.....	32
4.5	Definição dos termos e variáveis.....	34
4.6	Testes laboratoriais.....	36
4.6.1	Coleta de amostra biológica.....	36
4.6.2	Digestão enzimática do tecido tumoral.....	37

4.6.3	Técnica de citometria de fluxo.....	37
4.6.4	Imunofenotipagem por citometria de fluxo	39
4.7	Análises estatísticas.....	40
4.7.1	Análises descritivas e de associação	40
4.7.2	Análise de correlação	41
5	RESULTADOS	42
5.1	Descrição das características clínicas	42
5.2	Análise dos níveis percentuais de células CD44 ^{high} CD24 ^{low} , CD44 ^{high} CD24 ^{low} pSTAT3 ⁺ e CD44 ^{high} CD24 ^{low} SOX2 ⁺ nos pacientes e controles.....	44
5.3	Níveis percentuais de células CD44 ^{high} CD24 ^{low} , CD44 ^{high} CD24 ^{low} pSTAT3 ⁺ e CD44 ^{high} CD24 ^{low} SOX2 ⁺ no sangue periférico de acordo com as características clínicas.....	45
5.4	Níveis percentuais de células CD44 ^{high} CD24 ^{low} , CD44 ^{high} CD24 ^{low} pSTAT3 ⁺ e CD44 ^{high} CD24 ^{low} SOX2 ⁺ no tecido tumoral de acordo com as características clínicas.....	49
5.5	Análises de associação das características clínicas com os níveis de células CD44 ^{high} CD24 ^{low} encontrados no sangue periférico e no tecido tumoral dos pacientes	52
5.6	Análises de associação das características clínicas com os níveis de células CD44 ^{high} CD24 ^{low} SOX2 ⁺ e CD44 ^{high} CD24 ^{low} pSTAT3 ⁺ encontrados no sangue periférico e no tecido tumoral dos pacientes.....	54
5.7	Análise dos níveis percentuais de leucócitos SOX2 ⁺ , STAT3, TCD3 ⁺ , TCD3 ⁺ /SOX2 ⁺ e TCD3 ⁺ /STAT3 nos pacientes e controles.....	57
5.8	Níveis percentuais de SOX2, STAT3, TCD3 ⁺ , TCD3 ⁺ SOX2 ⁺ e TCD3 ⁺ + pSTAT3 no sangue periférico de acordo com as características clínicas.....	59
5.9	Níveis percentuais de SOX2, STAT3, TCD3 ⁺ , TCD3 ⁺ /SOX2 ⁺ e TCD3 ⁺ +/ STAT3 no tecido tumoral de acordo com as características clínicas	63
5.10	Análises de associação das características clínicas com os níveis de SOX2 ⁺ e TCD3 ⁺ SOX2 ⁺ encontrados no sangue periférico e no tecido tumoral dos pacientes	67
5.11	Análises de associação das características clínicas com os níveis de pSTAT3	

	+ e TCD3+PSTAT3+ encontrados no sangue periférico e no tecido tumoral dos pacientes.....	70
5.12	Análise de correlação entre o sangue periférico e o tecido tumoral dos pacientes.....	73
6	DISCUSSÃO.....	75
7	CONCLUSÃO.....	84
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

APÊNDICES

Apêndice 1 Termo de consentimento livre e esclarecido do paciente e do controle

Apêndice 2 Ficha clínica

ANEXOS

Anexo 1 Parecer Consubstanciado do CEP/HCP

Anexo 2 Sistema de estadiamento TNM AJCC 7ª EDIÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE PÊNIS

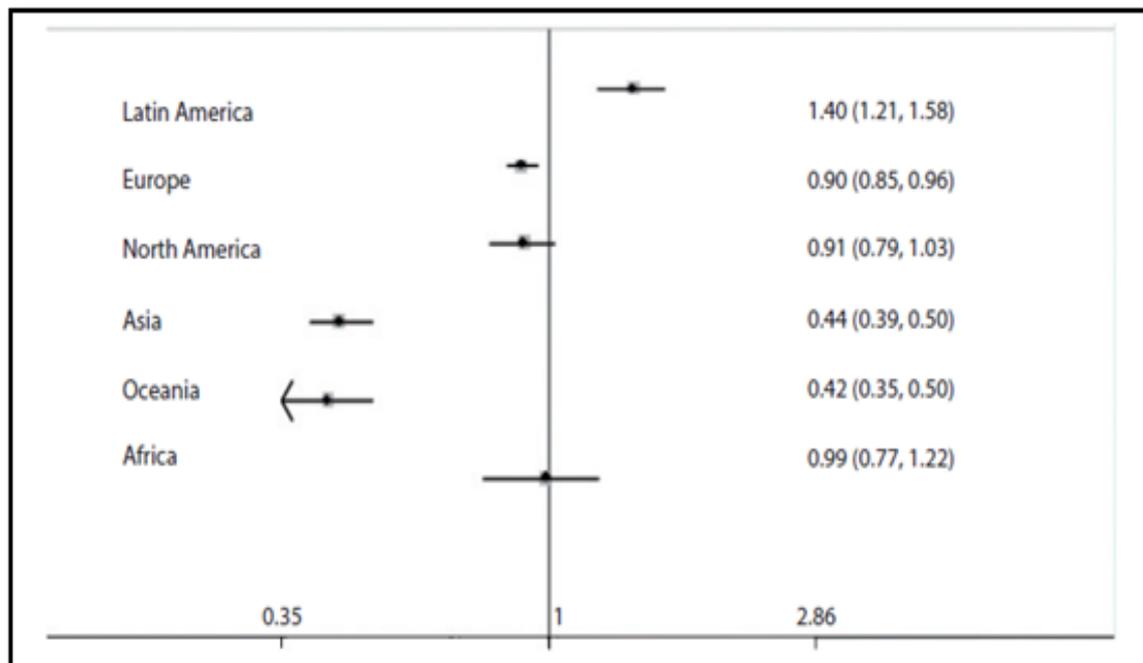
1.1.1 Epidemiologia

O câncer de pênis (CaPe) é uma doença rara em países desenvolvidos, de distribuição mundial irregular. Acomete as células escamosas do epitélio de estruturas penianas como o prepúcio, a glândula e o suco coronal (POMPEO 2010). Apresenta caráter localmente agressivo e mutilante, exercendo forte influência negativa na autoestima e na vida sexual e afetiva do homem (BARROS e MELO 2009).

Em uma revisão sistemática realizada por MONTES CARDONA e GARCÍA-PERDOMO (2017) mostrou-se uma incidência de câncer de pênis no mundo de 0,84 casos/100.000 homens por ano. A maior incidência foi descrita na América Latina, com 1,4 casos/100.000 homens, e, entre os países da América Latina, o Brasil apresentou a maior incidência de câncer de pênis, com 5,7/100.000 homens-ano, seguido do Paraguai, com incidência de 4,44/100.000 homens, e do Chile (2002-2003), com 2,52 casos/100.000 homens. No que se refere à incidência por país, a Romênia, entre os anos de 1983 e 1987, ocupou o primeiro lugar no mundo, com uma taxa de 7,26 casos de CaPe por 100.000 pessoas-ano (MONTES CARDONA e GARCÍA-PERDOMO 2017) (Figuras 1 e 2).

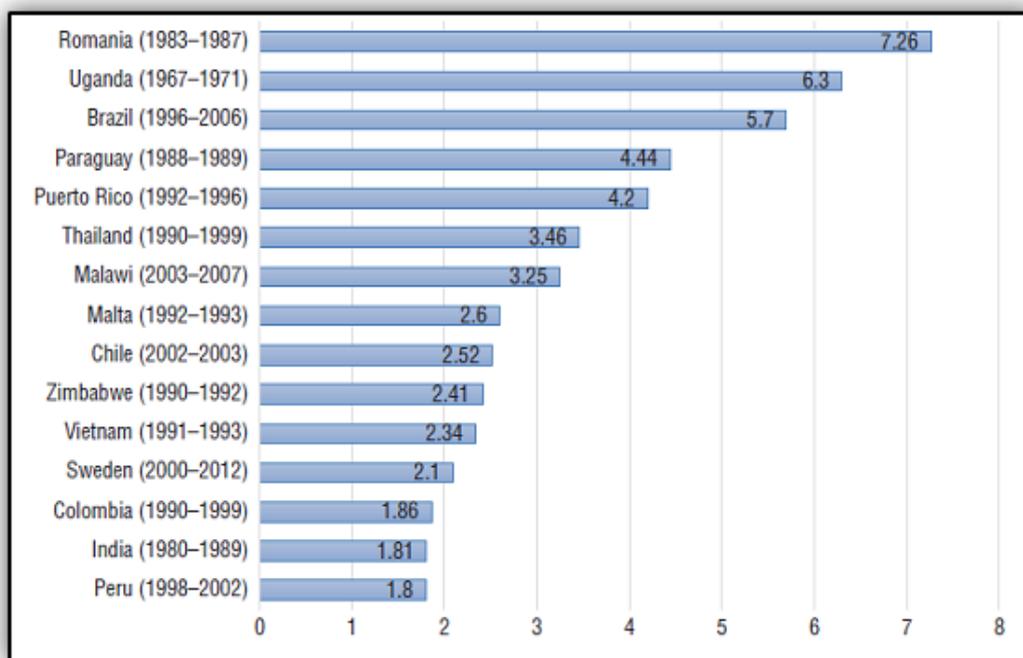
Nos continentes como África, Ásia e América do Sul, o câncer de pênis pode representar até 20% dos tumores do sexo masculino (GUIMARÃES et al. 2009). Em grande parte da Europa e da América do Norte, sua incidência foi menor que 1/100.000

habitantes (BAUMGARTEN et al. 2014; WALLEN et al. 2014; YAO et al. 2017; Ministério da Saúde 2018).



Fonte: MONTES CARDONA e GARCÍA-PERDOMO (2017)

Figura 1 - Análise da incidência de câncer de pênis por região geográfica



Fonte: MONTES CARDONA e GARCÍA-PERDOMO (2017)

Figura 2 - Os países com maior incidência de câncer de pênis (taxa padronizada por idade, casos por 100 mil pessoas-ano)

No Brasil, a neoplasia peniana constitui um grave problema de saúde pública, atingindo 2,1% de todas as neoplasias masculinas. As regiões Norte e Nordeste detêm 53% dos casos de câncer do país. No Estado do Maranhão, a incidência da doença foi de 6,1/100.000 homens, e, em Pernambuco, particularmente, a incidência do câncer de pênis foi de 2,1/100.000 homens, semelhante aos índices nacionais (FONSECA et al. 2010; COUTO et al. 2014; COELHO et al. 2018). A maioria dos casos de câncer de pênis no Brasil ocorre em homens com idade entre 40 e 70 anos, e aproximadamente 10% dos casos de CaPe ocorrem em indivíduos com faixa etária abaixo de 35 anos (FAVORITO et al. 2008).

1.1.2 Fatores de risco e tipo histológico

A presença de fimose, más condições de higiene e baixo padrão socioeconômico constituem os principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de pênis. O tempo prolongado de exposição a fatores de risco - como tabagismo, presença de fimose, infecções sexualmente transmissíveis recorrentes, falta de higiene e procura tardia da assistência médica especializada está associado à prevalência da doença na sexta década de vida (BRINTON et al. 1991).

A circuncisão ou postectomia logo após o nascimento procedimento cirúrgico que consiste na retirada do prepúcio mostrou estar associada à não existência de casos de câncer de pênis entre os judeus, sendo a circuncisão, na comunidade judaica, parte da tradição religiosa. Na comunidade Hindus, a circuncisão somente acontece nos casos de fimose, sendo a incidência de câncer de pênis de 3,1% (TSEN et al. 2001; MONTES CARDONA e GARCÍA-PERDOMO 2017; GARCÍA-PERDOMO 2017).

A infecção por papiloma vírus humano (HPV), particularmente, é um importante fator de risco, sendo descrito inicialmente em lesões penianas primárias (MIRALLES-GURI et al. 2009). Um estudo conduzido por STANKIEWICZ et al. (2009) demonstrou que a presença do HPV não estaria associada aos tipos histológicos verrucoso e papilífero, e sim aos tipos histológicos basaloide, warty-basaloide e warty. A neoplasia intraepitelial de alto grau (grau III), o condiloma gigante ou *Buschke-Lowenstein*, a eritroplasia de Queyrat, doença de Bowen e de Paget (Adenocarcinoma intradérmico) são lesões pré-malignas, e até 1/3 delas se transformou em carcinoma escamocelular de pênis (CEC) (HAKENBERG et al. 2015).

Sabe-se que 95% desses tumores malignos correspondem a carcinoma de células escamosas, e aproximadamente 80% deles se desenvolvem no prepúcio e na

glande, podendo invadir corpos esponjosos e cavernosos, e na uretra (GUIMARÃES et al. 2006, 2009; COUTO et al. 2014). Os demais tipos histológicos de carcinoma peniano, a exemplo do carcinoma basocelular, adenocarcinoma, melanoma e sarcoma, são extremamente raros (HERNANDEZ et al. 2008). Uma nova classificação histológica para os tumores malignos epiteliais do pênis foi instituída pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e incluiu os tipos histológicos carcinoma acantolítico, epidermoide papilífero e Warty-basaloide (CHAUX et al. 2010).

O tipo histológico mais comum é o carcinoma escamoso de pênis (95%), sendo também o mais frequente no Brasil (COELHO et al. 2018). Os carcinomas escamosos de pênis apresentam diferentes subtipos histológicos de acordo com as características clínico-patológicas, sendo distribuídos em dois grupos: tumores associados à infecção por HPV ou não (MOCH et al. 2016). São oito subtipos de carcinomas escamosos de pênis conhecidos não relacionados ao HPV: usual, verrucoso, pseudoglandular, circulatum, papilar, adenoescamoso, sarcomatoide e misto. Os relacionados ao HPV são o basaloide, o papilar basaloide, o de células claras, o linfoepitelioma-*like* e o *warty* (GUIMARÃES et al. 2009).

1.1.3 Diagnóstico e fatores de prognóstico

A avaliação adequada da lesão primária e dos gânglios linfáticos é crítica, uma vez que o envolvimento nodal constitui o fator de sobrevivência mais importante. As Diretrizes de Prática Clínica em Oncologia da *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) para câncer de pênis fornecem recomendações sobre o diagnóstico e o gerenciamento dessa doença, baseadas em evidências e no consenso de especialistas (SPIESS e POCH 2017).

O diagnóstico definitivo é realizado por meio de biópsia da lesão peniana, com a coleta da amostra realizada de forma profunda e no centro da lesão, evitando áreas necro-hemorrágicas e, quando possível, obtendo fragmentos do tecido normal. Pode ser incisional ou excepcional naqueles tumores pequenos (LOPES et al. 1994).

O exame físico e os exames de imagem não são adequados para avaliar os linfonodos inguinais, e muitos pacientes são submetidos a linfadenectomias não terapêuticas. Sabe-se, no entanto, que nem todos os pacientes com linfonodos inguinais clínica ou histologicamente negativos evoluem favoravelmente. A ultrassonografia pode detectar alterações na arquitetura associadas à metástase, mas tem baixa sensibilidade (74%) e especificidade (77%), quando usada sozinha (CRAWSHAW et al. 2009). Mesmo quando combinada com a punção e com a aspiração com agulha fina (PAAF), a ultrassonografia ainda demonstra resultados variáveis (SAISORN et al. 2006).

O resultado positivo com a PAAF indica a necessidade de linfadenectomia inguinal, e o negativo não pode excluir o envolvimento nodal. A tomografia computadorizada (TC) e a ressonância nuclear magnética (RNM) também apresentam uma baixa sensibilidade para os linfonodos positivos (36%) e altas taxas de falso-positivos (GUIMARÃES et al. 2007). A TC e a RNM, no entanto, permitem a avaliação não apenas dos linfonodos inguinais, mas também dos linfonodos pélvicos. A PET-CT demonstrou excelentes taxas de detecção, mas não permitiu a detecção de micrometástases (<2 mm) (GRAAFLAND et al. 2009). A ressonância magnética realçada por nanopartículas usando ferumoxtrana-10 mostra resultados iniciais promissores, com excelente sensibilidade e especificidade (100 e 97%,

respectivamente), embora com número limitado de pacientes (TABATABAEI et al. 2005).

A primeira manifestação clínica do câncer de pênis pode ser uma ferida isolada, de difícil cicatrização, ou associada a outros sintomas, como: dor, inflamação, disúria, prurido e hemorragia. De uma maneira geral, esse tipo de câncer é caracterizado por iniciar-se de forma insidiosa, como uma doença local regional antes da progressão e desenvolvimento de uma disseminação metastática (GUIMARÃES et al. 2009; COUTO et al. 2014).

Os tumores de pênis têm uma manifestação heterogênea, sua localização mais frequente é na glândula, sendo o prepúcio e o suco coronal locais de início da neoplasia. A detecção de linfonodos palpáveis não significa que estes estejam infiltrados por células neoplásicas, sendo a hipertrofia relacionada a processo infeccioso/inflamatório que frequentemente está presente na lesão primária. O linfonodo acometido por neoplasia foi encontrado em 54% dos pacientes (HEYNS et al. 2010; COELHO et al. 2018) (Figura 3).

A demora na procura de assistência parece estar relacionada ao grupo de homens de baixo nível socioeconômico, solteiro e alcoólatra, além da dificuldade de acesso ao serviço médico em cidades pobres e pequenas do interior do Brasil ou nos países subdesenvolvidos da Ásia e África, lugares onde essa doença é mais prevalente. Todos esses fatores prejudicam o prognóstico, porém a demora na realização do tratamento cirúrgico é a causa da disseminação das células tumorais para a via linfática e hematogênica (GUIMARÃES et al. 2009; POMPEO 2010).



Fonte: Arquivo do autor; fotos autorizadas

Figura 3 - Sítios anatômicos dos tumores no pênis

O surgimento de gânglios inguinais pode significar a existência de metástases, sendo a invasão e a disseminação metastática grandes obstáculos para a cura do câncer de pênis. Acredita-se que o processo de metástase tenha início em uma fase precoce do desenvolvimento do tumor primário. Essa hipótese é reforçada pela constatação de que, para um tumor exceder o diâmetro de 1 ou 2 milímetros, é necessário que ocorra o processo de neovascularização ou angiogênese, um importante fator para o desenvolvimento das metástases. No processo de angiogênese tumoral, ocorrem a síntese e a secreção de vários mediadores da angiogênese, além da supressão de moléculas de inibição desse processo (FOLKMAN 1971).

A aquisição de um fenótipo metastático requer, provavelmente, alterações genéticas adicionais àquelas envolvidas no próprio processo de tumorigênese, incluindo o aumento da expressão de oncogenes e/ou alterações nos genes de supressão

tumoral, promovendo invasão e metástases. Uma vez ultrapassada a membrana basal, as células deverão ter acesso ao compartimento vascular/linfático da microcirculação através da membrana basal subendotelial. Essa etapa do processo invasivo é particularmente facilitada não só pelo rico suprimento vascular tumoral incentivado pela angiogênese induzida pelo tumor como também pela presença de vários defeitos nas membranas basais dos vasos neoformados (FOLKMAN e KLAGSBRUN 1987).

A disseminação metastática é um processo complexo que se caracteriza pela invasão das células tumorais capazes de se deslocarem para os sítios distantes e de percorrer todas as etapas da formação das metástases. Para que esse processo seja efetivo, as células do tumor precisam deixar a sua localização primária, invadir vasos sanguíneos ou linfáticos adjacentes e estabelecer uma nova colônia que se prolifera em um sítio distante. A interação entre as células tumorais e os tecidos do hospedeiro promove liberação de mediadores responsáveis pela estimulação ou inibição da proliferação celular (LIOTTA et al. 1974).

1.1.4 Tratamento

A cirurgia ainda é a modalidade terapêutica mais executada em casos de câncer peniano, por eliminar a doença e, sempre que possível, preservar a função urinária e sexual. De uma maneira geral, dependendo do tipo e do tamanho da lesão, são realizadas a ressecção do tumor primário e a linfadenectomia inguinal ou ínguino-ilíaca bilateral (CATALONA 1980; 1988; HORENBLAS et al. 1991; LOPES et al. 1996). Com efeito, é um tratamento localmente mutilante, que pode levar a sequelas físicas e psicológicas, sendo necessários, portanto, um olhar holístico e um

acompanhamento multidisciplinar durante todo o período transoperatório (WANICK et al. 2011).

Efetivamente, na grande maioria dos casos, o diagnóstico é feito em uma fase avançada, e as amputações parciais ou totais do pênis são, na prática clínica, as cirurgias mais realizadas no tratamento do carcinoma peniano. Visando minimizar taxas de recidivas locais, especial atenção deve ser dada à margem da ressecção cirúrgica, devendo-se considerar, nas amputações parciais, uma margem de segurança entre 1,5 e 2,0 cm do tumor. Por outro lado, nos casos de tumores extensos ou lesões que infiltrem a base do pênis, as amputações totais com uretostomia perineal são mais adequadas (LAWINDY et al. 2011).

Nos casos de lesões pequenas, em estádios iniciais, o tratamento pode ser realizado por radioterapia, laser terapia e até ressecções regradas, com excisão local da lesão, respeitando, com rigor, as margens de segurança (MOHS et al. 1992; LONT et al. 2006; MEIJER et al. 2007; TEWARI et al. 2007). Particularmente, para esse tipo de procedimento, há algumas restrições, como pacientes obesos, diabéticos, imunossuprimidos e em terapia anticoagulante, que têm tido piores resultados por dificuldade na realização do procedimento e/ou na cicatrização adequada do tratamento da lesão (YUVARAJA et al. 2017). Os principais fatores associados ao risco de metástases linfonodais são o estadiamento tumoral, o grau histológico e a presença ou ausência de invasão perineural e/ou linfovascular. O conhecimento da estimativa de risco de linfonodos positivos para metástase ajuda a direcionar o tratamento bem como estimar os riscos de recorrência local ou a distância (PETTAWAY et al. 2017).

A abordagem dos linfonodos da cadeia inguinal no tratamento do câncer de pênis é extremamente importante, pois são os primeiros a serem acometidos, e o seu envolvimento é o fator prognóstico mais importante para esse tipo de câncer (FAVORITO et al. 2008; SHAH et al. 2017). Por um lado, a não realização da linfadenectomia inguinal pode deixar de tratar 20 a 25% dos pacientes, devido a metástases ocultas; por outro lado, a linfadenectomia eletiva nos pacientes de risco pode estar associada a índices de complicações e morbidades, a curto e longo prazo, de 35 a 70% dos pacientes (FICARRA et al. 2006; HAKENBERG et al. 2015).

MCDUGAL et al. (1986) evidenciaram que a realização de linfadenectomia preventiva em pacientes com doença local e risco de doença regional (doença linfonodal inguinal microscópica), com gânglios inguinais clinicamente ainda não palpáveis, levou ao aumento da sobrevida livre de doença, quando comparado aos pacientes que realizaram linfadenectomia apenas quando os linfonodos se tornaram palpáveis. Atualmente, as modalidades disponíveis para detecção de metástases ocultas são insatisfatórias, entretanto a ressecção precoce de linfonodos inguinais está associada a benefício terapêutico. A presença e a extensão das metástases de linfonodos inguinais regionais foram identificadas como o indicador de prognóstico mais importante na determinação do seguimento de longo prazo em homens com CEC invasivo do pênis (SPIESS e POCH 2017).

Sem tratamento adequado, os pacientes morrem aproximadamente em dois anos após o diagnóstico, devido a complicações relacionadas ao crescimento local ou metástase (FAVORITO et al. 2008; SHAH et al. 2017). Os altos índices de morbidade relacionados à linfadenectomia inguinal associados a um percentual elevado de

linfonodos retirados não contaminados fazem surgir dúvidas entre os cirurgiões na tomada de decisão em alguns casos (WEN et al. 2018).

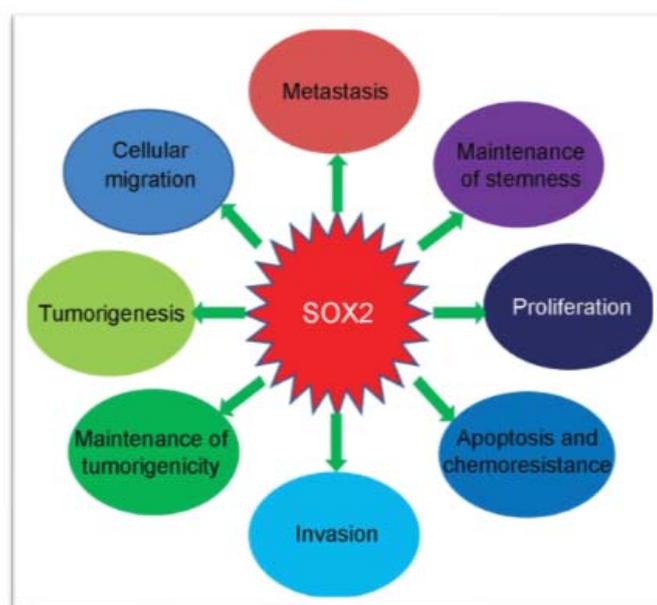
1.1 MECANISMOS MOLECULARES NO CÂNCER

1.2.1 *Sex determining region Y-box 2(SOX2)*

Nos últimos anos, as pesquisas têm evidenciado que a tumorigênese é dependente de um pequeno subconjunto de células dentro do tumor, chamadas de *Câncer stem cells* (CSCs), oriundas de mutações em genes associados com o controle da proliferação celular e importantes na diferenciação das células-tronco. Essas células seriam uma subpopulação de células com potencial ilimitado de replicação e capacidade de se auto renovar, características que as diferenciam das demais células não tumorigênicas, além de exclusiva capacidade de iniciar e manter o crescimento tumoral (DALERBA et al. 2007; SHACKLETON 2010).

O gene *Sex determining region Y-box 2(SOX2)* da região determinante do sexo, membro da família de genes da caixa de grupo de alta mobilidade (SOX) do tipo Sry, codifica o fator de transcrição SOX2, que contribui significativamente para a regulação da pluripotencialidade celular. O SOX2 está intimamente associado ao desenvolvimento embrionário inicial, diferenciação neural e outros processos biológicos. Um número crescente de estudos mostra que o SOX2 exerce um efeito positivo sobre os tumores malignos. De acordo com esses resultados, espera-se que o SOX2 se torne um novo alvo para a terapia do câncer com a descoberta dos mecanismos que afetem o comportamento biológico dos tumores (WANG et al. 2015).

Nas células-troncos embrionárias, a redução da expressão de SOX2 está associada com a perda do estado pluripotente e uma propensão para a diferenciação. Parece haver comportamentos distintos no envolvimento do SOX2 entre vários tipos de tumores malignos, sendo abundante em 41% dos tumores de pequenas células do pulmão e em 43% dos carcinomas basocelulares de mama (células-like), enquanto, no carcinoma gástrico e no coriocarcinoma, observa-se uma reduzida expressão deste fator de transcrição (BASS et al. 2009). Em carcinoma de células escamosas, as amplificações desses genes têm frequentemente como alvo a região do gene SOX2, assim ele é considerado um oncogene (STEVANOVIC et al. 1994). Estudos envolvendo populações de células tumorigênicas têm demonstrado a expressão anômala de fatores de transcrição relacionados à autorenovação de células embrionárias, como *Octamer-bindingtranscriptionfactor4* (OCT4), SOX2 e Nanog, e seu envolvimento na carcinogênese de vários tipos de câncer (JI e ZHENG 2010; SILVA 2017) (Figura 4).



Fonte: REN et al. (2016).

Figura 4 - A proteína SOX2 afeta numerosos processos de células cancerígenas.

A expressão de SOX2 no carcinoma de células escamosas do esôfago e do pulmão levou ao aumento da proliferação e da diferenciação de células basais e indução de células-tronco tumorais pluripotenciais. Por sua vez, JI e ZHENG (2010) evidenciaram a expressão de SOX2 no câncer do colo do útero e observaram um aumento da proliferação, da clonogenicidade e da tumorigênese *in vivo* e *in vitro*. GEN et al. (2013) demonstraram que o SOX2 promove o crescimento de tumores *in vivo* no CEC por meio da ativação da AKT e da sinalização via mTORC1, que promove a proliferação celular, essencial para regulação e auto renovação de vários tipos de células-troncos. O SOX2, por sua vez, também desempenha papel oncogênico na formação de carcinoma escamoso de diversos órgãos, incluindo o esôfago, sendo o SOX2 predominantemente expresso em células progenitoras basais do epitélio estratificado (WATANABE et al. 2014).

A elevada expressão de SOX2 nas células basais expande a população progenitora de células tumorais do esôfago e do estômago. Esses achados indicam que células-tronco/progenitoras basais são de origem do carcinoma de células escamosas, sendo necessária a cooperação entre SOX2 e *Signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) no microambiente tumoral para o início do processo de carcinogênese associada à SOX2 (GEN et al. 2013).

1.2.2 Fatores de transcrição *Signal transducer and activator of transcription* (STAT)

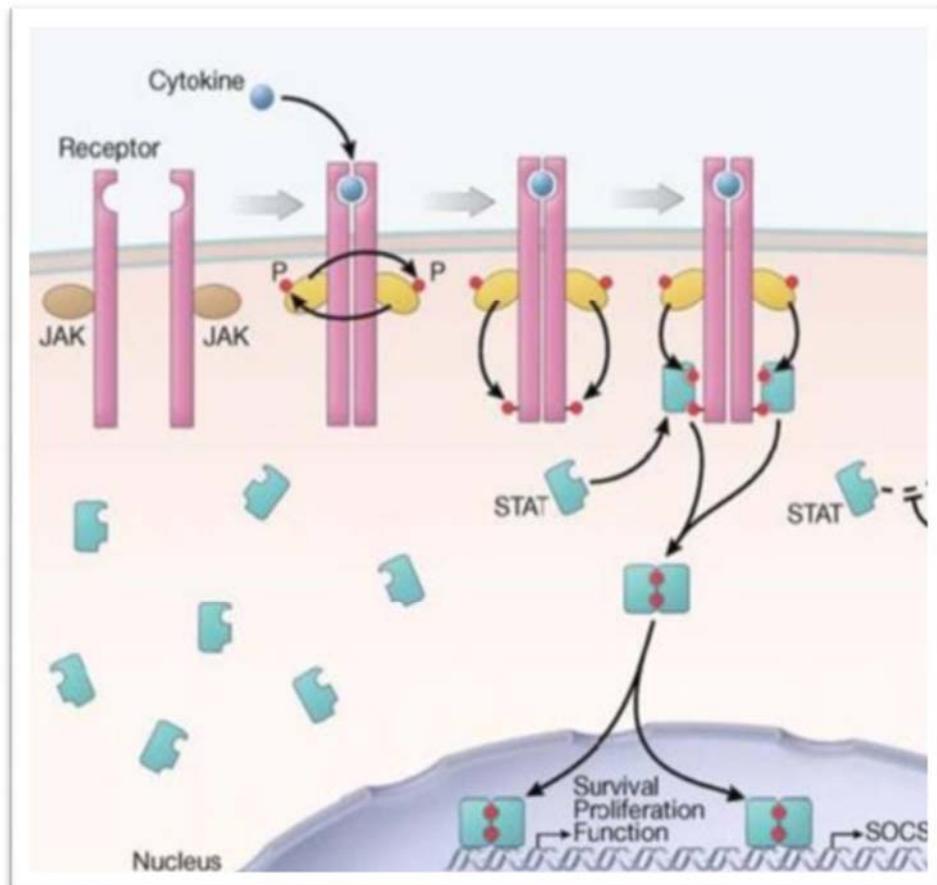
Os fatores de transcrição STATs são frequentemente ativados por meio da fosforilação da tirosina e, em seguida, são convertidos, na sua forma ativa, como fosforilada (pSTATs) (DARNELL 1997). As proteínas da família STAT são fatores de

transcrição citoplasmática e pertencem a uma família altamente conservada de proteínas, compreendendo sete membros: STAT1 a STAT4, STAT5a, STAT5b e STAT6 (DARNELL et. al. 1994; DARNELL 1997). Nas células em repouso, STATs geralmente estão localizados no citoplasma em seu estado inativo. A fosforilação de resíduos específicos de tirosina é um passo para a ativação do STAT.

Uma vez ativado, o STAT dimeriza para outros STATs por interação de fosfotirosina *Src homology 2* (SH2), levando a sua translocação para o núcleo seguido por sua ligação aos elementos intensificadores específicos para iniciação de transcrição. A ativação do STATs ocorre pela interação de citocinas ou fatores de crescimento junto aos receptores de membranas, permitindo que os fatores *Janus kinase* (JAKs), associados ao receptor, ativem-se mutuamente por meio da transfosforilação, fosforilando resíduos de tirosina localizados nas regiões citoplasmáticas dos receptores de citocinas. As proteínas STAT estão localizadas nessas regiões fosforiladas, permitindo que dimerizem através da fosforilação mediada por JAK. Os pSTATs dimerizados translocam-se para o núcleo, onde se ligam a regiões gênicas específicas, resultando na ativação ou repressão de genes alvo (PALMER e RESTIFO 2009). Essas proteínas são fundamentais nas funções fisiológicas desde a fase embrionária e estão envolvidas no desenvolvimento e na diferenciação celulares, na resposta imune e na organogênese (LEVY 1999) (Figura 5).

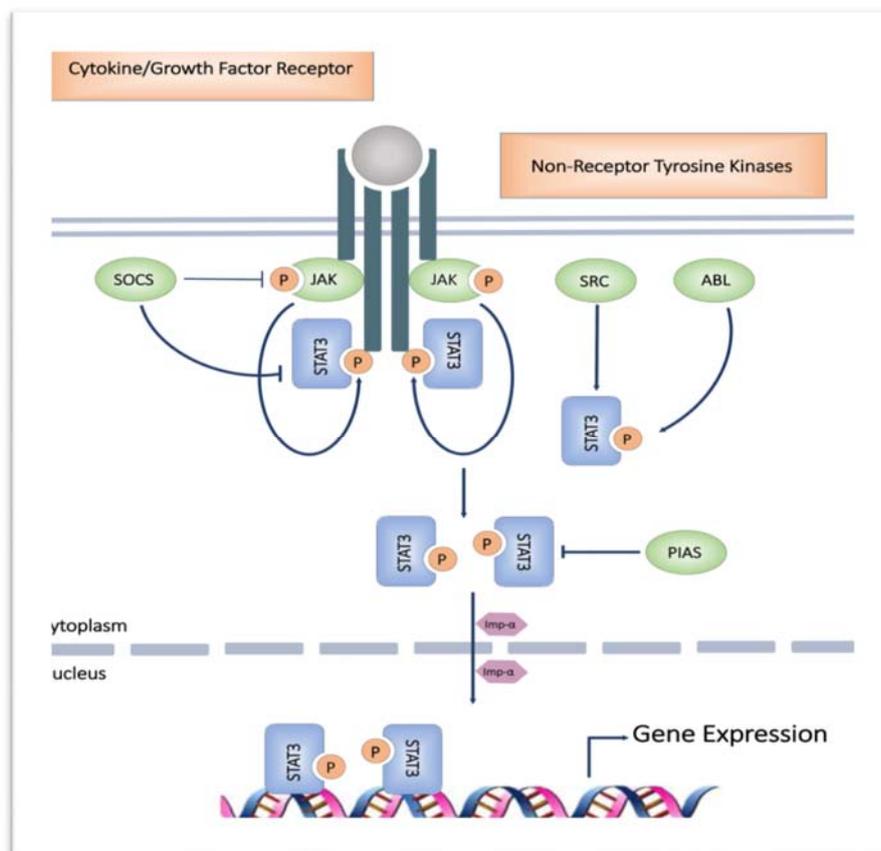
Entre os membros da família STAT, o STAT3 se liga às várias vias moleculares vitais envolvidas na progressão do câncer. Em circunstâncias normais, a sinalização de STAT3 é baixa, devido à inibição intrínseca pela ativação dos inibidores *Protein inhibitor of activated STAT* (PIAS) e *Suppressors of cytokine signaling* (SOCS). Uma

vez que o JAK é ativado, o STAT3 é recrutado e fosforilado. Subsequentemente, o STAT3 sofre fosforilação, dimerização, translocação nuclear e ligação ao DNA, o que eventualmente leva à transcrição de genes alvo (Figura 6) (WANG et. al. 2018).



Fonte: PALMER e RESTIFO (2009)

Figura 5 - Ativação de via JAK-STAT e indução da transcrição gênica após estimulação por citocinas.



Fonte: WANG et. al. (2018)

Figura 6 - Ativação constitutiva de STAT3 em tumores humanos.

Atualmente, está bem estabelecido que STAT3 é constitutivamente ativada em muitos tumores humanos (DARNELL 2005), sendo uma importante via intrínseca que interfere em muitos processos celulares, incluindo proliferação, invasão, angiogênese e metástase no câncer (YU et al. 1995, 2009). Como um oncogene, STAT3 é o ponto de convergência para muitas vias de sinalização desencadeadas por citocinas, fatores de crescimento ou várias oncoproteínas. O STAT3 ativado previne a apoptose de células tumorais no mieloma múltiplo, aumentando a expressão das proteínas *B-cell lymphoma-2-like 1* (BCL-XL) (BROMBERG e DARNELL 2000).

O pSTAT3 pode desencadear a expressão gênica que modula adicionalmente os comportamentos biológicos celulares, incluindo o ciclo celular, a transição epitelial-

mesenquimal, a resposta inflamatória e a angiogênese (CHEN et al. 2008). Alguns estudos indicam que a alternância de expressão de p-STAT3 em amostras de tumores foi associada ao prognóstico de várias doenças malignas humanas, como câncer de mama, câncer de pulmão e linfoma (TYE et al. 2012).

Foi demonstrado que o aumento de expressão de p-STAT3 poderia prever significativamente um resultado desfavorável em pacientes com câncer colorretal, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular, câncer de esôfago e câncer pancreático (CHEN et al. 2008; BOLLRATH et al. 2009; STARK e DARNELL 2012; TYE et al. 2012; DODD et al. 2014). Além disso, durante estudo conduzido por SIVEEN et al. (2015), observou-se que a presença do STAT3 na célula tumoral, quando ativado pelas vias de sinalização autócrinas e parácrinas, eleva o nível de genes antiapoptóticos e proteínas do ciclo celular, tornando o tumor resistente a tratamentos quimioterápicos.

1.2.3 Marcadores de superfície celular CD44 e CD24

As células-tronco tumorais (do inglês *Cancer stem cells-CSCs*) podem ser definidas como uma população de células presentes nos tumores, que podem sofrer autorenovação e diferenciação. Semelhante às células-tronco normais, as CSCs também podem dar origem a todas as células tumorais e participam na iniciação e manutenção do tumor, além de sua capacidade de invasão, metástase, heterogeneidade e resistência terapêutica. A identificação e o isolamento dessas CSCs usando marcadores de superfície têm sido uma prioridade nas pesquisas de câncer (JAGGUPILLI e ELKORD 2012).

A definição de marcadores de superfície específicos para CSC em todos os tipos de câncer, no entanto, requer mais investigações. As neoplasias malignas não

apresentam o mesmo tipo de formação e progressão, entretanto os cientistas têm demonstrado que uma grande parte de tumores segue a hipótese das CCS. Com o avanço do conhecimento neste conceito, os marcadores de superfície de células-tronco tumorais conhecidos são CD44, CD24, CD133, CD166, EpCAM em tumores diferentes, incluindo câncer de mama, pulmão, pâncreas, próstata, colorretal, renal e ovário (JAGGUPILLI e ELKORD 2012).

O CD44 é uma glicoproteína transmembranar de classe I multifuncional que geralmente atua como um receptor específico para o ácido hialurônico, promovendo a migração em células normais e altamente expresso em quase todas as células cancerígenas no seu padrão ou forma variante (PONTA et al 2003; NAOR et al. 2008). Está principalmente associada a proteínas que monitoram as mudanças extracelulares e críticas na regulação da adesão celular, proliferação, crescimento, sobrevivência, motilidade, migração, angiogênese e diferenciação (NAOR et al. 2008). Além disso, o CD44 apresenta citocinas e quimiocinas como cortesia, receptores na membrana celular (NAOR et al. 2008). O CD44 é expresso na superfície da célula tumoral e auxilia na disseminação hematogênica, ao interagir com as moléculas de adesão P-selectinas e L-selectinas (NAPIER et al. 2007).

A glicoproteína de superfície celular CD44 constitui uma das proteínas presentes no microambiente tumoral a qual participa do processo de metástase, e sua função é promover interação célula-célula, adesão e migração celular na forma de receptor de membrana e livre no plasma, estando presente nos leucócitos e nas células-tronco tumorais, o que sugere que a CD44 seja um marcador fenótipo de células-tronco tumorais (HONETH et al. 2008).

CHUNG et al. (2013) mostraram que CD44 é um marcador para carcinoma de

células escamosas de tumor de cabeça e pescoço e que células-tronco tumorais que expressam CD44 têm a capacidade de iniciar o processo de carcinogênese. Já foi descrita a associação da elevada expressão de CD44 com a agressividade do tumor, sendo um fator prognóstico de carcinoma epidermoide na faringe e laringe.

A expressão elevada de CD44 foi observada em células tumorais molecularmente heterogêneas, com vários subconjuntos de células indiferenciadas que apresentam características de células-tronco, oriundas do resultado da transição epitelial mesenquimal (KOKKO et al. 2011).

A transição epitelial mesenquimal é necessária para a morfogênese do tecido durante o desenvolvimento embrionário e, durante esse processo, sofre regulação por uma diversidade de citocinas e fatores de crescimento. É possível identificar que, na ocorrência da progressão tumoral, as atividades destas citocinas e fatores de crescimento tornam-se desreguladas, resultando na aquisição de propriedades invasivas e metastáticas. Evidências recentes indicam que a transição epitelial mesenquimal de células tumorais não só provoca aumento de metástase, mas também contribui para a resistência de fármacos. O mecanismo da associação entre a indução da transição celular epitelial e o surgimento das células-tronco tumorais, contudo, necessita ser mais bem compreendido e elucidado (SINGH e SETTLEMAN 2010).

MOURA et al. (2015) observaram a associação da expressão de isoformas de CD44 no câncer de próstata com recidiva, sendo considerada como fatores prognósticos, quando comparada à baixa expressão dessa molécula na hiperplasia benigna de próstata. Esses autores mostraram que, no câncer de próstata, havia uma elevada expressão da maioria das isoformas do CD44. Esses autores demonstraram uma perda de expressão de todas as isoformas do CD44 na progressão do câncer de

próstata. A compreensão dos padrões de expressão do CD44 no câncer de pênis poderia contribuir para seu uso como um novo marcador prognóstico.

Alguns autores mostraram no câncer de mama que o implante de cerca de 100 células com fenótipo CD44⁺ e CD24⁻ foi capaz de formar tumores primários e secundários, enquanto o mesmo efeito não foi obtido com o implante de dezenas de milhares de células tumorais sem a presença desse fenótipo (AL-HAJJ et al. 2003; PINHO 2009).

Os tumores epiteliais contêm células estamonais cancerígenas, que possuem uma propriedade única de auto renovação e diferenciação. No câncer de cavidade oral, o biomarcador de moléculas de superfície celular foi estudado para identificação desta população altamente tumorigênica. Implícito é o papel do CD44 na definição de CSCs, mas o do CD24 não é bem explorado. GHUWALEWALA et al. (2016) analisaram em células de CEC, as quais não expressam genes relacionados às células-tronco, mas também exibem características de transcrição epitelial para mesenquimal (EMT). Essa população de CD44^(high)CD24^(low) dá origem a todos os outros tipos celulares após a diferenciação. Fenótipos típicos de células-tronco do câncer (CSC) com aumento da formação de esferas, migração e invasão também foram confirmados em células CD44^(high)CD24^(low).

Também foram encontrados transportadores de drogas super expressos em CD44 CD44^(high)CD24^(low), contribuindo, assim, para a elevação da resistência à quimioterapia. Para validar os achados *in vivo*, determinou-se que a expressão do CD44 foi consistentemente alta, enquanto o CD24 apresentou expressão significativamente menor nos tecidos tumorais. Além disso, o perfil de expressão gênica da população de CSC e não CSC desvenda as vias moleculares que podem contribuir para a formação

de células-tronco tumorais. Conclui-se, então, que o CD44^(high)CD24^(low) representa células-tronco tumorais no CEC de cavidade oral (GHUWALEWALA et al. 2016).

O marcador CD24 é uma pequena molécula expressa na superfície celular glicosilada e promove as interações entre as células e a célula-matriz. O marcador CD24 foi descrito como muito expresso em cânceres de ovário, mama, próstata, bexiga, rins, entre outros, estando envolvido na adesão celular e metástase (LEE et al. 2010; KRISTIENSEN et al. 2003). Isso indica que o CD24 pode ser um marcador significativo no diagnóstico e no prognóstico no câncer. Funcionalmente, é identificado como um ligante alternativo para P-selectina um receptor de adesão presente em plaquetas e células endoteliais (AIGNER et al. 1998) e sua interação facilita a passagem de células tumorais para o sangue periférico durante a metástase.

As associações metastáticas do CD24 aumentam sua importância como fator prognóstico e marcador de CSC (LEE et al. 2010). Em linhagens de câncer colorretal, 0,5% a 1% das células CD44⁺/CD24⁺ originaram a maior proporção de megacolônias formadoras de criptas e diferenciadas para todas as combinações de CD44[±]/CD24[±] (SAHLBERG et al. 2014).

A associação da expressão de células SOX2⁺ e CD44⁺ na formação de tumores indiferenciados e metastáticos foi demonstrada em estudo *in vitro* realizado com linhagens celulares que apresentam características clínico-patológicas desfavoráveis (HUANG et al. 2014). RIZZINO (2013) evidenciaram a interação de SOX2, OCT4, *Krüppel-likefamily* (KLF4) e c-MYC com desenvolvimento de células somáticas potencialmente capazes de se tornarem tumores indiferenciados.

CHOU et al. (2013) mostraram uma relação entre receptores de membrana, como o CD44, ativando fatores de transcrição, os quais são proteínas intracelulares

que participam da sinalização, ativação e produção de fatores de crescimento fundamentais para diferenciação e proliferação celular. Esses fatores de transcrição estão envolvidos nos mecanismos de carcinogênese e das metástases, são eles os responsáveis pelos processos de divisão celular desordenada nos tumores malignos, após sua ativação pelo mecanismo de fosforilação com o STAT3, direcionando-se para o núcleo, e promovem a transcrição de proteínas capazes de aumentara capacidade tumoral de invasão e metástase como SOX2 (CHOU et al. 2013; CHUNG et al. 2013).

LIU et al. (2014) observaram um percentual mais elevado de células-tronco tumorais no carcinoma hepatocelular, CD24+ traduzidas como TWIST2. Essas células exibiram uma expressão aumentada de marcadores de células-tronco tumorais, dentre eles, SOX2 e CD24, com uma capacidade maior de renovação. Já a redução de CD24 em células HepG2/TWIST2 diminuiu os níveis de SOX2, STAT3 e inverteu os fenótipos de células-tronco tumorais, induzida pela expressão alterada do TWIST2. A via TWIST2, CD24 e STAT3 desempenha um papel fundamental na regulação das células-tronco tumorais no câncer de fígado, e esse conhecimento proporciona uma abordagem terapêutica específica para células-tronco tumorais no carcinoma hepatocelular (LIU et al. 2014).

1.3 SISTEMA IMUNE E CÂNCER

Até o final dos anos 1990, os pesquisadores focavam em estudos do câncer considerando essa doença de base estritamente genética, conforme proposto no início dos anos 2000 por HANAHAN e WEINBERG, que elencaram seis características que definiam a célula como tumoral. Essas características são a capacidade de proliferação sustentada, resistência à morte, indução de angiogênese, imortalidade replicativa, propriedades invasivas e metastáticas e ausência de supressão do crescimento.

A partir dos anos 2000, com o crescente conhecimento do câncer como doença sistêmica, novos estudos se dirigiram da célula neoplásica para o hospedeiro e o microambiente onde o tumor cresce. Nesse sentido, as células do sistema imunológico surgem com um papel fundamental. Em 2011, HANAHAN e WEINBERG propuseram um novo modelo com quatro novas características do câncer. Duas delas destacam a interação entre o câncer e o sistema imunológico: a primeira é a capacidade de evasão da célula neoplásica, apta a inibir a destruição pelo sistema imune; a segunda é a inflamação crônica, que tem um potencial para promover o crescimento tumoral (HANAHAN e WEINBERG 2011).

1.3.1 Imunidade inata

O sistema imune é responsável pela defesa do organismo contra antígenos infecciosos ou não, e a imunidade inata é a primeira linha de defesa que se caracteriza por uma resposta rápida e inespecífica. A imunidade inata é composta por células fagocíticas (neutrófilos, monócitos e macrófagos), células Natural Killer (NK), células linfoides inatas, proteínas do sistema complemento, citocinas e quimiocinas

(JANEWAY et al. 2001).

Os neutrófilos e monócitos/macrófagos têm a fagocitose como principal mecanismo de defesa contra os patógenos extracelulares como também a produção de mediadores inflamatórios que promovem a migração celular para o local do processo infeccioso (CRUVINEL et al. 2010). O processo fagocítico pode ser separado em etapas: quimiotaxia (migração de fagócitos para os sítios inflamatórios); ligação do patógeno à membrana dos fagócitos; ingestão; e morte intracelular dependente ou não de *reactiveoxy genspecies* (ROS) (WEISS e SCHAIBLE 2015). Além da função microbicida, os macrófagos interagem com a imunidade adaptativa por meio da apresentação de antígenos aos linfócitos T efetores e liberação de citocinas que ampliam a resposta imune celular (CRUVINEL et al. 2010).

1.3.2 Imunidade adaptativa

A imunidade adaptativa está associada à resposta específica e de memória, cujos componentes celulares apresentam um amplo repertório de reconhecimento de antígenos. Pode ser dividida em resposta imune celular, cujos principais componentes são os linfócitos T CD4+ e T CD8+, e resposta imune humoral, sendo os linfócitos B e anticorpos os principais componentes (MESQUITA JUNIOR et al. 2010).

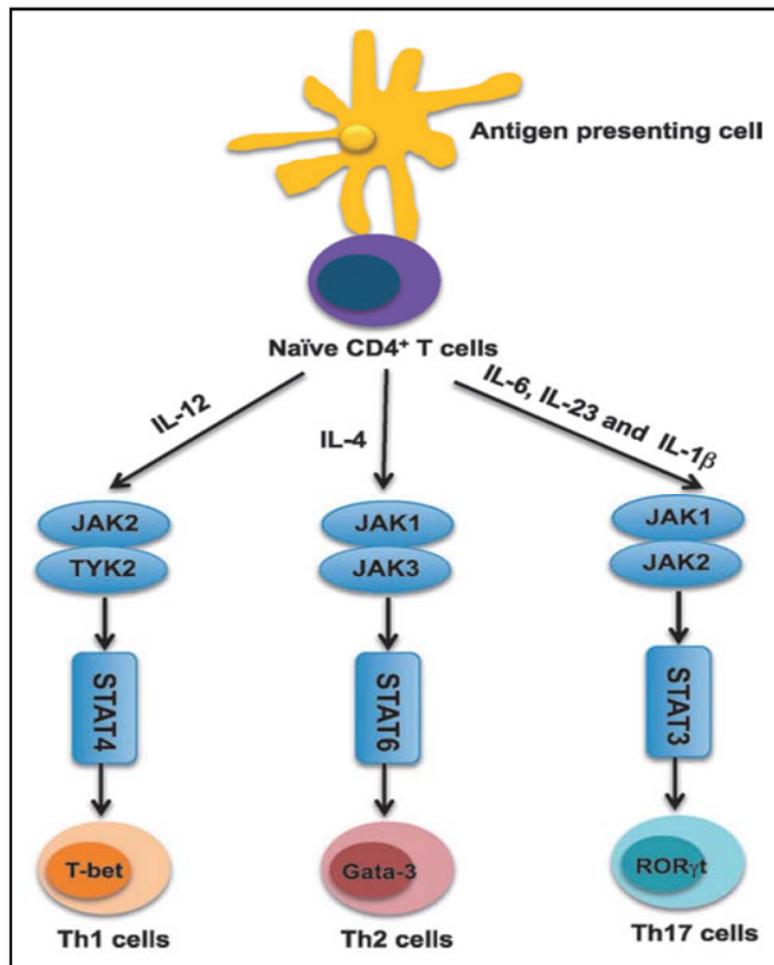
Estudos sobre a interação câncer e sistema imune demonstraram que tanto o sistema imune inato quanto o adaptativo participam de mecanismos de reconhecimento e controle tumoral (DRANOFF 2004; NAGARAJAN e MCARDLE 2018). Para ativação da resposta imune celular, as células dendríticas residentes no tecido após capturar os antígenos migram para os linfonodos, que drenam a região onde se localiza o tumor, e apresentam os mesmos para células T. Com isso, promovem

a ativação dos linfócitos TCD4+, também chamados de células T auxiliares (T helper - Th), que podem se diferenciar em células efetoras Th1, Th2, Treg ou Th17.

Ainda no processo de reconhecimento antigênico, células TCD8+ são ativadas, conhecidas como linfócitos T citotóxicos (CTL), e são capazes de promover a análise de células tumorais. Dependendo do tipo de resposta, o infiltrado poderá resultar em eliminação do tumor - resposta antitumoral - ou favorecimento do crescimento tumoral - resposta pro-tumoral (BURKHOLDER et al. 2014; NAGARAJAN e MCARDLE 2018).

Algumas vias de sinalização intracelular são fundamentais para a diferenciação dos linfócitos T (TCD3+). A sinalização JAK / STAT é crítica para a diferenciação de células T CD4+. A diferenciação de linfócitos TCD4+ em células Th1 é induzida por IL-12 por meio da ativação da via JAK2 / STAT4; em Th2, é induzida por IL-4 via ativação de JAK1/3 e STAT6, e, em Th17, é induzida pelas IL-6 e IL-23, que sinalizam JAK1/2 e STAT3 (BENVENISTE et al. 2014) (Figura 7). A ativação dos linfócitos T via STAT3 é fundamental para diferenciação de células Th17, e, por sua vez, essas células têm a função de cicatrização e regeneração tecidual (PICKERT et al. 2009; BACKERT et al. 2014).

Por outro lado, no câncer, STAT3 pode promover evasão da resposta imune, crescimento celular, proliferação, sobrevivência, metástase e angiogênese. Isso é agravado pelos efeitos imunossupressores que o STAT3 confere às células do sistema imune inato e do adaptativo. A atividade de STAT3 em células dendríticas compromete a maturação, a ativação e a apresentação de antígeno, o que leva à supressão das respostas antitumorais (HUYNH et al. 2019).

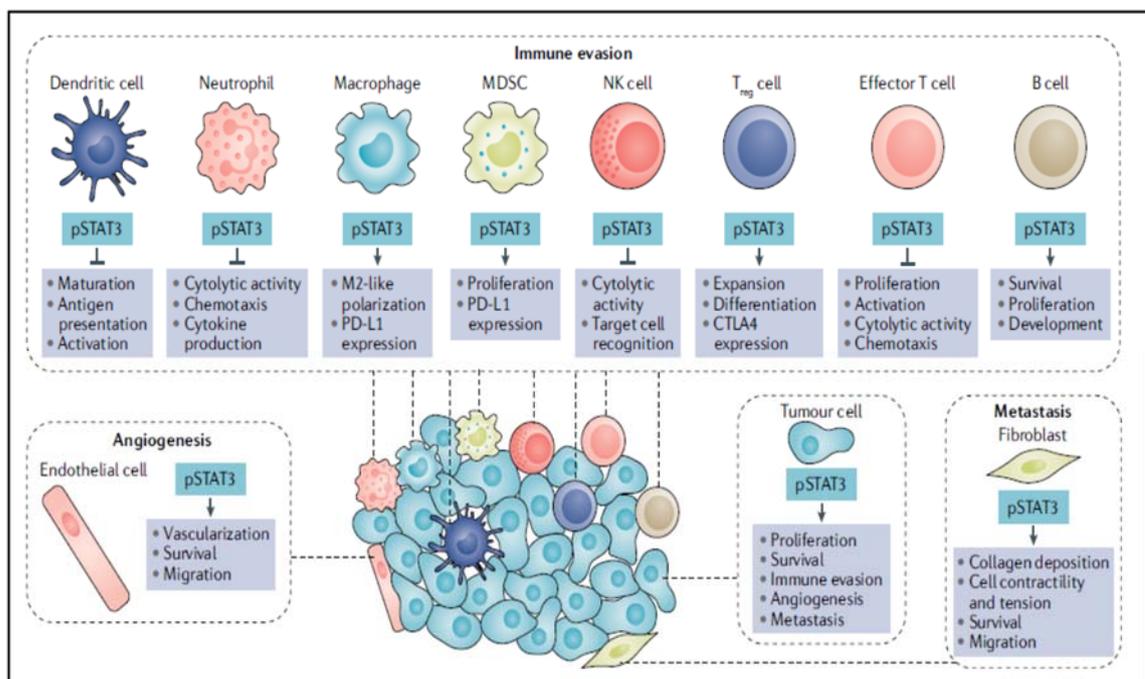


Fonte: BENVENISTE et al. (2014)

Figura 7 - A sinalização JAK / STAT é crítica para a diferenciação de células T CD4⁺.

Pela ativação do STAT3, as células TCD8⁺ também podem adquirir um fenótipo imunossupressor, o que limita a ação citotóxica antitumoral dessas células. A polarização de macrófagos em subtipo M2 é favorecida pela ativação de STAT3, como a sinalização STAT3 promove a proliferação de células supressoras derivadas de mielóides imunossupressoras (MDSCs). A ativação de STAT3 também leva ao acúmulo de células T reguladoras (Treg), que são imunossupressoras, favorecendo o crescimento tumoral. O desenvolvimento, a proliferação e a sobrevivência de células

B induzidas por STAT3 também promovem tumorigênese. A remodelação do estroma tumoral é mediada por fibroblastos, devido à sinalização via STAT3 em células tumorais e fibroblastos, promovendo a produção e a deposição de matriz extracelular. Os fatores angiogênicos liberados por células tumorais, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), também são produzidos pela ativação de STAT3 e atuam no endotélio celular com aumento da vascularização do tumor (Figura 8) (HUYNH et al. 2019).



Fonte: HUYNH et al. (2019)

Figura 8 - A sinalização STAT3 fosforilada (pSTAT3) no microambiente tumoral.

2 JUSTIFICATIVA

Apesar das evidências demonstradas do desenvolvimento do câncer e das metástases, e ainda de as expressões de SOX2, STAT3, CD24 e CD44 em outros tipos de câncer de células escamosas estarem significativamente associadas a um comportamento mais agressivo da doença, existem poucos estudos pertinentes a este tema envolvendo o câncer de pênis.

Com efeito, a história natural do câncer escamoso de pênis apresenta-se de forma distinta. Alguns pacientes desenvolvem a doença de forma mais agressiva, visto que, em curto tempo, observa-se grande desenvolvimento de metástase com doença linfonodal em poucos meses após o surgimento da lesão primária. Outros pacientes evoluem de forma mais lenta, com o desenvolvimento de metástases após anos do surgimento dos primeiros sinais da doença. Embora vários fatores tenham sido relacionados com a carcinogênese do pênis, os mecanismos moleculares deste processo ainda são pouco conhecidos. De modo particular, até o presente momento, ainda não foram publicados estudos com avaliação de biomarcadores em pacientes de Pernambuco e em outras regiões do Nordeste.

Estima-se que a condução do presente estudo forneça valiosos subsídios para a implementação de condutas e protocolos de acompanhamento, além de estabelecer critérios distintos de avaliação das ações de promoção e prevenção, relacionadas ao tratamento do câncer de pênis.

3 OBJETIVOS

- 1 Avaliar os níveis de células CD44^{high}/CD24^{low} e TCD3+ e da expressão dos fatores de transcrição SOX2 e STAT3 no carcinoma escamoso de pênis;
- 2 Correlacionar os níveis de células CD44^{high}/CD24^{neg} e TCD3+ com expressão de STAT3 e SOX2 entre o sangue periférico e o tecido tumoral;
- 3 Associar os níveis de células CD44^{high}/CD24^{neg} e TCD3+ e expressão de STAT3 e SOX2 com as características clínicas dos pacientes.

4 MATERIAS E MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDO, LOCAL E PERÍODO E ASPECTOS ÉTICOS

Estudo transversal realizado no Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP) e Laboratório de Pesquisa Translacional do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), no período de março de 2015 a dezembro de 2017.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Câncer de Pernambuco sob o número CAAE nº 44832015.2.0000.5205 (Anexo 1), seguindo a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde. Todos os participantes foram incluídos no estudo após assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE - Apêndice 1).

4.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foram 38 pacientes com diagnóstico histológico de carcinoma escamoso de pênis e idade acima de 18 anos.

O grupo-controle foi composto por 15 voluntários do sexo masculino com idade acima de 18 anos, assintomáticos e sem histórico pregresso ou familiar de câncer, sendo eles acompanhantes dos pacientes e funcionários do HCP os quais concordaram em participar do estudo.

4.3 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

4.3.1 Critérios de inclusão

- Idade acima de 18 anos;
- Pacientes submetidos a estadiamento por exame clínico, radiológico ou anatomopatológico;
- Pacientes submetidos a tratamento cirúrgico;
- Análise histopatológica do tumor realizada por dois patologistas.

4.3.2 Critérios de exclusão

- Pacientes com diagnóstico de infecção por HIV, hepatites virais e HTLV;
- Pacientes sem história de outros tumores.

4.4 PROCEDIMENTOS DE CAPTAÇÃO DE PACIENTES E CONTROLES

Os pacientes foram incluídos no estudo após o consentimento em participar do estudo e a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Apêndice 1). Foram identificados 68 pacientes com câncer de pênis com idade acima de 18 anos; destes, 30 pacientes foram excluídos do estudo por não preencherem os critérios de inclusão (avaliação histológica da biopsia realizada por dois patologistas). A confirmação diagnóstica de tumor de pênis foi realizada pelo patologista Dr. Sérgio Ricardo Soares de Moura, do laboratório de anatomopatologia do HCP por meio da biopsia do tecido. Os 38 pacientes incluídos tiveram uma segunda análise histológica

da biópsia tumoral realizada pelo patologista Prof. Dr. Fernando Augusto Soares. A coleta dos dados clínicos foi realizada por meio da ficha clínica padronizada para o estudo (Apêndice 2). Quando necessário, foi realizada busca dos prontuários para obtenção de informações clínicas adicionais. Dos 38 pacientes incluídos, 6 foram a óbito pela doença, no período do estudo de março de 2015 a dezembro de 2017.

O grupo-controle foi constituído de voluntários do sexo masculino, acompanhantes dos pacientes e funcionários do HCP os quais concordaram em participar da pesquisa, após avaliação clínica para selecionar os participantes elegíveis, seguindo os critérios de inclusão para os controles com idade de 18 a 65 anos, os quais foram: ausência de uso prolongado de imunossupressores; ausência de história clínica de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana 1 e 2 (HIV 1 e 2) e vírus linfotrópico humano 1 e 2 (HTLV 1 e 2); ausência de história clínica de infecção nos últimos 30 dias e no momento da coleta de sangue periférico; ausência de história clínica de hepatites virais e de doença autoimune; e ausência de história prévia de qualquer doença crônica. Detalhes no fluxograma de captação dos pacientes e controles (Figura 9).

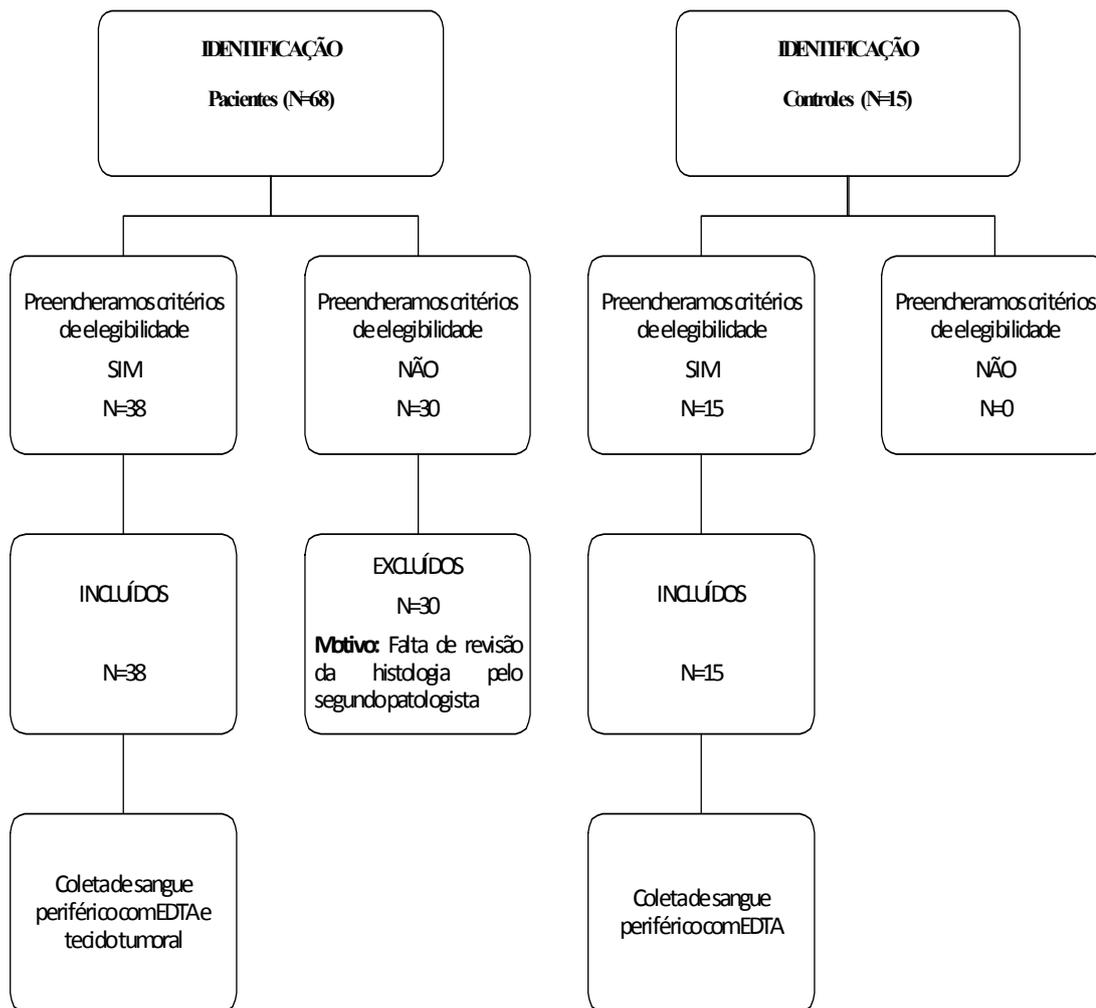


Figura 9 - Fluxograma de captação dos pacientes e controles

4.5 DEFINIÇÃO DOS TERMOS E VARIÁVEIS

As variáveis foram coletadas na consulta clínica ou conforme informação obtida no prontuário do paciente, incluindo exames complementares e fichas de procedimentos.

Quadro 1 - Definição e categorização das variáveis clínicas

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO OPERACIONAL	CATEGORIZAÇÃO
Localização do tumor	Localização do tumor pelo cirurgião	Variável nominal policotômica Glande Prepúcio Corpo do pênis Haste do pênis
Tumor (T)	TX: tumor primário não pode ser avaliado; T0: Não há evidência de tumor primário; Tis: tumor intraepitelial sem invasão da lâmina própria (carcinoma <i>in situ</i>); Ta: Carcinoma verrucoso não invasivo; T1: tumor invade a lâmina própria, muscular mucosa ou submucosa; T1a: O tumor invade tecido conjuntivo subepitelial, sem invasão linfovascular ou de alto grau; T1b: O tumor invade tecido conjuntivo subepitelial, com invasão linfovascular ou de alto grau; T2: Tumor invade o corpo esponjoso ou cavernoso; T3: Tumor invade invasão de uretra; T4: Tumor invade estruturas adjacentes.	Variável nominal policotômica Tis T1 T2 T3 T4
Linfonodos (N)	Nx: linfonodos regionais não podem ser avaliados; N0: Ausência de metástases nos linfonodos regionais; N1: Metástase em um único linfonodo inguinal; N2: Metástase múltipla ou bilateral em linfonodos regionais; N3: Metástases com extensão extranodal ou metástases em linfonodos pélvicos.	Variável nominal policotômica N0 N1 N2 N3
Metástase (M)	Presença de metástases a distância.	Variável nominal dicotômica Não 2. Sim
Estadiamento clínico	Tis: N0, M0. pT1: a. N0, M0. b. N2, M0; T2, N1, M0; T3, N0, M0. pT2: T1, T2, N3, M0, N1, M0. pT3: T1, T2, N3, M0, N2, M0. pT4. Qualquer T, N3, M0; T4, qualquer N, M0; Qualquer T, qualquer N, M1.	Variável nominal policotômica Tis pT1 pT2 pT3 pT4
Grau histológico	G1 - bem diferenciado (baixo grau); G2 - moderadamente diferenciado (grau intermediário); G3- pouco diferenciado (alto grau); G4 - indiferenciado (alto grau).	Variável nominal policotômica GX G1 G2 G3 G4

Cont/ Quadro 1

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO OPERACIONAL	CATEGORIZAÇÃO
Invasão angiolímfática	De acordo com a descrição microscópica, foi observada invasão vascular (invasão dos vasos sanguíneos ou angiolímfática).	Variável nominal dicotômica Não 2. Sim
Invasão perineural	De acordo com a microscopia, é definida como sendo a invasão de células cancerosas ao longo da bainha de mielina.	Variável nominal dicotômica 1. Não 2. Sim
Status de sobrevida	Estado vital por ocasião do término do estudo	Variável nominal dicotômica -Óbito -Sobrevivente

4.6 TESTES LABORATORIAIS**4.6.1 Coleta de amostra biológica**

O volume de 4 mL de amostra de sangue venoso dos pacientes antes do tratamento cirúrgico foi coletado em tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA (BD Vacutainer®) e mantido à temperatura ambiente (24 °C). O tempo entre a coleta e o processamento foi de até 60 minutos. Antes do processamento, o tubo com amostra de sangue foi colocado no equipamento homogeneizador (BD Bioscience) e, em seguida, foi analisado por citometria de fluxo. Também foi realizada a coleta de tecido tumoral durante o procedimento cirúrgico, sendo retirados dois pequenos fragmentos tumorais da peça cirúrgica para condução deste estudo. O fragmento foi armazenado em um frasco estéril, com solução contendo meio de cultura celular *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI), para análise de expressão de CD44^{high}/CD24^{low}, SOX2 e STAT3 no tecido por citometria de fluxo.

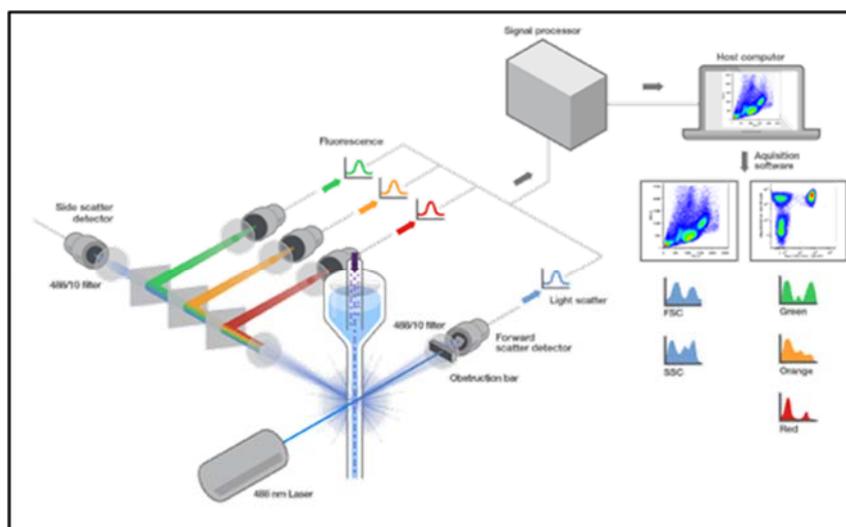
4.6.2 Digestão enzimática do tecido tumoral

Para análise no tecido tumoral, foi realizada a digestão enzimática com o objetivo de remover o estroma e liberar as células presentes no microambiente tumoral. As amostras de tecido coletadas em meio RPMI suplementado com penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich, USA) foram submetidas à digestão (dissociação) enzimática com colagenase I (Gibco, USA) para obtenção de suspensão celular, conforme instruções do fabricante. O tecido foi dividido em pequenos fragmentos (2 mm) com o auxílio de um bisturi estéril, os quais foram imersos na solução de colagenase I, na concentração de 2 mg/mL em *Hanks' Balanced Salt Solution* (HBSS). Em seguida, foram incubados em banho seco a 37 °C por duas horas, sob agitação. Após incubação, foram adicionados 2mL de Phosphate Buffered Saline (PBS, pH 7,4) e filtrado em filtro 35 µm (BD Falcon, BD Biosciences, USA), e a suspensão celular foi centrifugada a 250 x g por 5 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado, e o precipitado de células foi lavado com PBS e centrifugado a 250 xg por 5 minutos. Em seguida, o precipitado de células foi ressuscitado em 1 mL de PBS, e 100 µL foram retirados para realizar a análise das proteínas por citometria de fluxo.

4.6.3 Técnica de citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma tecnologia avançada e rápida que permite contar, examinar e classificar células individuais e medir simultaneamente múltiplos parâmetros, sendo de análise quantitativa. No citômetro de fluxo, o sistema de fluidos canaliza uma amostra de células em um único fluxo, para que as células passem, uma a uma, através de um feixe focalizado de um laser. À medida que cada célula passa através do feixe, as propriedades de dispersão da luz e a fluorescência são coletadas

pelo sistema óptico e direcionadas para vários detectores. Os sinais recebidos pelos detectores são então convertidos em valores numéricos pelo sistema eletrônico e analisados em software específico. Conforme uma célula passa por um feixe de laser, a luz é espalhada em direções diferentes, e dois parâmetros são definidos: tamanho de célula, representado pela dispersão direta da luz do laser (Forward Scatter - FSC); e complexidade celular (granularidade), representada por dispersão lateral da luz do laser (SideScatter - SSC). Essa informação é exibida visualmente em um gráfico de pontos (dotplot), em que cada ponto representa uma única célula, diferenciada pela forma como dispersam a luz e pela fluorescência, que é proporcionalmente direta à quantidade de moléculas expressas na célula. A Figura 10 apresenta uma visão geral da imunofenotipagem por citometria de fluxo.



Fonte: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center>

Figura 10 - Visão geral da imunofenotipagem por citometria de fluxo

4.6.4 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

A primeira etapa foi a análise das proteínas expressas na superfície celular (CD44, CD24 e CD3). As células foram fixadas com 100 μ L de BD Cytotfix/Cytoperm™ pré-aquecido e incubadas por 10 minutos a 37 °C. Em seguida, após centrifugação a 250 x g por 8 minutos, foram adicionados 5 μ L de anticorpos monoclonais anti-CD3+, anti-CD44 e anti-CD24 (BD Biosciences, USA). Os anticorpos monoclonais são conjugados a fluoróforos, como PE, FITC, PerCP e PECY-7, que diferem um do outro em relação à cor que emitem. Os anticorpos monoclonais têm especificidade para moléculas expressas na membrana e no interior das células, o que possibilita caracterizar leucócitos humanos e outras células humanas, bem como analisar suas funções. Essas moléculas são identificadas como “clusters of differentiation” (CD).

As proteínas STAT3 e SOX2 são expressas no interior das células (citoplasma e núcleo, respectivamente). Para detecção dessas proteínas, foi realizada a permeabilização das células, utilizando os reagentes BD™ Phosflow (BD Biosciences, USA). Após incubação de 20 minutos à temperatura ambiente e protegido da luz, as células foram permeabilizadas com 750 μ L de *Perm Buffer III* (BD Biosciences, USA) a 4 °C e incubadas por 30 minutos submergidas no gelo, protegidas da luz. Em seguida, as células foram lavadas com 3 mL de PBS, centrifugadas a 250 xg por 8 minutos, e o sobrenadante foi descartado. Foram realizadas 3 lavagens com PBS. Posteriormente, foi realizada a marcação intracelular com os anticorpos monoclonais anti-SOX2, anti-STAT3, sendo incubado por 40 minutos protegido da luz. Em seguida, uma nova etapa de lavagem foi realizada, o sobrenadante descartado e as células foram ressuspensas em 300 μ L de *Stain Buffer* e realizada aquisição no citômetro de fluxo. Após as

lavagens, foi realizada aquisição de 50.000 eventos celulares no equipamento FACSVERSE® (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA), e as análises foram realizadas no programa *FACSSUÍTE* (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA) e expressas em valores percentuais.

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

4.7.1 Análises descritivas e de associação

As informações das características clínicas dos pacientes foram registradas nas fichas de coleta (Apêndice 2) e armazenadas em uma planilha do Microsoft Excel®. A análise descritiva das características clínicas foi realizada por meio de medidas de tendência central (média e mediana) e de dispersão (desvio padrão, valores mínimo e máximo) para as variáveis quantitativas e de frequências absoluta e relativa para as variáveis qualitativas. Para a avaliação da distribuição das variáveis quantitativas, foi realizado o teste de *Shapiro-Wilk*. Para avaliar a associação entre as variáveis clínicas e os parâmetros celulares estudados com o desfecho de interesse, foi realizado o teste exato de Fischer. As variáveis quantitativas com distribuição não normal foram apresentadas em valores de mediana e intervalo interquartil (IQR: 25-75%). Teste não paramétrico de *Mann-Whitney* foi utilizado para comparação entre dois grupos. Foi adotado o nível de significância estatística de $p < 0.05$. A análise estatística foi realizada por meio do programa *graphpadprism v6.0* (Graphpad software, San Diego, CA).

4.7.2 Análise de Correlação

Para as análises de correlação, foi utilizado o teste não paramétrico de *Spearman* (distribuição não normal). Os níveis de correlação foram classificados segundo o valor do coeficiente (r) em desprezível (entre 0,00 e 0,3), baixo (entre 0,30 e 0,50), moderado (entre 0,50 e 0,70), alto (entre 0,70 e 0,90) e muito alto (entre 0,90 e 1,00), conforme ponto de corte descrito por MUKAKA (2012). Foi considerado significativo, quando se obteve um valor de $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada por meio do programa *graphpadprism v6.0* (Graphpad software, San Diego, CA).

5 RESULTADOS

5.1 DESCRIÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

A mediana de idade dos 38 pacientes com câncer de pênis avaliados foi 61 anos (37 - 80 anos). Conforme detalhado na Tabela 1, a maioria dos pacientes apresentou tumor localizado na glândula (76,3%), tipo histológico usual (71,0%), de grau 1 (86,8%), sem invasão vascular e perineural (86,8% e 68,4%, respectivamente). Com relação a metástases, 86,8% dos pacientes não apresentaram metástases. Com relação ao estadiamento, 55,3% dos pacientes apresentavam estágio pT2, seguido de pT1 (34,2%).

Tabela 1 - Distribuição das frequências absolutas e relativas das características clínicas de 38 pacientes com câncer de pênis. Hospital de Câncer de Pernambuco (2015-2017)

CARACTERÍSTICAS	N=38	%
IDADE (anos)		
Mediana (min-max)	61 (37-80)	
SÍTIO ANATÔMICO		
Haste peniana	1	2,6
Glande	28	73,7
Haste peniana e glande	4	10,5
Sem informação	5	13,2
TAMANHO DO TUMOR		
≤ 3,5	19	50,0
> 3,5	18	47,4
Sem informação	1	2,6
TIPO HISTOPATOLÓGICO*		
Usual	27	71,0
Verruciforme	3	8,0
Sem informação	8	21,0
GRAU		
G1	33	86,8
G2	3	7,9
G3	2	5,3
INVASÃO VASCULAR		
Sim	3	7,9
Não	33	86,8
Sem informação	2	5,3
INVASÃO PERINEURAL		
Sim	11	28,9
Não	26	68,4
Sem informação	1	2,7
METÁSTASES		
Sim	5	13,2
Não	33	86,8
ESTADIAMENTO		
Tis	1	2,6
pT1	13	34,2
pT2	21	55,3
pT3	3	7,9

5.2 ANÁLISE DOS NÍVEIS PERCENTUAIS DE CÉLULAS CD44^{high}CD24^{low}, CD44^{high}CD24^{low}pSTAT3⁺ E CD44^{high}CD24^{low}SOX2⁺ NOS PACIENTES E CONTROLES

Nas análises realizadas no sangue periférico de 38 pacientes e 15 controles, verificaram-se níveis percentuais elevados de células CD44^{high}CD24^{low} e de células CD44^{high}CD24^{low}SOX2⁺ e reduzidos de CD44^{high}CD24^{low}pSTAT3⁺ nos pacientes, quando comparados aos controles ($p < 0,05$; Figura 11).

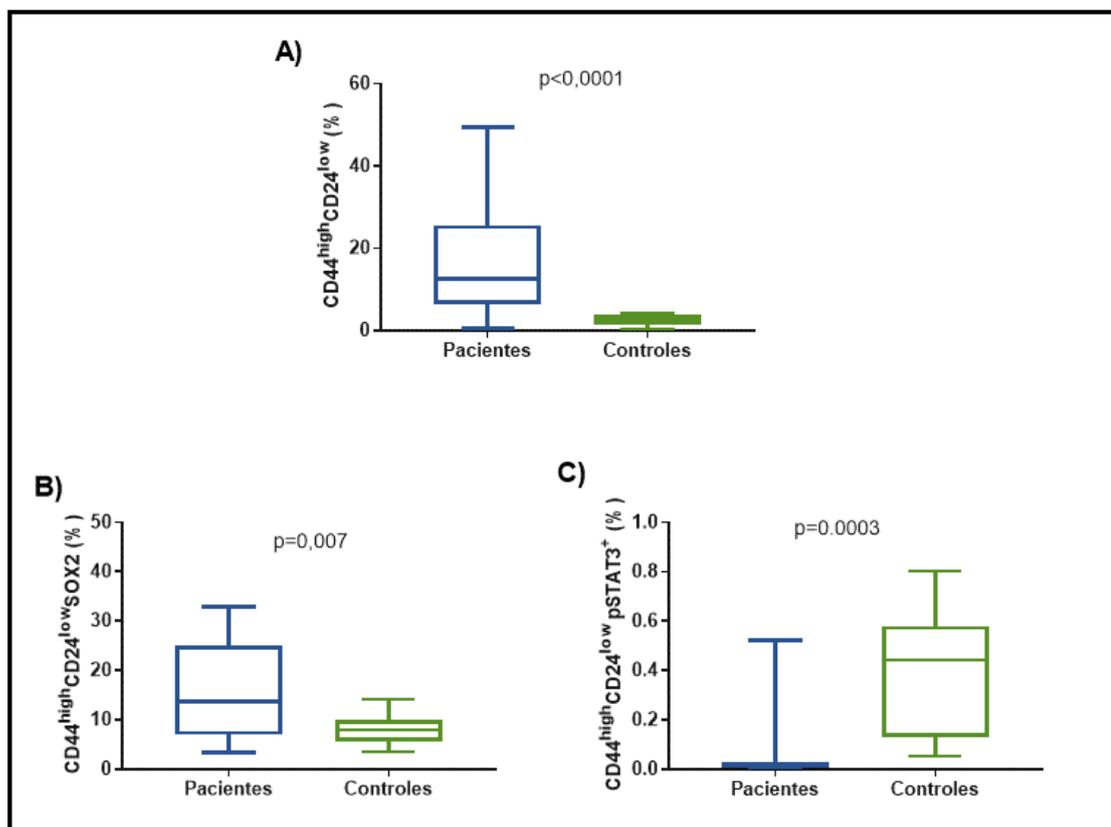


Figura 11 - Níveis percentuais de células CD44^{high}CD24^{low}, CD44^{high}CD24^{low}pSTAT3⁺ e CD44^{high}CD24^{low}SOX2⁺ no **sangue periférico** dos pacientes com carcinoma escamoso de pênis (n=38) e controles (n=15). Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25-75%). Foi considerado significativo $p < 0,05$.

5.3 NÍVEIS PERCENTUAIS DE CÉLULAS CD44^{high}CD24^{low}, CD44^{high}CD24^{low}pSTAT3⁺ E CD44^{high}CD24^{low}SOX2⁺ NO SANGUE PERIFÉRICO DE ACORDO COM AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Devido à baixa frequência no número de pacientes com subtipo histológico verruciforme, graus 2 e 3, invasão vascular e metástases, não foi possível avaliar essas variáveis. Assim, foram realizadas análises entre grupos com e sem invasão perineural, tamanho tumoral $\leq 3,5$ e $> 3,5$ cm e estadiamento pT1 e pT2. Para análise por tamanho do tumor (TT), foi utilizado o valor da mediana do TT como ponto de corte (percentil 50= 3,5 cm), sendo os pacientes distribuídos em dois grupos: TT $\leq 3,5$ e $> 3,5$ cm. Na análise por estadiamento, foi possível comparar os grupos de pacientes com estadiamento pT1 e pT2. Devido à baixa frequência de pacientes com estadiamento Tis e pT3, não foi possível incluir esses pacientes nas análises.

➤ **ANÁLISES NO SANGUE PERIFÉRICO**

- ***Invasão perineural***

Verificou-se que os níveis percentuais de células CD44^{high}/CD24^{neg} foram elevados nos pacientes com invasão perineural (IPN+), quando comparados aos sem invasão perineural (IPN-; p=0,01). Não houve diferença significativa nas análises de células CD44^{high}CD24^{low}STAT3⁺ e CD44^{high}CD24^{low}SOX2⁺ entre os grupos (Figura 12).

- ***Tamanho tumoral $\leq 3,5\text{cm}$ e $> 3,5\text{cm}$***

Na análise de células CD44^{high}CD24^{low} no sangue periférico, verificou-se aumento dos níveis dessas células no grupo de pacientes com tumores $>3,5\text{cm}$, quando comparado aos com tumores $\leq 3,5\text{ cm}$ ($p=0,02$). Não houve diferença significativa nos níveis percentuais de células CD44^{high}/CD24^{neg}/STAT3⁺ e CD44^{high}/CD24^{neg}/SOX2⁺ entre os grupos de pacientes com tamanho do tumor $\leq 3,5\text{ cm}$ e $>3,5\text{cm}$ (Figura 13).

- ***Estadiamento (pT1 vs pT2)***

Na análise de células CD44^{high}CD24^{low} no sangue periférico, verificou-se aumento dos níveis dessas células no grupo de pacientes em pT2, quando comparado ao grupo pT1 ($p=0,009$). Não houve diferença significativa nos níveis percentuais CD44^{high}CD24^{low} STAT3⁺ e CD44^{high}CD24^{low} SOX2⁺ entre os grupos (Figura 14).

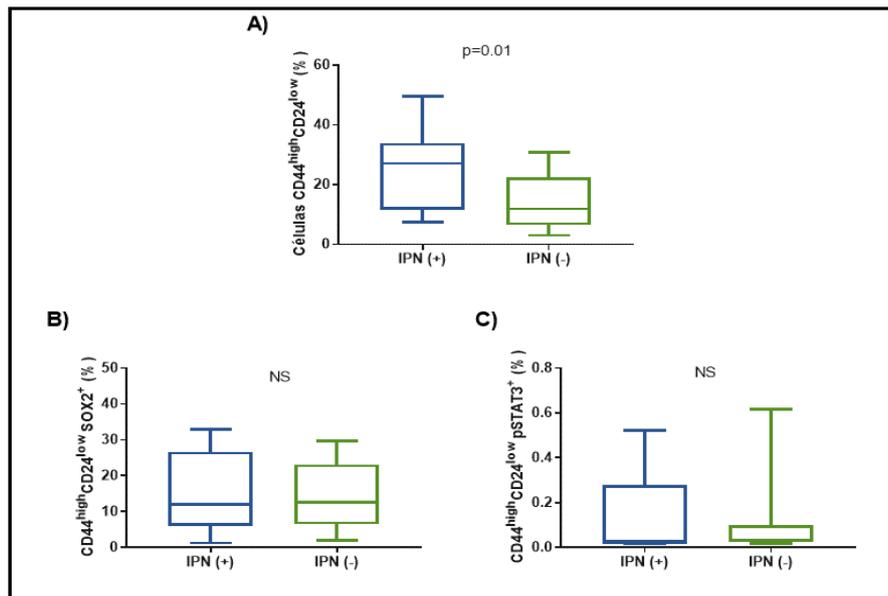


Figura 12 - Níveis percentuais de células CD44^{high}CD24^{low}, CD44^{high}CD24^{low}pSTAT3⁺ e CD44^{high}CD24^{low}SOX2⁺ no **sangue periférico** dos pacientes com invasão perineural -IPN (+) (n=11) e sem invasão perineural – IPN(-) (n=26) no carcinoma escamoso de pênis. Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25-75%). Foi considerado significativo p<0.05. NS: não significativo.

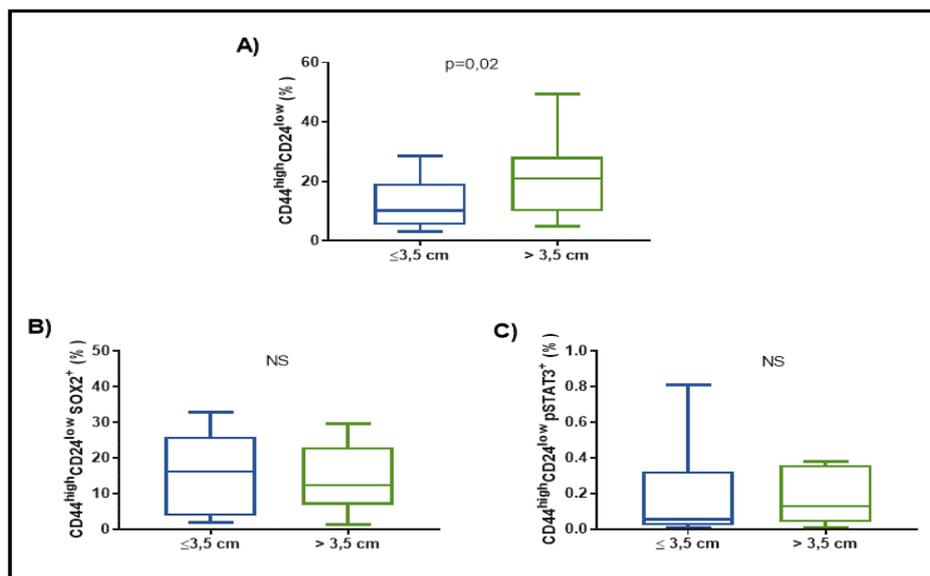


Figura 13 - Níveis percentuais de células CD44^{high}CD24^{low}, CD44^{high}CD24^{low}pSTAT3⁺ e CD44^{high}CD24^{low}SOX2⁺ no **sangue periférico** de grupos de pacientes com tamanho do tumor ≤ 3,5cm (n=19) e >3,5cm (n=18) no carcinoma escamoso de pênis. Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25-75%). Foi considerado significativo p<0.05. NS: não significativo.

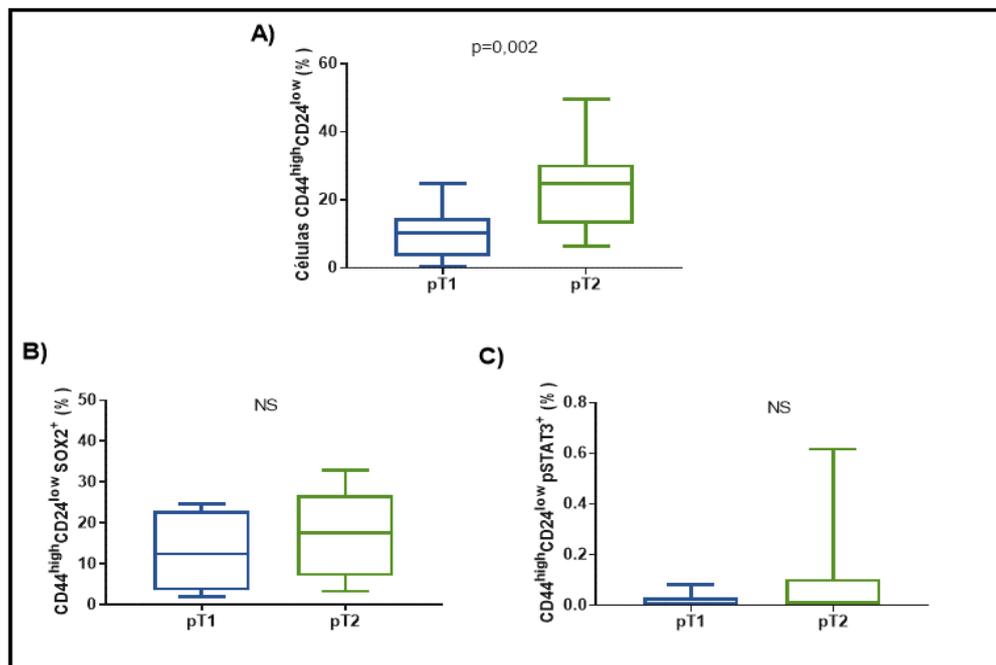


Figura 14 - Níveis percentuais de células CD44^{high}CD24^{low}, CD44^{high}CD24^{low} pSTAT3⁺ e CD44^{high}CD24^{low} SOX2⁺ no **sangue periférico** de pacientes com carcinoma escamoso de pênis em estadiamento pT1 (n=13) e pT2 (n=21). Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25-75%). Foi considerado significativo p<0.05. NS: não significativo.

5.4 NÍVEIS PERCENTUAIS DE CÉLULAS CD44^{high}CD24^{low}, CD44^{high}CD24^{low}pSTAT3⁺ E CD44^{high}CD24^{low}SOX2⁺NO TECIDO TUMORAL DE ACORDO COM AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

➤ ANÁLISES NO TECIDO TUMORAL:

- *Invasão perineural*

Os níveis percentuais de células CD44^{high}CD24^{low}, CD44^{high}CD24^{low}SOX2⁺ e de CD44^{high}CD24^{low}STAT3⁺ foram elevados no tecido tumoral dos pacientes com invasão perineural (IPN+), quando comparados aos sem invasão perineural (IPN-; p<0,05) (Figura 15).

- *Tamanho tumoral ≤ 3,5cm e >3,5cm*

O grupo de pacientes com tumor > 3,5cm apresentou níveis percentuais elevados de células CD44^{high}CD24^{low}, CD44^{high}CD24^{low}SOX2⁺ e de CD44^{high}CD24^{low}STAT3⁺, quando comparados ao grupo com tamanho ≤3,5cm (p=0,008 e p=0,002, p=0,007, respectivamente; Figura 16).

- *Estadiamento (pT1 vs pT2)*

Na análise de células CD44^{high}CD24^{low}, CD44^{high}CD24^{low}STAT3⁺ e CD44^{high}CD24^{low}SOX2⁺ no tecido tumoral entre os grupos de pacientes em estadiamento pT1 e pT2, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (Figura 17).

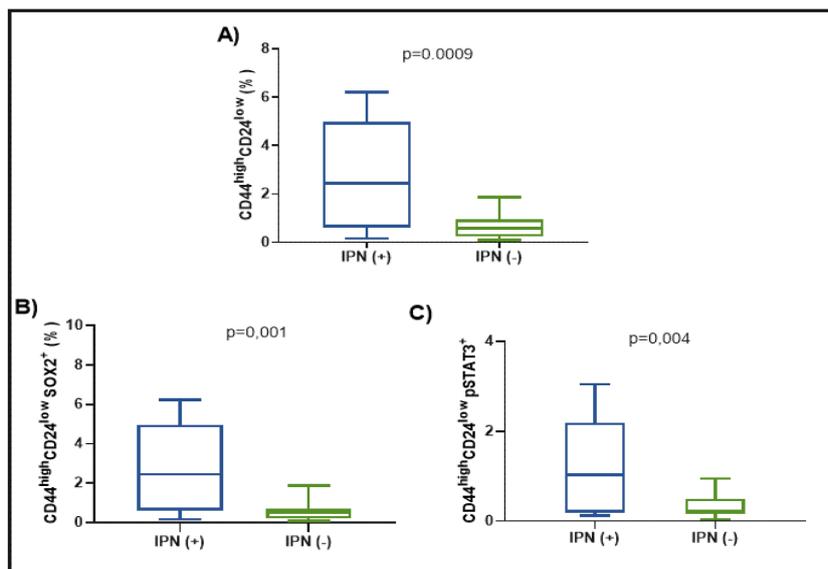


Figura 15 - Níveis percentuais de células $CD44^{high}CD24^{low}$, $CD44^{high}CD24^{low}pSTAT3^{+}$ e $CD44^{high}CD24^{low}SOX2^{+}$ no **tecido tumoral** dos pacientes com invasão perineural, (IPN+; n=11) e sem invasão perineural (IPN-; n=26) no carcinoma escamoso de pênis. Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25-75). Foi considerado significativo $p < 0.05$. NS: não significativo.

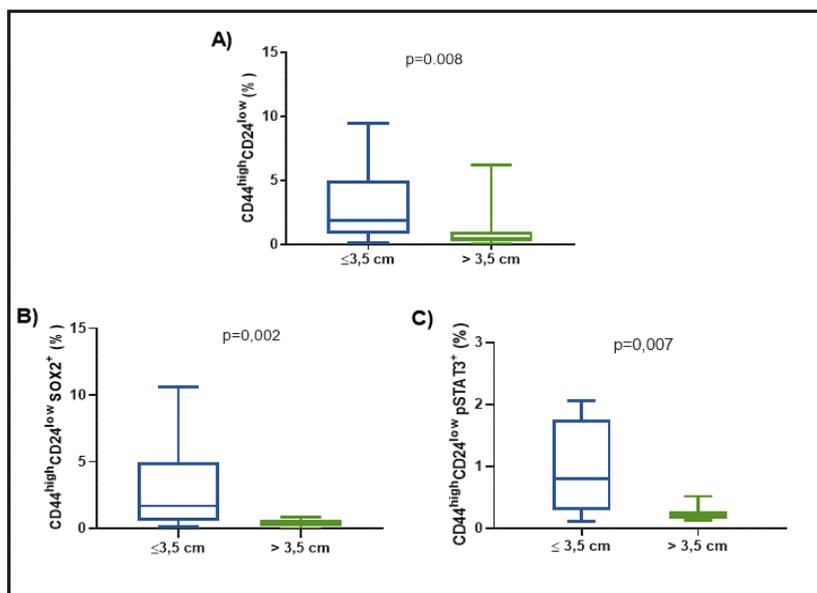


Figura 16 - Níveis percentuais de células $CD44^{high}CD24^{low}$, $CD44^{high}CD24^{low}pSTAT3^{+}$ e $CD44^{high}CD24^{low}SOX2^{+}$ no **tecido tumoral** de grupos de pacientes com tamanho do tumor $\leq 3,5$ cm (n=19) e $> 3,5$ cm (n=18) no carcinoma escamoso de pênis. Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25-75). Foi considerado significativo $p < 0.05$.

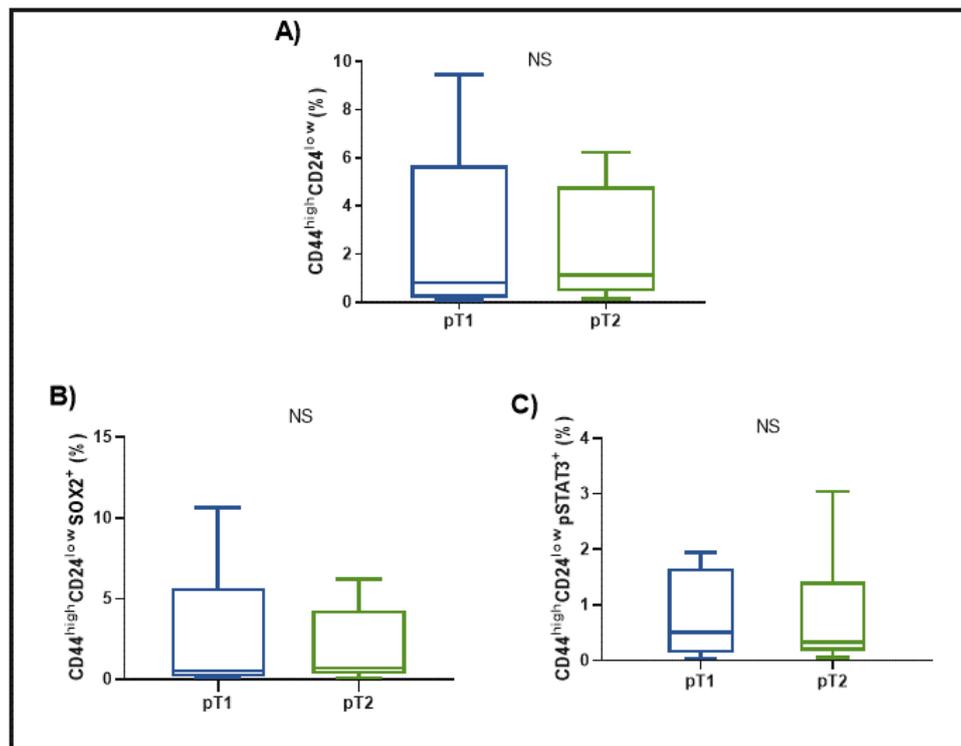


Figura 17 - Níveis percentuais de células CD44^{high}CD24^{low}, CD44^{high}CD24^{low}pSTAT3⁺ e CD44^{high}CD24^{low}SOX2⁺ no **tecido tumoral** de pacientes com carcinoma escamoso de pênis em estadiamento pT1 (n=13) e pT2 (n=21). Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25-75). Foi considerado significativo $p < 0.05$. NS: não significativo.

5.5 ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS COM OS NÍVEIS DE CÉLULAS CD44^{high}/CD24^{low} ENCONTRADOS NO SANGUE PERIFÉRICO E TECIDO TUMORAL DOS PACIENTES

Para as análises de associação das características clínicas com os níveis de células CD44^{high}/CD24^{low}, foram utilizados como ponto de corte os valores de mediana (percentil 50) dos níveis relativos (%) dessas células encontrados no sangue e no tecido tumoral como detalhado na Tabela 2. Foram encontradas associação dos níveis de células CD44^{high}/CD24^{low} no sangue periférico com o tamanho do tumor ($p=0,04$) e *status* de sobrevida ($p=0,01$) nos pacientes com câncer de pênis. Não foram observadas diferenças significativas nas análises realizadas no tecido tumoral (Tabela 2).

Nas análises CD44^{high}/CD24^{low}, porém, obteve-se valor de “p” próximo à significância, com uma elevada frequência de pacientes com grau histológico 1 (G1) e níveis de CD44^{high}/CD24^{low} abaixo de 12,6%.

Tabela 2 - Análises da associação das características clínicas de acordo com as medianas dos valores relativos de células CD44^{high}/CD24^{low} encontradas no sangue periférico e no tecido tumoral dos pacientes com câncer de pênis.

	CD44 ^{high} /CD24 ^{low}		p* valor	CD44 ^{high} /CD24 ^{low}		p* valor
	Sangue Periférico			Tecido Tumoral		
Valores Relativos (%) (percentil 50)	< 12,6	≥ 12,6		< 0,86	≥ 0,86	
IDADE (anos)	N= 17	N= 19	0,20	N= 15	N= 18	0,15
≤ 60	6 (35,3)	11 (57,9)		5 (33,3)	11 (61,1)	
> 60	11 (64,7)	8 (42,1)		10 (66,7)	7 (38,9)	
LOCALIZAÇÃO	N= 15	N= 17	1,00	N= 15	N= 17	1,00
Glande	12 (80,0)	15 (88,2)		8 (53,3)	9 (52,9)	
Haste peniana e glande	3 (20,0)	2 (11,8)		7 (46,7)	7 (41,2)	
GRAU	N= 17	N= 19	0,05	N= 15	N= 18	1,00
G1	17 (100,0)	14 (73,7)		14 (93,3)	15 (83,3)	
G2/G3	0 (0,0)	5 (23,3)		1 (6,7)	3 (16,7)	
ESTADIAMENTO CLÍNICO	N= 16	N= 16	0,72	N= 14	N= 15	0,70
pT1	7 (43,8)	5 (31,3)		5 (35,7)	6 (40,0)	
pT2	9 (56,2)	11 (68,7)		9 (64,3)	9 (60,0)	
SUBTIPO HISTOLÓGICO	N= 12	N= 17	0,55	N= 14	N= 18	1,00
Usual	10 (83,3)	16 (94,1)		12 (85,7)	18 (100,0)	
Verruciforme	2 (16,7)	1 (5,9)		2 (14,3)	0 (0,0)	
INVASÃO PERINEURAL	N= 16	N= 19	0,49	N= 14	N= 18	1,00
Sim	4 (25,0)	7 (36,8)		3 (21,4)	8 (44,4)	
Não	12 (75,0)	12 (63,2)		11 (78,6)	10 (55,6)	
INVASÃO VASCULAR	N= 16	N= 18	0,59	N= 14	N= 18	0,07
Sim	2 (12,5)	1 (5,6)		2 (14,3)	1 (5,6)	
Não	14 (87,5)	17 (94,4)		12 (85,7)	17 (94,4)	
TAMANHO DO TUMOR	N= 17	N= 19	0,04	N= 15	N= 18	1,00
≤ 3,5 cm	12 (70,6)	6 (31,6)		5 (33,3)	12 (66,7)	
> 3,5 cm	5 (29,4)	13 (68,4)		10 (66,7)	6 (33,3)	
METÁSTASES	N= 17	N= 19	1,00	N= 15	N= 18	0,62
Sim	2 (11,8)	3 (15,8)		3 (20,0)	1 (5,6)	
Não	15 (88,2)	16 (84,2)		12 (80,0)	17 (94,4)	
STATUS DE SOBREVIVÊNCIA	N= 17	N= 19	0,01	N= 15	N= 18	0,05
Vivo	11 (64,7)	19 (100,0)		11 (73,3)	16 (88,9)	
Não	6 (35,3)	0 (0,0)		4 (26,7)	2 (11,1)	

*Teste exato de Fischer. Foi considerado significativo valor de $p < 0,05$. Os pacientes sem informações referentes às variáveis relacionadas na tabela foram excluídos destas análises.

5.6 ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS COM OS NÍVEIS DE CÉLULAS CD44^{high}/CD24^{low}SOX2+ E CD44^{high}/CD24^{low} pSTAT3+ ENCONTRADOS NO SANGUE PERIFÉRICO E NO TECIDO TUMORAL DOS PACIENTES

Para as análises de associação das características clínicas com os níveis de SOX2+ e TCD3+SOX2+ foram utilizados como ponto de corte os valores de mediana (percentil 50) dos níveis relativos (%) dessas células encontrados no sangue e no tecido tumoral, como detalhado na Tabela 3.

Foi encontrada a associação dos níveis de CD44^{high}/CD24^{low}SOX2+no sangue periférico com *status* de sobrevida ($p=0,02$) dos pacientes com câncer de pênis, estando associada ao aumento do número de óbitos. Isso também foi observado no tecido tumoral, pois a maior taxa de óbito foi no grupo com níveis abaixo de 0,64% de CD44^{high}/CD24^{low}SOX2+.

Nas análises CD44^{high}/CD24^{low} pSTAT3+, porém, obtiveram-se valores de “p” próximos a significâncias estatísticas, com uma elevada frequência de óbito no grupo com valores dessas células acima de 0,35% no sangue periférico. Na análise dos níveis de células CD44^{high}/CD24^{low} pSTAT3+ no tecido tumoral, não foi observada a associação dessas células com as variáveis clínicas estudadas (Tabela 3).

Tabela 3 - Análises da associação das características clínicas de acordo com as medianas dos valores relativos de células CD44^{high}/CD24^{low}SOX2⁺ e CD44^{high}/CD24^{low} pSTAT3⁺ encontradas no sangue periférico e no tecido tumoral dos pacientes com câncer de pênis

	CD44 ^{high} /CD24 ^{low} SOX2 ⁺		p* valor	CD44 ^{high} /CD24 ^{low} SOX2 ⁺		p* valor	CD44 ^{high} /CD24 ^{low} pSTAT3 ⁺		p* valor	CD44 ^{high} /CD24 ^{low} pSTAT3 ⁺		p* valor
	Sangue Periférico			Tecido Tumoral			Sangue Periférico			Tecido Tumoral		
	Valores Relativos (%) (percentil 50)	< 12,4	≥ 12,4	< 0,69	≥ 0,69	< 0,35	≥ 0,35	< 0,31	≥ 0,31			
IDADE (anos)	N= 20	N= 16	0,20	N= 13	N= 18	0,15	N= 25	N= 12	0,29	N= 16	N= 17	0,17
≤ 60	9 (45,0)	8 (50,0)		4 (30,8)	11 (61,1)		14 (56,0)	4 (33,3)		10 (62,5)	6 (35,3)	
> 60	11 (55,0)	8 (50,0)		9 (69,2)	7 (38,9)		11 (44,0)	8 (66,7)		6 (37,5)	11 (64,7)	
LOCALIZAÇÃO	N= 17	N= 14	1,00	N= 12	N= 18	1,00	N= 22	N= 10	1,00	N= 15	N= 17	1,00
Glande	14 (82,3)	13 (92,9)		6 (50,0)	10 (55,6)		19 (82,6)	9 (90,0)		8 (53,3)	9 (52,9)	
Haste peniana e glande	3 (17,6)	1 (7,1)		6 (50,0)	8 (44,4)		4 (17,3)	1 (10,0)		7 (46,7)	8 (47,1)	
GRAU	N= 20	N= 16	0,05	N= 13	N= 18	1,00	N= 25	N= 12	1,00	N= 16	N= 17	0,34
G1	19 (95,0)	12 (75,0)		11 (84,6)	16 (88,9)		21 (84,0)	11 (91,7)		13 (81,3)	16 (94,1)	
G2/G3	1 (5,0)	4 (25,0)		2 (15,4)	2 (11,2)		4 (16,0)	1 (8,3)		3 (18,7)	1 (5,9)	
ESTADIAMENTO CLÍNICO	N= 19	N= 13	0,72	N= 10	N= 17	0,70	N= 23	N= 10	0,054	N= 14	N= 15	0,71
pT1	7 (36,9)	5 (38,5)		3 (30,0)	7 (35,3)		11 (47,8)	1 (9,1)		6 (42,9)	5 (33,3)	
pT2	12 (63,1)	8 (61,5)		7 (70,0)	11 (64,7)		12 (52,2)	9 (81,8)		8 (57,1)	10 (66,7)	
SUBTIPO HISTOLÓGICO	N= 15	N= 14	0,55	N= 13	N= 17	1,00	N= 20	N= 10	0,53	N= 16	N= 16	1,00
Usual	13 (86,7)	13 (92,9)		12 (92,3)	16 (94,1)		17 (85,0)	10 (100,0)		15 (93,8)	15 (93,8)	
Verruciforme	2 (13,3)	1 (7,1)		1 (7,7)	1 (5,9)		3 (15,0)	0 (0,0)		1 (6,3)	1 (6,3)	
INVASÃO PERINEURAL	N= 19	N= 16	0,49	N= 13	N= 17	1,00	N= 25	N= 11	1,00	N= 16	N= 16	1,00
Sim	7 (36,8)	4 (25,0)		5 (38,5)	6 (35,3)		8 (32,0)	3 (27,3)		5 (31,3)	6 (37,5)	
Não	12 (63,2)	12 (75,0)		8 (61,5)	11 (64,7)		17 (68,0)	8 (72,7)		11 (68,8)	10 (62,5)	

Cont/ Tabela 3

	CD44 ^{high} /CD24 ^{low} SOX2 ⁺		p* valor	CD44 ^{high} /CD24 ^{low} SOX2 ⁺		p* valor	CD44 ^{high} /CD24 ^{low} pSTAT3 ⁺		p* valor	CD44 ^{high} /CD24 ^{low} pSTAT3 ⁺		p* valor
	Sangue Periférico			Tecido Tumoral			Sangue Periférico			Tecido Tumoral		
	Valores Relativos (%) (percentil 50)	< 12,4	≥ 12,4		< 0,69	≥ 0,69		< 0,35	≥ 0,35		< 0,31	≥ 0,31
INVASÃO VASCULAR	N= 19	N= 15	0,59	N= 13	N= 17	0,07	N= 25	N= 10	1,00	N= 16	N= 16	0,23
Sim	2 (10,5)	1 (6,7)		3 (23,1)	0 (0,0)		2 (8,0)	1 (10,0)		0 (0,0)	3 (18,8)	
Não	17 (89,5)	14 (93,3)		10 (76,9)	17 (100,0)		23 (92,0)	9 (90,0)		16 (100,0)	13 (81,3)	
TAMANHO DO TUMOR	N= 20	N= 16	0,09	N= 13	N= 18	1,00	N= 25	N= 12	0,46	N= 16	N= 17	0,73
≤ 3,5 cm	13 (65,0)	5 (31,3)		7 (53,8)	9 (50,0)		14 (56,0)	5 (41,7)		9 (56,3)	8 (47,1)	
> 3,5 cm	7 (35,0)	11 (68,8)		6 (46,2)	9 (50,0)		11 (44,0)	7 (58,3)		7 (43,8)	9 (52,9)	
METÁSTASES	N= 20	N= 16	1,00	N= 13	N= 18	0,62	N= 25	N= 12	0,31	N= 16	N= 17	1,00
Sim	2 (10,0)	3 (18,8)		1 (7,7)	3 (16,7)		2 (8,0)	3 (25,0)		2 (12,5)	2 (11,8)	
Não	18 (90,0)	13 (81,3)		12 (92,3)	15 (83,3)		23 (92,0)	9 (75,0)		14 (87,5)	15 (88,2)	
STATUS DE SOBREVIDA	N= 20	N= 16	0,02	N= 13	N= 18	0,04	N= 25	N= 11	0,07	N= 16	N= 17	0,66
Vivo	14 (70,0)	16 (100,0)		8 (61,5)	17 (94,4)		23 (92,0)	7 (63,6)		14 (87,5)	13 (76,5)	
Não	6 (30,0)	0 (0,0)		5 (38,5)	1 (5,6)		2 (8,0)	4 (36,4)		2 (12,5)	4 (23,5)	

*Teste exato de Fischer. Foi considerado significativo o valor de $p < 0,05$. Os pacientes sem informações referentes às variáveis relacionadas na tabela foram excluídos destas análises.

5.7 ANÁLISE DOS NÍVEIS PERCENTUAIS DE LEUCÓCITOS SOX2⁺, STAT3, TCD3⁺, TCD3⁺/SOX2⁺ e TCD3⁺/STAT3 NOS PACIENTES E CONTROLES

A análise de SOX2 e STAT3 foi realizada no sangue periférico de 38 pacientes e de 15 controles. Foram observados níveis percentuais reduzidos de leucócitos com expressão de SOX2 e elevados com expressão de STAT3 nos pacientes, quando comparados aos dos controles saudáveis ($p=0,001$ e $p=0,004$, respectivamente), como mostra a Figura 18.

Nas análises dos níveis de células T com expressão de SOX2 (TCD3⁺/SOX2⁺), foram observados níveis reduzidos dessas células nos pacientes, quando comparados aos controles ($p=0,005$; Figura 18). Não houve diferenças significativas entre os grupos nas análises dos níveis percentuais de linfócitos TCD3⁺ e de linfócitos T com expressão de STAT3⁺(TCD3⁺/STAT3⁺).

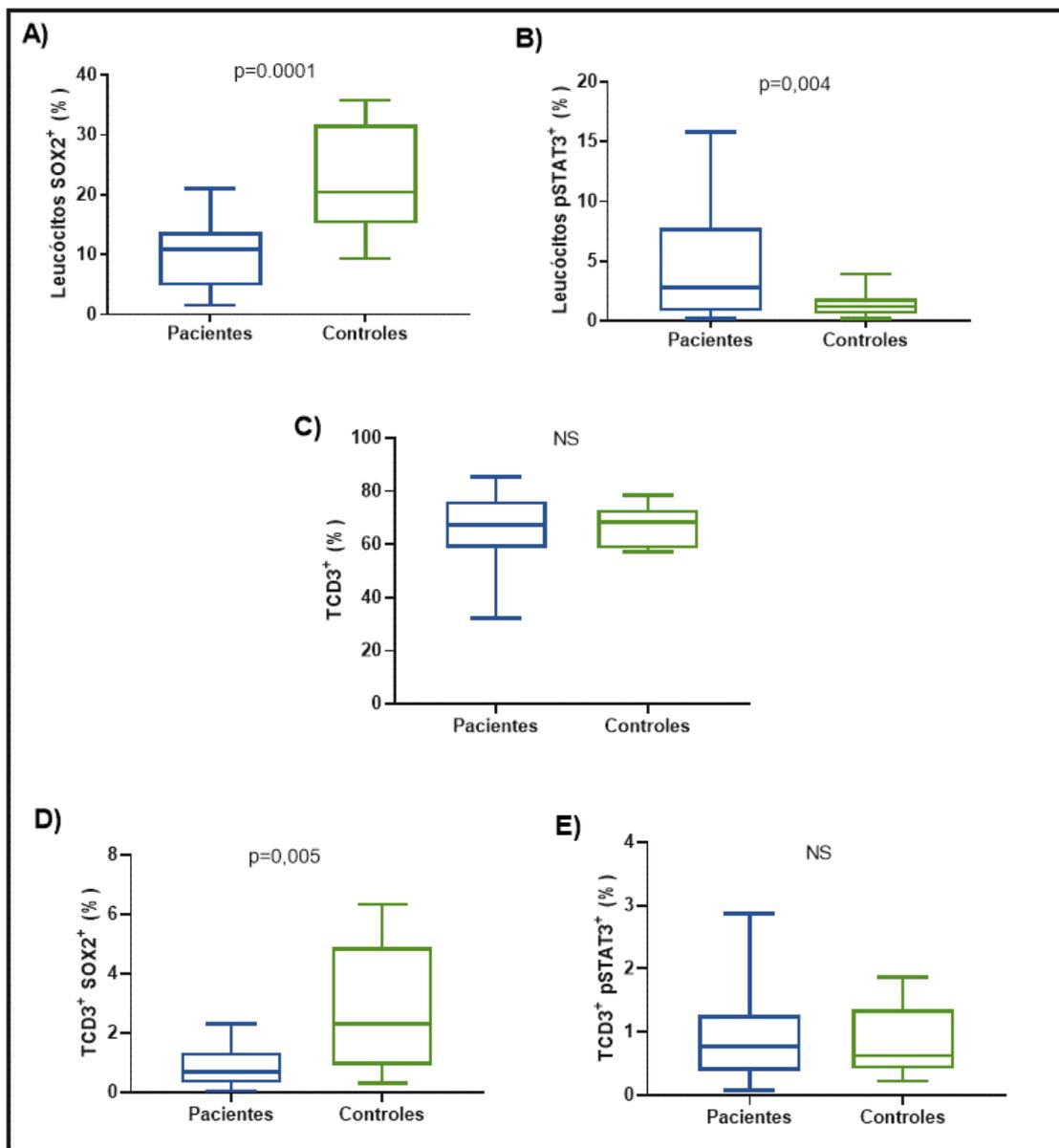


Figura 18 - Níveis percentuais de expressão de leucócitos SOX2⁺, leucócitos pSTAT3⁺ TCD3⁺, TCD3⁺ SOX2⁺ e TCD3⁺ pSTAT3⁺ no **sangue periférico** dos pacientes com carcinoma escamoso de pênis (n=38) e controles (n=15). Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25-75%). Foi considerado significativo p<0.05. NS: não significativo.

5.8 NÍVEIS PERCENTUAIS DE SOX2, STAT3, TCD3+, TCD3+SOX2+ E TCD3+ pSTAT3 NO SANGUE PERIFÉRICO DE ACORDO COM AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

➤ ANÁLISES NO SANGUE PERIFÉRICO:

- ***Invasão perineural***

Foram observados níveis percentuais elevados de leucócitos com expressão de SOX2 e reduzidos de STAT3 no sangue periférico dos pacientes com IPN (+), quando comparados ao grupo IPN(-) ($p=0,008$ e $p=0,01$, respectivamente), como mostra a Figura 19. Também se observamos níveis percentuais reduzidos de TCD3+/SOX2+ no sangue periférico dos pacientes com IPN (+), quando comparados ao grupo IPN (-) ($p=0,02$). Não houve diferenças significativas nos níveis percentuais de TCD3+e TCD3+/STAT3+ entre os grupos.

- ***Tamanho tumoral $\leq 3,5\text{cm}$ e $>3,5\text{cm}$***

Foram observados níveis percentuais elevados de leucócitos SOX2+ e reduzidos de TCD3+ no sangue dos pacientes com tamanho do tumor $> 3,5$ cm, quando comparados ao grupo com tamanho $\leq 3,5$ cm ($p=0,002$ e $p=0,01$, respectivamente). Não houve diferenças significativas nos níveis percentuais de leucócitos STAT3+, TCD3+/SOX2+ e TCD3+/STAT3+ entre os grupos (Figura 20).

- ***Estadiamento (pT1 vs pT2)***

Foram observados elevados níveis percentuais de leucócitos SOX2+ e reduzidos de TCD3+/SOX2 no sangue dos pacientes em estágio pT2, quando

comparados ao grupo pT1 ($p=0,015$ e $p=0,001$, respectivamente). Não houve diferenças significativas nos níveis percentuais de STAT3+, TCD3+ e TCD3+/STAT3+ entre os grupos (Figura 21).

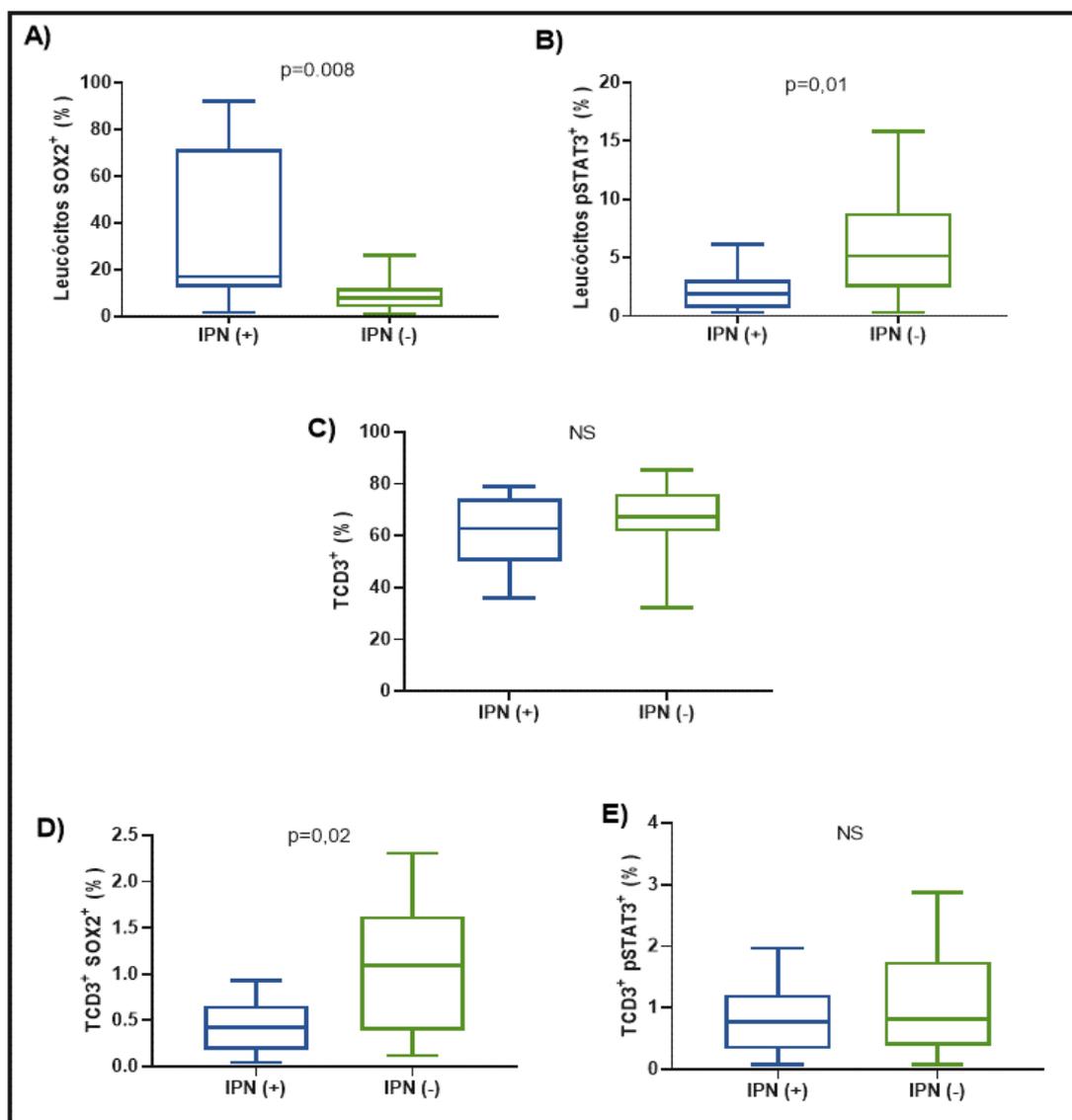


Figura 19 -Níveis percentuais de expressão de leucócitos SOX2⁺, leucócitos pSTAT3⁺, TCD3⁺, TCD3⁺ SOX2⁺ e TCD3⁺ pSTAT3⁺ no **sangue periférico** dos pacientes com invasão perineural (IPN+; n=11) e sem invasão perineural (IPN-; n=26) no carcinoma escamoso de pênis. Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25-75). Foi considerado significativo $p<0.05$. NS: não significativo.

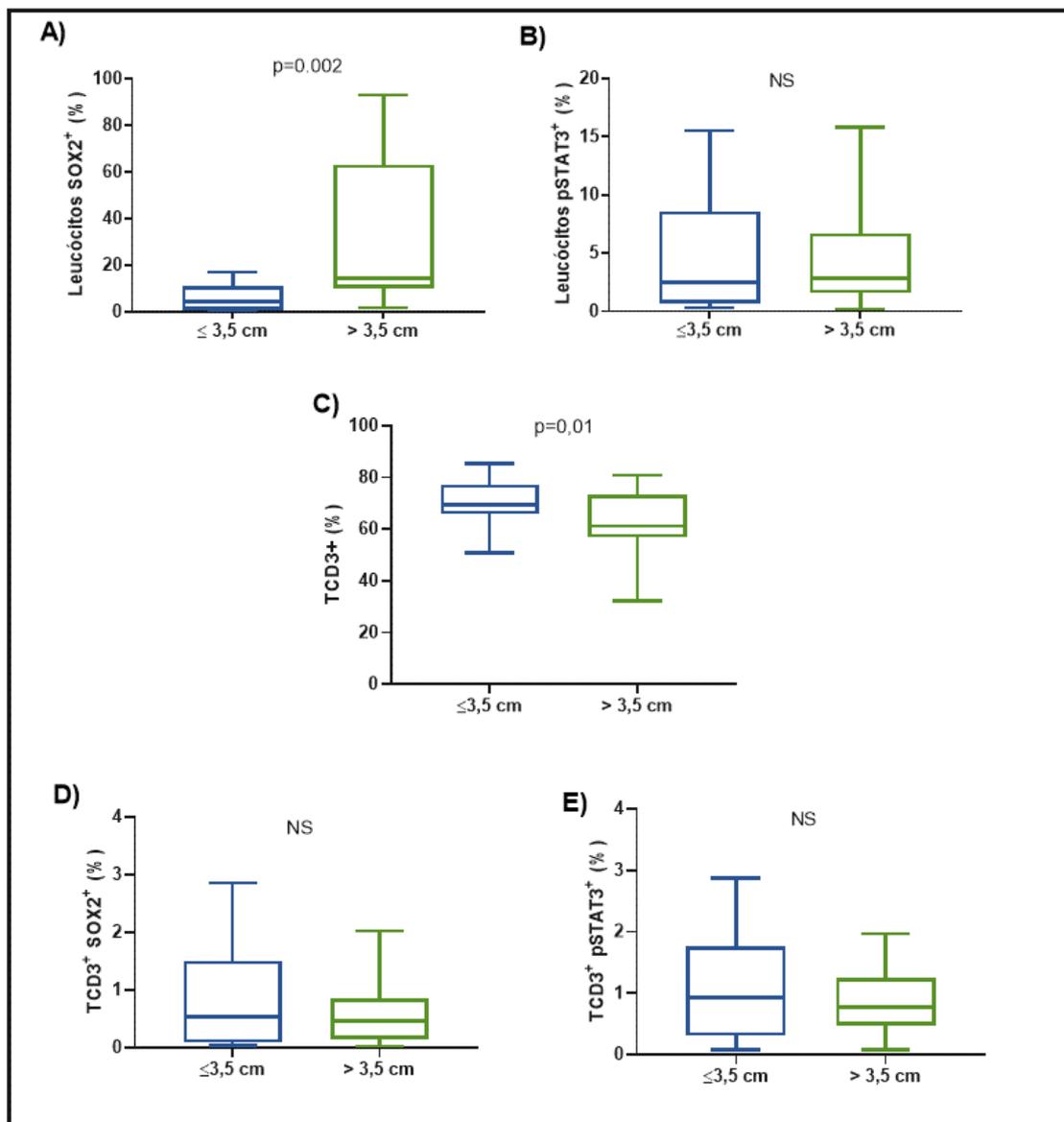


Figura 20 - Níveis percentuais de expressão de leucócitos SOX2⁺, leucócitos pSTAT3⁺, TCD3⁺, TCD3⁺ SOX2⁺ e TCD3⁺ pSTAT3⁺ no **sangue periférico** de grupos de pacientes com tamanho do tumor $\leq 3,5$ cm (n=19) e $>3,5$ cm (n=18) no carcinoma escamoso de pênis. Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25-75). Foi considerado significativo $p < 0.05$. NS: não significativo.

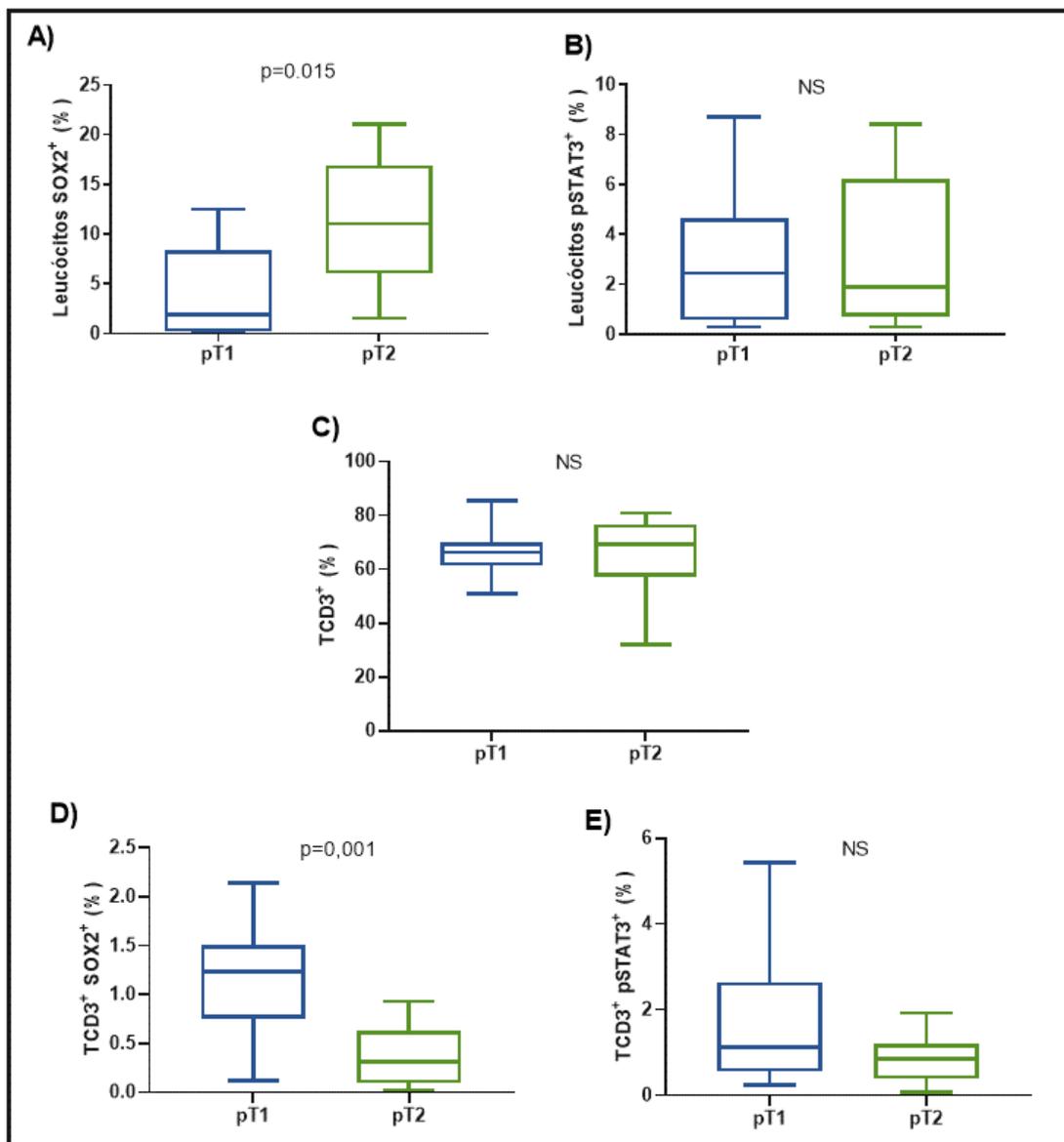


Figura 21 - Níveis percentuais de expressão de leucócitos SOX2⁺, leucócitos pSTAT3⁺, TCD3⁺, TCD3⁺ SOX2⁺ e TCD3⁺ pSTAT3⁺ no **sangue periférico** de pacientes com carcinoma escamoso de pênis em estadiamento pT1 (n=13) e pT2 (n=21). Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25-75%). Foi considerado significativo p<0.05. NS: não significativo.

5.9 NÍVEIS PERCENTUAIS DE SOX2, STAT3, TCD3+, TCD3+/SOX2+ E TCD3+/STAT3 NO TECIDO TUMORAL DE ACORDO COM AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

- ***Invasão perineural***

Não foi observada diferença significativa dos níveis de SOX2⁺, STAT3⁺, TCD3⁺, TCD3⁺/SOX2⁺ e TCD3⁺/STAT3⁺ no tecido tumoral entre os grupos com e sem invasão perineural (Figura 22).

- ***Tamanho tumoral ≤ 3,5cm e >3,5cm***

Foram observados níveis percentuais elevados de SOX2 e TCD3⁺ no tecido tumoral de pacientes com tamanho ≤ 3,5cm, quando comparados ao grupo com tamanho >3,5cm (p=0,02 e p<0,0001, respectivamente). Não houve diferença significativa nos níveis percentuais de STAT3⁺, TCD3⁺/SOX2⁺ e TCD3⁺/STAT3⁺ entre os grupos (Figura 23).

- ***Estadiamento (pT1 vs pT2)***

No tecido tumoral, foram observados níveis percentuais elevados de expressão de SOX2⁺ no grupo em estágio pT2, enquanto os níveis foram elevados pSTAT3 no grupo em estágio pT1 (p<0,05). Não houve diferença significativa nos níveis percentuais de TCD3⁺, TCD3⁺/SOX2⁺ e TCD3⁺/STAT3⁺ entre os grupos (Figura 24)

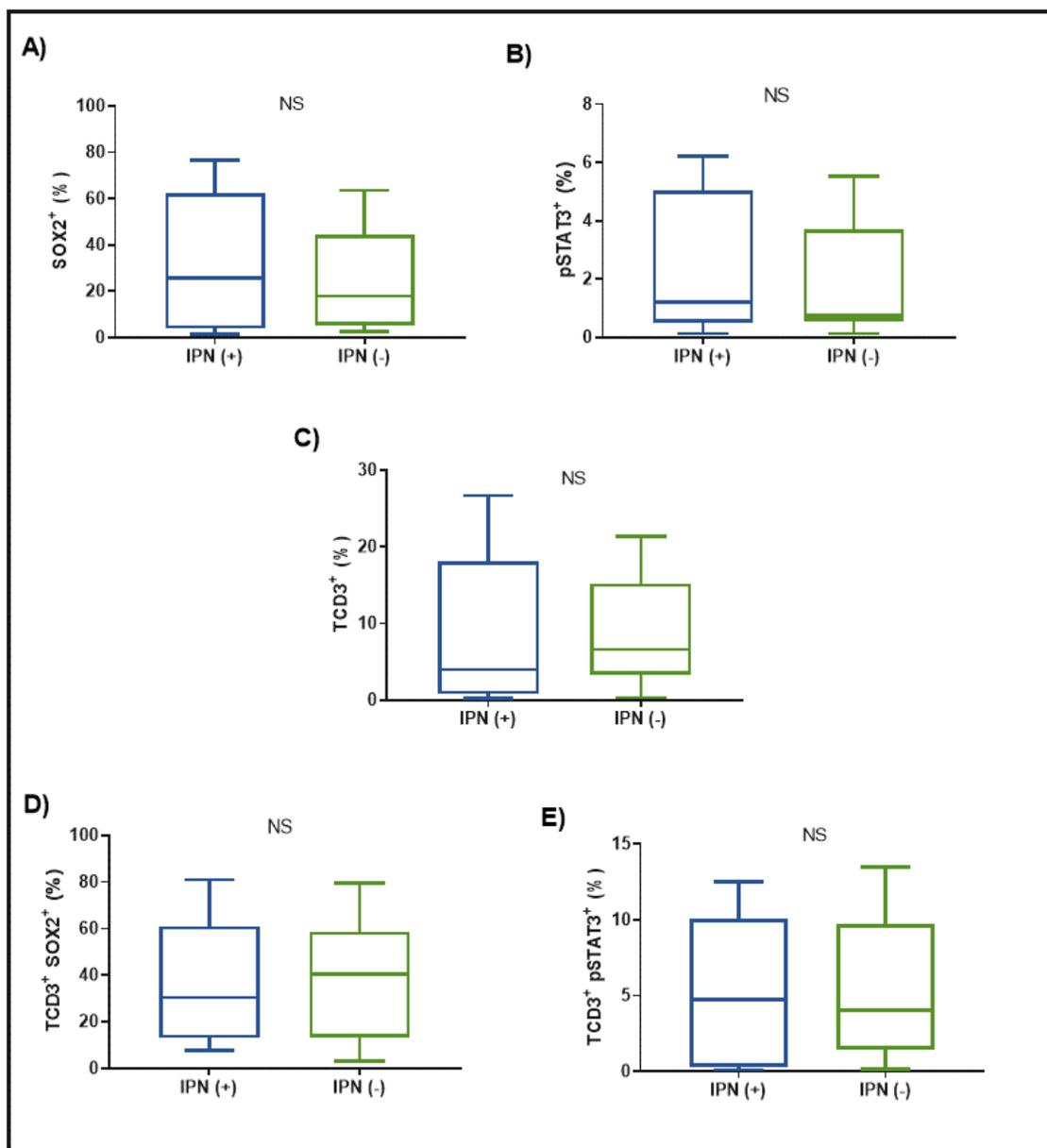


Figura 22 - Níveis percentuais de expressão de leucócitos SOX2⁺, leucócitos pSTAT3⁺, TCD3⁺, TCD3⁺ SOX2⁺ e TCD3⁺ pSTAT3⁺ no **tecido tumoral** de grupos de pacientes com (IPN+) e sem invasão perineural (IPN-) no câncer de pênis. Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25-75%). Foi considerado significativo p<0.05. NS: não significativo.

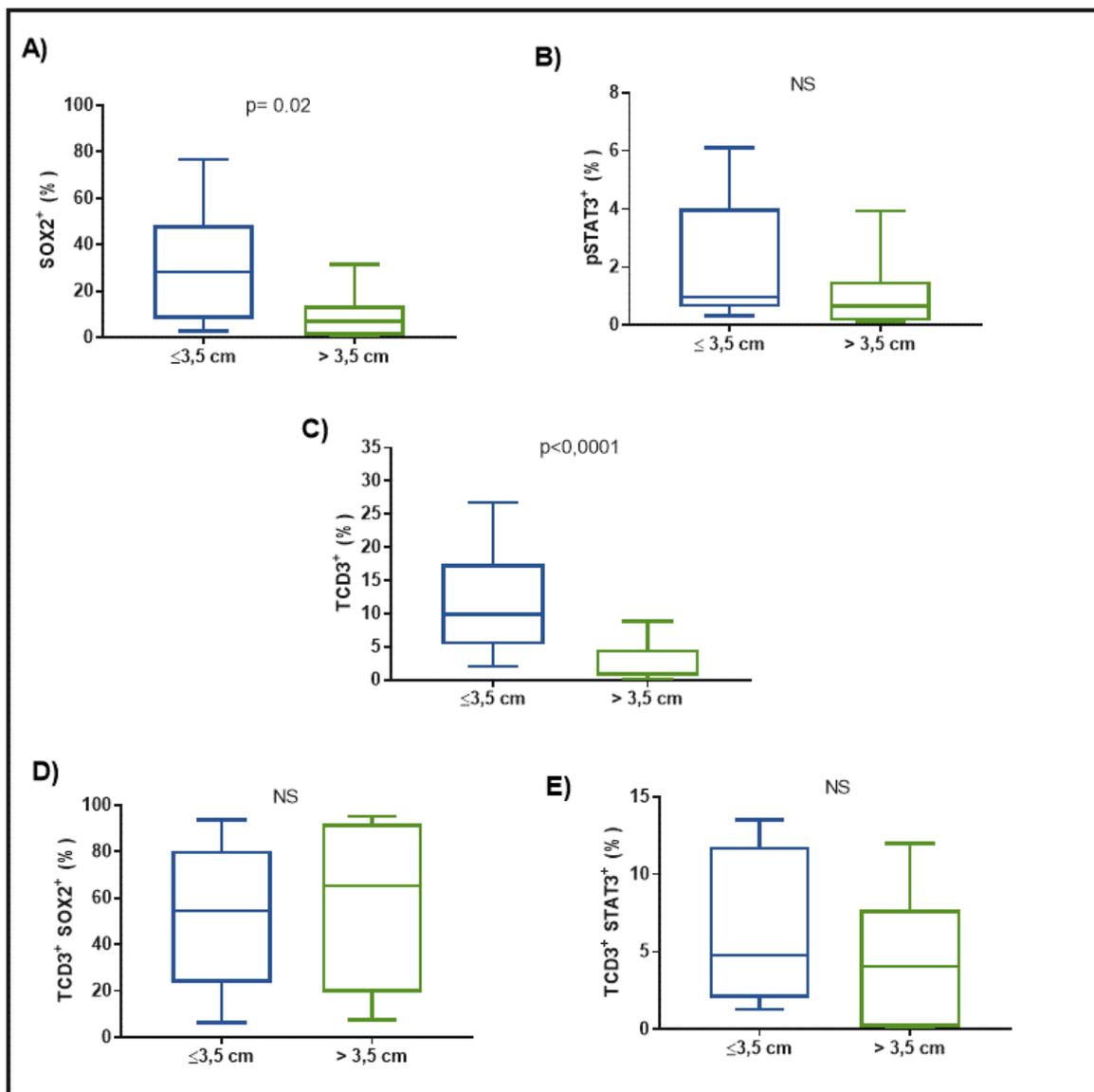


Figura 23 - Níveis percentuais de expressão de leucócitos SOX2⁺, leucócitos pSTAT3⁺, TCD3⁺, TCD3⁺ SOX2⁺ e TCD3⁺ pSTAT3⁺ no **tecido tumoral** de grupos de pacientes com tamanho do tumor $\leq 3,5$ cm (n=19) e $> 3,5$ cm (n=18) no câncer de pênis. Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25-75). Foi considerado significativo $p < 0,05$. NS: não significativo.

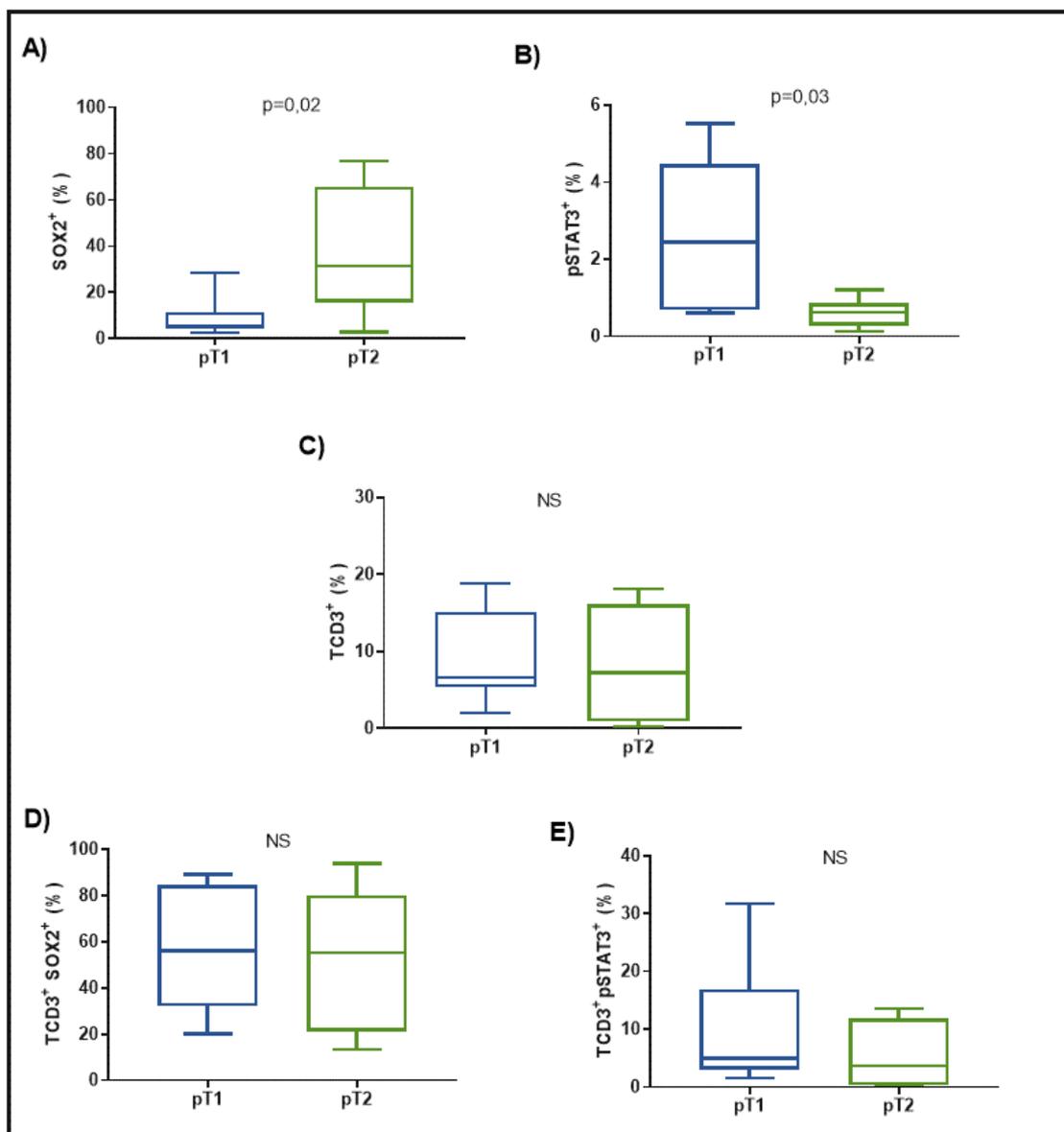


Figura 24 - Níveis percentuais de expressão de leucócitos SOX2⁺, leucócitos pSTAT3⁺, TCD3⁺, TCD3⁺ SOX2⁺ e TCD3⁺ pSTAT3⁺ no **tecido tumoral** de pacientes com carcinoma escamoso de pênis em estadiamento pT1 (n=13) e pT2 (n=21). Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25-75%). Foi considerado significativo p<0.05. NS: não significativo.

5.10 ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS COM OS NÍVEIS DE SOX2+ E TCD3+SOX2+ ENCONTRADOS NO SANGUE PERIFÉRICO E NO TECIDO TUMORAL DOS PACIENTES

Para as análises de associação das características clínicas com os níveis de SOX2+ e TCD3+SOX2+, foram utilizados como ponto de corte os valores de mediana (percentil 50) dos níveis relativos (%) encontrados no sangue e no tecido tumoral, como detalhado na Tabela 4.

Foi encontrada a associação dos níveis de leucócitos SOX2+ no sangue periférico com *status* de sobrevida ($p=0,02$) dos pacientes com câncer de pênis, com 100% de sobreviventes no grupo com níveis $\leq 11,5\%$. Não foi observada a associação dos níveis SOX2+ no tecido tumoral com as variáveis analisadas. Nas análises dos níveis de células TCD3+SOX2+ no sangue e no tecido tumoral, não foi observada a associação dessas células com as variáveis clínicas estudadas (Tabela 4).

Tabela 4 - Análises da associação das características clínicas de acordo com as medianas dos valores relativos de SOX2+ e TCD3+SOX2+encontradas no sangue periférico e tecido tumoral dos pacientes com câncer de pênis

	Leucócitos SOX2+		p* valor	SOX2+		p* valor	TCD3+ SOX2+		p* valor	TCD3+ SOX2+		p* valor
	Sangue Periférico			Tecido Tumoral			Sangue Periférico			Tecido Tumoral		
Valores Relativos (%) (percentil 50)	≤ 11,5	> 11,5		≤ 9,3	> 9,3		≤ 0,90	> 0,90		≤ 20	> 20	
IDADE (anos)	N= 19	N= 18	0,33	N= 24	N= 9	0,06	N= 20	N= 11	1,00	N= 16	N= 16	1,00
≤ 60	11 (57,9)	7 (38,9)		9 (37,5)	7 (77,8)		10 (50,0)	6 (54,5)		8 (50,0)	7 (43,8)	
> 60	8 (42,1)	11 (61,1)		15 (62,5)	2 (22,2)		10 (50,0)	5 (45,5)		8 (50,0)	9 (56,3)	
LOCALIZAÇÃO	N= 16	N= 17	0,35	N= 22	N= 9	1,00	N= 18	N= 11	1,00	N= 16	N= 15	0,07
Glande	15 (93,8)	13 (76,5)		11 (50,0)	5 (55,6)		15 (83,3)	10 (90,9)		6 (37,5)	11 (73,3)	
Haste peniana e glande	1 (6,3)	4 (23,5)		11 (50,0)	4 (44,4)		3 (16,7)	1 (9,1)		10 (62,6)	4 (26,7)	
GRAU	N= 19	N= 18	0,47	N= 24	N= 9	1,00	N= 20	N= 11	0,86	N= 17	N= 16	1,00
G1	15 (78,9)	17 (94,4)		21 (87,5)	8 (88,9)		17 (85,0)	9 (81,8)		15 (88,2)	14 (87,4)	
G2/G3	4 (21,1)	1 (5,6)		3 (12,5)	1 (11,1)		3 (15,0)	2 (18,2)		2 (11,8)	2 (12,6)	
ESTADIAMENTO CLÍNICO	N= 17	N= 16	0,72	N= 20	N= 9	0,93	N= 17	N= 11	0,09	N= 15	N= 15	0,44
pT1	7 (41,2)	5 (31,2)		8 (40,0)	3 (33,3)		3 (17,7)	6 (54,5)		4 (26,7)	7 (46,7)	
pT2	10 (58,8)	11 (68,8)		12 (60,0)	6 (66,7)		14 (82,3)	5 (45,5)		11 (73,3)	8 (53,3)	
SUBTIPO HISTOLÓGICO	N= 15	N= 15	1,00	N= 23	N= 9	0,48	N= 19	N= 6	0,24	N= 17	N= 15	0,21
Usual	13 (86,7)	14 (93,3)		22 (95,7)	8 (88,9)		19 (100,0)	5 (83,3)		17 (100,0)	13 (86,7)	
Verruciforme	2 (13,3)	1 (6,7)		1 (4,3)	1 (11,1)		0 (0,0)	1 (16,7)		0 (0,0)	2 (13,3)	
INVASÃO PERINEURAL	N= 19	N= 17	0,28	N= 23	N= 9	0,91	N= 20	N= 10	0,27	N= 16	N= 16	1,00
Sim	4 (21,1)	7 (41,2)		8 (34,8)	3 (33,3)		9 (45,0)	2 (20,0)		6 (37,5)	5 (31,2)	
Não	15 (78,9)	10 (58,8)		15 (65,2)	6 (66,7)		11 (55,0)	8 (80,0)		10 (62,5)	11 (68,8)	
INVASÃO VASCULAR	N= 19	N= 16	0,58	N= 22	N= 9	0,53	N= 20	N= 10	0,53	N= 15	N= 16	0,10
Sim	1 (5,3)	2 (12,5)		3 (13,6)	0 (0,0)		3 (15,0)	0 (0,0)		3 (20,0)	0 (0,0)	
Não	18 (94,7)	14 (87,5)		19 (86,4)	9 (100,0)		17 (85,0)	10 (100,0)		12 (80,0)	16 (100,0)	
TAMANHO DO TUMOR	N= 19	N= 18	0,19	N= 24	N= 9	0,43	N= 20	N= 11	0,06	N= 17	N= 16	0,30
≤ 3,5 cm	12 (63,2)	7 (38,9)		11 (45,8)	6 (66,7)		7 (35,0)	8 (72,7)		7 (41,2)	10 (62,5)	
> 3,5 cm	7 (36,8)	11 (61,1)		13 (54,2)	3 (33,3)		13 (65,0)	3 (27,3)		10 (58,8)	6 (37,5)	

Cont/ Tabela 4

	Leucócitos SOX2 ⁺		p* valor	SOX2 ⁺		p* valor	TCD3+ SOX2 ⁺		p* valor	TCD3+ SOX2 ⁺		p* valor
	Sangue Periférico			Tecido Tumoral			Sangue Periférico			Tecido Tumoral		
Valores Relativos (%) (percentil 50)	≤ 11,5	> 11,5		≤ 9,3	> 9,3		≤ 0,90	> 0,90		≤ 20	> 20	
METÁSTASES	N= 19	N= 18	0,65	N= 24	N= 9	1,00	N= 20	N= 11	0,11	N= 17	N= 16	0,33
Sim	2 (10,5)	3 (16,7)		4 (16,7)	1 (11,1)		1 (5,0)	3 (27,3)		4 (23,5)	1 (6,2)	
Não	17 (89,5)	15 (83,3)		20 (83,3)	8 (88,9)		19 (95,0)	8 (72,7)		13 (76,5)	15 (93,8)	
STATUS DE SOBREVIDA	N= 18	N= 18	0,02	N= 24	N= 9	1,00	N= 20	N= 11	1,00	N= 17	N= 16	0,65
Vivo	18 (100,0)	12 (66,7)		20 (83,3)	7 (77,8)		16 (80,0)	9 (81,8)		13 (76,5)	14 (87,5)	
Não	0 (0,0)	6 (33,3)		4 (16,7)	2 (22,2)		4 (20,0)	2 (18,2)		4 (23,5)	2 (12,5)	

*Teste exato de Fischer. Foi considerado significativo valor de $p < 0,05$. Os pacientes sem informações referentes às variáveis relacionadas na tabela foram excluídos destas análises.

5.11 ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS COM OS NÍVEIS DE pSTAT3+ E TCD3+pSTAT3+ENCONTRADOS NO SANGUE PERIFÉRICO E NO TECIDO TUMORAL DOS PACIENTES

Para as análises de associação das características clínicas com os níveis de pSTAT3+ e TCD3+ pSTAT3+, também foram utilizados como ponto de corte os valores de mediana (percentil 50) dos níveis relativos (%) encontrados no sangue e no tecido tumoral, como detalhado na Tabela 5.

Foi encontrada a associação dos níveis de TCD3+ pSTAT3+ no sangue periférico com o grau histológico. Foi observado que 96% dos pacientes com G1 apresentaram níveis sanguíneos de TCD3+ pSTAT3+ maiores que 0,53% ($p=0,01$). Não foi observada a associação dos níveis TCD3+ pSTAT3+ no tecido tumoral com as variáveis analisadas.

Nas análises dos níveis de leucócitos pSTAT3+ no sangue e da expressão de pSTAT3 no tecido tumoral, não foi observada associação com as variáveis clínicas estudadas (Tabela 5).

Tabela 5 - Análises da associação das características clínicas de acordo as medianas dos valores relativos de pSTAT3+ e TCD3+pSTAT3+encontradas no sangue periférico e no tecido tumoral dos pacientes com câncer de pênis

	Leucócitos pSTAT3+		p* valor	pSTAT3+		p* valor	TCD3+ pSTAT3+		p* valor	TCD3+ pSTAT3+		p* valor
	Sangue Periférico			Tecido Tumoral			Sangue Periférico			Tecido Tumoral		
Valores Relativos (%) (percentil 50)	≤ 3,6	> 3,6		≤ 0,7	> 0,7		≤ 0,53	> 0,53		≤ 1,3	> 1,3	
IDADE (anos)	N= 20	N= 17	0,19	N= 13	N= 14	0,02	N= 9	N= 25	0,70	N= 16	N= 15	0,15
≤ 60	12 (60,0)	6 (35,3)		10 (76,9)	4 (28,6)		5 (55,6)	11 (44,0)		10 (62,5)	5 (33,3)	
> 60	8 (40,0)	11 (64,7)		3 (23,1)	10 (71,4)		4 (44,4)	14 (56,0)		6 (37,5)	10 (66,7)	
LOCALIZAÇÃO	N= 21	N= 13	1,00	N= 13	N= 12	0,69	N= 30	N= 1	1,00	N= 16	N= 14	0,27
Glande	17 (80,9)	11 (84,6)		6 (46,2)	7 (58,3)		25 (80,6)	1 (100,0)		6 (37,5)	9 (64,3)	
Haste peniana e glande	4 (19,1)	2 (15,4)		7 (53,8)	5 (41,7)		6 (19,4)	0 (0,0)		10 (62,5)	5 (35,7)	
GRAU	N= 20	N= 17	1,00	N= 13	N= 14	0,59	N= 9	N= 25	0,01	N= 16	N= 15	0,10
G1	17 (85,0)	15 (88,2)		11 (84,6)	13 (92,9)		5 (55,6)	24 (96,0)		12 (75,0)	15 (100,0)	
G2/G3	3 (15,0)	2 (11,8)		2 (15,4)	1 (7,1)		4 (44,4)	1 (4,0)		4 (25,0)	0 (0,0)	
ESTADIAMENTO CLÍNICO	N= 18	N= 15	0,46	N= 12	N= 12	0,66	N= 7	N= 24	0,21	N= 14	N= 14	0,23
pT1	8 (44,4)	4 (26,7)		3 (25,0)	5 (41,7)		1 (14,3)	11 (45,8)		3 (21,4)	7 (50,0)	
pT2	10 (56,6)	11 (72,3)		9 (75,0)	7 (58,3)		6 (85,7)	13 (54,2)		11 (78,6)	7 (50,0)	
CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA	N= 15	N= 15	1,00	N= 13	N= 13	1,00	N= 7	N= 20	0,54	N= 16	N= 14	0,20
Usual	13 (86,7)	14 (93,3)		12 (92,3)	12 (92,3)		7 (100,0)	17 (85,0)		16 (100,0)	12 (85,7)	
Verruciforme	2 (13,3)	1 (6,7)		1 (7,7)	1 (7,7)		0 (0,0)	3 (15,0)		0 (0,0)	2 (14,3)	
INVASÃO PERINEURAL	N= 20	N= 16	0,27	N= 12	N= 14	0,70	N= 9	N= 24	0,43	N= 15	N= 15	0,44
Sim	8 (40,0)	3 (18,8)		4 (33,3)	6 (42,9)		4 (44,4)	7 (29,2)		7 (46,7)	4 (26,7)	
Não	12 (60,0)	13 (81,3)		8 (66,7)	8 (57,1)		5 (55,6)	17 (70,8)		8 (53,3)	11 (73,3)	
INVASÃO VASCULAR	N= 20	N= 15	1,00	N= 12	N= 13	0,59	N= 9	N= 24	1,00	N= 15	N= 14	1,00
Sim	2 (10,0)	1 (6,7)		2 (16,7)	1 (7,7)		1 (11,1)	2 (8,3)		2 (13,3)	1 (7,1)	
Não	18 (90,0)	14 (93,3)		10 (83,3)	12 (92,3)		8 (88,9)	22 (91,7)		13 (86,7)	13 (92,9)	
TAMANHO DO TUMOR	N= 20	N= 17	0,74	N= 13	N= 14	0,12	N= 9	N= 25	1,00	N= 16	N= 15	0,15
≤3,5 cm	11 (55,0)	8 (47,1)		4 (30,8)	9 (64,3)		5 (55,6)	13 (52,0)		6 (37,5)	10 (66,7)	
>3,5 cm	9 (45,0)	9 (52,9)		9 (69,2)	5 (35,7)		4 (44,4)	12 (48,0)		10 (62,5)	5 (33,3)	

Cont/ Tabela 5

	Leucócitos pSTAT3+		p* valor	pSTAT3+		p* valor	TCD3+ pSTAT3+		p* valor	TCD3+ pSTAT3+		p* valor
	Sangue Periférico			Tecido Tumoral			Sangue Periférico			Tecido Tumoral		
Valores Relativos (%) (percentil 50)	≤ 3,6	> 3,6		≤ 0,7	> 0,7		≤ 0,53	> 0,53		≤ 1,3	> 1,3	
METÁSTASES	N= 20	N= 17	1,00	N= 13	N= 14	0,16	N= 9	N= 25	0,56	N= 16	N= 15	1,00
Sim	3 (15,0)	2 (11,8)		4 (30,8)	1 (7,1)		0 (0,0)	4 (16,0)		3 (18,8)	2 (13,3)	
Não	17 (85,0)	15 (88,2)		9 (69,2)	13 (92,9)		9 (100,0)	21 (84,0)		13 (81,3)	13 (86,7)	
STATUS DE SOBREVIDA	N= 20	N= 16	0,37	N= 13	N= 14	1,00	N= 9	N= 25	1,00	N= 16	N= 15	0,65
Vivo	18 (90,0)	12 (75,0)		11 (84,6)	11 (78,6)		8 (88,9)	20 (80,0)		12 (75,0)	13 (86,7)	
Não	2 (10,0)	4 (25,0)		2 (15,4)	3 (21,4)		1 (11,1)	5 (20,0)		4 (25,0)	2 (13,3)	

*Teste exato de Fischer. Foi considerado significativo valor de $p < 0,05$. Os pacientes sem informações referentes às variáveis relacionadas na tabela foram excluídos destas análises.

5.12 ANÁLISE DECORRELAÇÃO ENTREO SANGUE PERIFÉRICO E O TECIDO TUMORAL DOS PACIENTES

Foram realizadas análises de correlação, para mostrar se os níveis de TCD3+, CD44^{high}CD24^{low} e de SOX2+ e pSTAT3+ encontrados no sangue periférico foram semelhantes ao do infiltrado tumoral. Houve correlação positiva entre os níveis encontrados no sangue periférico e no tecido tumoral de CD44^{high}CD24^{low}pSTAT3+, TCD3+SOX2+ e pSTAT3. Observou-se moderada correlação dos níveis CD44^{high}CD24^{low}pSTAT3+ ($r=0,669$; $p=0,024$), baixa correlação dos níveis de pSTAT3 ($r=0,487$; $p=0,018$) e baixa correlação dos níveis de TCD3+SOX2+ ($r=0,404$; $p=0,029$) entre o sangue e o tecido tumoral (Figura 25).

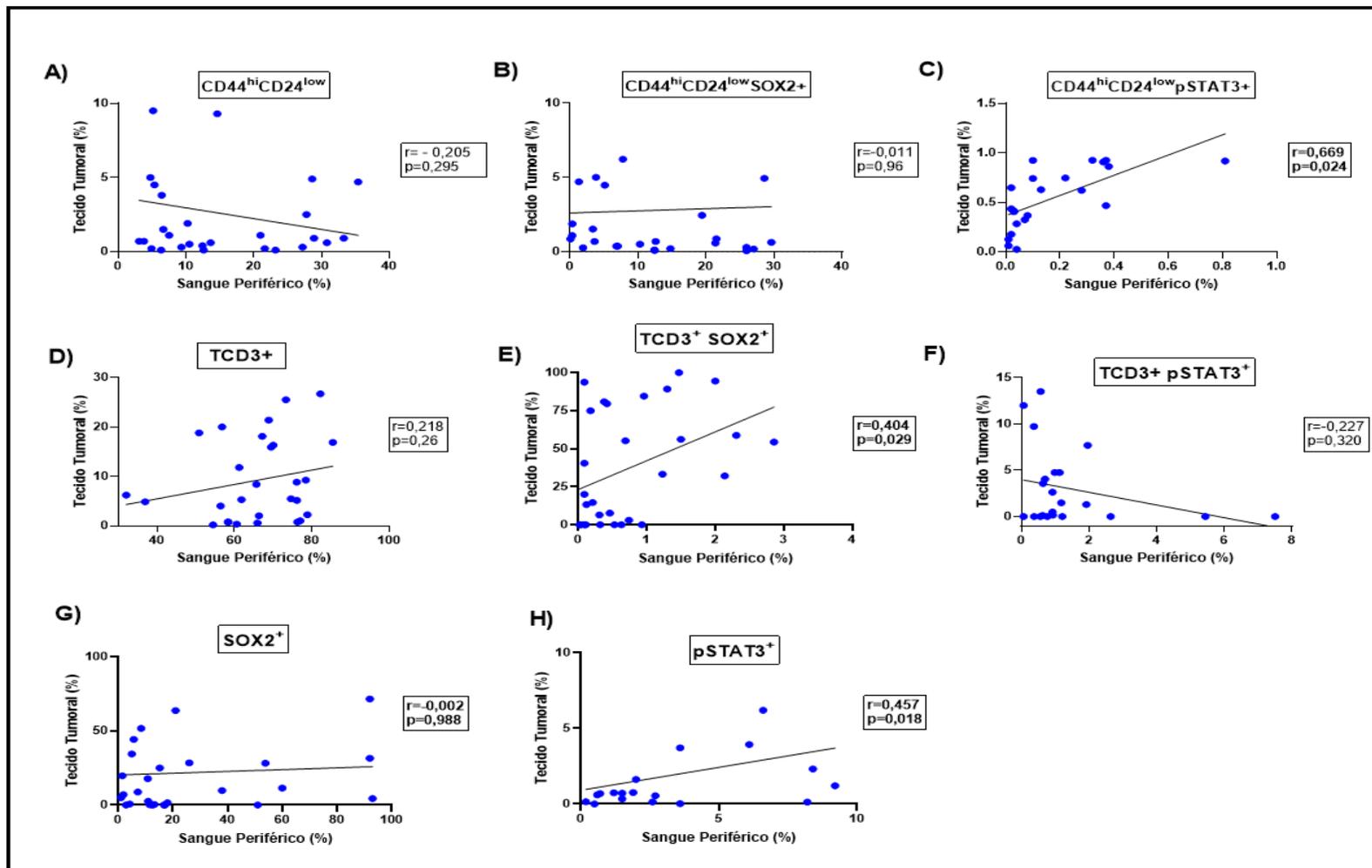


Figura 25 - Análise da correlação dos níveis TCD3⁺, CD44^{high}CD24^{low} e de SOX2⁺ e pSTAT3⁺ entre o sangue periférico e o tecido tumoral de pênis. Spearman correlation test. Foi considerado significativo $p < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho, foram avaliados pacientes com câncer de pênis atendidos no Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP), sendo o primeiro estudo desenvolvido no HCP que mostra o perfil de expressão de CD44^{high}CD24^{low}, STAT3+, SOX2+ e TCD3+ no sangue e no tecido tumoral no câncer de pênis. O HCP é responsável pelo atendimento de 55% dos pacientes com câncer do Estado de Pernambuco, sendo um hospital que atende exclusivamente a usuários do Sistema Único de Saúde (SUS). Foram avaliados 38 pacientes com CaPe com mediana de idade de 61 anos (37 - 80 anos). No mundo, observa-se o câncer de pênis na faixa etária entre 40 e 70 anos; no Brasil, a média está entre 55 e 60 anos, enquanto nos países desenvolvidos, a média é mais alta, em torno dos 70 anos (ORNELLAS et al. 1994; FAVORITO et al. 2008). HERNANDEZ et al. (2008) mostraram que, nos EUA, ocorreram mais mortes e diagnósticos em idades mais precoces entre os afrodescendentes, talvez devido ao fato de esse grupo, mesmo nos EUA, em sua maioria, ser de baixa condição socioeconômica.

A classificação da *National Comprehensive Cancer Network* (SPIESS e POCH 2017) considera como jovens idosos aqueles com idade entre maior que 65 e menor ou igual a 75 anos; idosos, entre maior que 76 e menor ou igual a 85 anos; e idosos muito idosos, maior que 85 anos (BALDUCCI et al. 2006). A OMS em 2015 considerou, nos países em desenvolvimento, idosos aquelas pessoas com idade acima de 60 anos, conforme a Política Nacional do Idoso (PNI), disposto na Lei nº 8. 842, de 4 de janeiro de 1994, sendo o mesmo parâmetro aplicado pelo Estatuto do Idoso, Lei

nº 10.741, de 1º de outubro de 2003 (Brasil 2013). Com base na classificação da OMS, os pacientes deste estudo foram distribuídos em dois grupos com idade ≤ 60 e >60 anos.

Na descrição das características clínicas, a glândula foi a mais acometida com o tumor primário, com 76% dos casos, seguida da haste peniana (14%). WANICK et al. (2011) mostraram uma série de CEC de pênis com 91% desta amostra em glândula, sendo a maior frequência de estágio pT2 (55,3%) e 5 casos de doença metastática (13,2%).

É pacífico na literatura que o carcinoma de pênis deve ser diagnosticado e tratado precocemente. No momento, o tratamento padrão ouro é o cirúrgico, sendo a cirurgia diretamente relacionada com o tamanho da lesão e da invasão (POMPEO 1993), e a linfadenectomia é uma forma de estadar e tratar, determinando o prognóstico para o doente, já que a presença de metástase para linfonodo representa o principal fator de prognóstico do carcinoma peniano (ORNELLAS et al. 1994; LOPES et al. 1996; MCDUGAL et al. 2005). A presença de linfonodos palpáveis nem sempre se traduz como doença metastática. Um pouco mais de 50% dos linfonodos palpáveis têm doença metastática, e 30% dos linfonodos não palpáveis têm doença metastática (MCDUGAL et al. 1995).

Neste estudo, as análises realizadas no sangue periférico apresentaram níveis percentuais elevados de células CD44^{high}CD24^{low} dos pacientes com câncer de pênis, quando comparadas às dos controles. Verificou-se que os níveis percentuais de células CD44^{high}/CD24^{neg} foram elevados nos pacientes com invasão perineural (IPN+) no sangue e no tecido tumoral, quando comparados aos sem invasão perineural. Para análise entre grupos com diferentes estágios da doença, os nossos pacientes

apresentaram elevados níveis de células CD44^{high}CD24^{low} no grupo com estágio pT2, quando comparados ao grupo com estágio pT1, apenas no sangue periférico. Esses dados sugerem que esses marcadores têm potencial como marcador de diagnóstico e prognóstico do CaPe, pois são conhecidos como marcadores de células-tronco tumorais e são utilizados principalmente para a identificação e isolamento de CSCs de diferentes tumores sólidos. O CD44 é considerado um marcador CSC em potencial na maioria dos tumores (DU et al. 2008; BOTCHKINA et al. 2009; LEUNG et al. 2010; ZHOU et al. 2010). O CD24 é outro importante marcador, cujo valor prognóstico e significância permanecem dependentes do nível de expressão.

Também se observou neste estudo um aumento dos níveis de células CD44^{high}CD24^{low} no grupo de pacientes com tumores maiores que 3,5cm. No tecido tumoral, os níveis dessas células foram reduzidos nos tumores maiores que 3,5 cm, sendo o inverso do que foi encontrado no sangue periférico. O CD24 foi investigado em combinação com o CD44 e outros marcadores em vários tipos de câncer. Após a identificação de CSCs no câncer de mama, esses dois marcadores ganharam um interesse considerável sendo estudada sua importância como marcadores de superfície de CSC em outros tipos tumorais (AL-HAJJ et al. 2003). GHUWALEWALA et al. (2016) mostraram que as células CD44^{high}CD24^{low} isoladas das linhas celulares de carcinoma escamoso oral não só expressam genes relacionados com células-tronco, mas também exibem características de transição epitelial-mesenquimatosa. Essa população de células CD44^{high}CD24^{low} deu origem a todos os outros tipos de células após a diferenciação.

No tecido tumoral, os níveis de células CD44^{high}CD24^{low}SOX2⁺ e de CD44^{high}CD24^{low}STAT3⁺ foram elevados nos pacientes com invasão perineural

(IPN+). Observou-se, porém, o inverso com relação ao grupo de pacientes com tumores maiores que 3,5cm, pois este apresentou níveis percentuais reduzidos de células CD44^{high}CD24^{low}SOX2⁺ e CD44^{high}CD24^{low}STAT3⁺, quando comparado ao grupo com tamanho menor que 3,5cm. Levantou-se a hipótese de que o ponto de corte definido para análises do tamanho tumoral pode ter influenciado os resultados deste estudo, já que houve uma discordância entre duas variáveis clínicas importantes no prognóstico do câncer de pênis, na invasão perineural e no tamanho do tumor.

Nas análises de associação das características clínicas com os níveis de células CD44^{high}/CD24^{low}, foram encontradas associação dos níveis de células CD44^{high}/CD24^{low} no sangue periférico com o tamanho do tumor ($p=0,04$); *status* de sobrevida ($p=0,01$) com maior frequência de tumor > 3 cm no grupo com valor acima de 12,6, e maior frequência de óbito no grupo com valor abaixo de 12,6. O *status* de células-tronco tumoral induzido por SOX2 foi demonstrado no câncer colorretal (CCR) *in vitro*, e foi associada redução da sobrevida nos pacientes CCR com elevada expressão tumoral de SOX2. Em consonância com essa hipótese, as células tumorais com expressão SOX2 mostraram uma expressão aumentada dos marcadores de células-tronco CD24 e CD44 (LUNDBERG et al. 2016). Já foi mostrado que o CD24 é regulado por SOX2, e o CD44 é também o principal receptor do componente hialurônico da matriz extracelular, tendo sido demonstrado que a expressão do CD44 nas células tumorais se correlaciona com a adesão das células tumorais às células endoteliais e também com a metástase. Em um estudo que avaliou um grupo de marcadores, incluindo SOX2 e CD44, identificaram pacientes com pior prognóstico (FANG et al. 2010; OLSEN et al. 2014; CAMILO et al. 2014; ONG et al. 2015).

Diferente do que foi observado no CCR, níveis reduzidos de

CD44^{high}/CD24^{low}SOX2⁺ no sangue e no tecido tumoral foram associados ao aumento da frequência de óbitos dos pacientes com câncer de pênis. Nas análises CD44^{high}/CD24^{low} pSTAT3⁺, porém, obtiveram-se valores de “p” próximo à significância estatística, com uma elevada frequência de óbito no grupo com valores elevados dessas células no sangue periférico. A expressão de SOX2 foi identificada como um marcador importante de células-tronco tumorais no câncer de cabeça e pescoço (CCP), no entanto a significância clínico-patológica e prognóstica da SOX2 em pacientes com CCP permanece controversa. Como, para o nosso conhecimento, não existem estudos que avaliaram células CD44^{high}/CD24^{low}SOX2⁺ nos diferentes tipos de carcinomas escamocelulares, particularmente câncer de pênis, não temos parâmetros que possam nos ajudar na interpretação dos nossos dados.

Alguns estudos relatam que os níveis de SOX2 são regulados pelo CD24, e isso nos remete a sugerir que a baixa expressão de CD24 possa ter interferido nos níveis de SOX2⁺. Estudos também indicam alta variação entre as proporções de CD44 e CD24 (LEUNG et. al. 2010; ZHOU et. al. 2010; JAGGUPILLI e ELKORD 2012). Assim, a noção da combinação definitiva de marcadores com base em suas propriedades fisiológicas e funcionais em cada tumor poderia ajudar na designação de uma combinação de marcadores específicos para cada tipo tumoral.

A análise de SOX2 e STAT3 foi realizada no sangue periférico de pacientes e controles. Foram observados níveis percentuais reduzidos de leucócitos SOX2⁺, TCD3⁺/SOX2⁺ e elevados de leucócitos pSTAT3⁺ nos pacientes, quando comparados aos controles. Por sua vez, no câncer de pulmão avançado, SODJA et al. (2016) mostraram que a expressão de SOX2 foi maior no sangue total de pacientes com câncer de pulmão de pequenas células avançado em comparação com controles saudáveis.

Foi estabelecida uma correlação significativa entre os níveis de expressão de SOX2 e o número de sítios metastáticos distantes. Na análise de sobrevida, pacientes com alta expressão de SOX2 apresentaram menor sobrevida global. Isso sugere que estágio mais avançado da doença pode modular os níveis de SOX2 no sangue.

Foi demonstrado que o STAT3 é constitutivamente ativado em células tumorais, células endoteliais e mieloides, macrófagos associados a tumores e células dendríticas. Outros estudos sugeriram que o STAT3 ativo é regulado positivamente em células imunes que infiltram o tumor, incluindo células dendríticas, células natural killer (NK) e granulócitos (WANG et al. 2004; KORTYLEWSKI et al. 2005; XIN et al. 2009). WANG et al. (2014) mostraram que o nível de pSTAT3 foi elevado nas células T no sangue periférico de pacientes com carcinoma hepático, quando comparado aos controles, no entanto, neste estudo, os pacientes com câncer de pênis não apresentaram diferença significativa de TCD3+pSTAT3+, quando comparados aos controles.

Nas análises de acordo com as características clínicas estudadas, observou-se aumento dos níveis de leucócitos totais SOX2+ no sangue dos pacientes com invasão perineural, com tumor maior que 3 cm e em estágio pT2. Isso mostra que a expressão de SOX2+ pode ser diferente nas diversas populações celulares. Também foi encontrada a associação dos níveis de leucócitos SOX2+ no sangue periférico com *status* de sobrevida dos pacientes com câncer de pênis, com 100% de óbitos no grupo com níveis > 11,5%. Com relação aos níveis de pSTAT3 no sangue, observou-se aumento dos níveis nos pacientes sem invasão perineural, sugerindo ser um marcador de prognóstico favorável no câncer de pênis.

Um estudo de meta-análises realizado por DONG et al. (2014) e baseado nos

dados de 7 estudos (9 coortes), para avaliar a associação entre a SOX2 e os parâmetros clínico-patológicos / prognósticos em pacientes com câncer de cabeça e pescoço (CCP), mostrou que *hazardratio* (HR) ou *oddsratio* com seu intervalo de confiança de 95% (CI) foi usado como a estimativa do tamanho do efeito. Os resultados da análise sugeriram que a elevada expressão de SOX2 foi um marcador preditivo desfavorável na sobrevida global dos pacientes com CCP. Além disso, o aumento de SOX2 também foi significativamente associado com tumores de alto grau histológico, estágio avançado TNM, metástase linfonodal e metástase a distância. Esses autores sugeriram que a expressão de SOX2 pode ser utilizada como um candidato a biomarcador prognóstico desfavorável para pacientes com CCP, indicando que pode ser um potencial alvo terapêutico.

No tecido tumoral dos pacientes comCaPe, verificaram-se baixos níveis percentuais de SOX2 dos pacientes com tamanhos maiores que 3,5cm, porém elevados nos pacientes em estágio pT2. Os níveis de SOX2 foram diferentes entre o sangue e o tecido tumoral nas análises por tamanho tumoral, o que sugere que os pacientes com tumores maiores que 3,0 cm tinham níveis elevados de leucócitos SOX2 no sangue devido à redução de migração dessas células para o tecido, levando à redução dos seus níveis no tecido tumoral. Os fatores de crescimento e os mediadores inflamatórios presentes no microambiente tumoral podem interferir na migração de células com maior expressão de SOX2+.

Os níveis de pSTAT3+ no tecido tumoral, no entanto, foram elevados nos pacientes com um melhor quadro clínico, pois houve aumento desse marcador nos pacientes em estágio pT1 e com tumores menores que 3,5 cm. Também se observou uma associação dos níveis de pSTAT3 com a idade dos pacientes: o grupo com idade

> 60 anos apresentou maiores níveis de pSTAT3. Devido a diversos estudos na literatura com evidências controversas da associação entre a expressão STAT3 e a sobrevida dos pacientes com tumores sólidos, WU et al. (2016) realizaram um estudo de meta-análise, utilizando 63 estudos com STAT3 identificados no *Medline (PubMed)*. Esses autores mostraram que a elevada expressão de STAT3 associou-se significativamente à pior sobrevida global em 3 anos e 5 anos nos pacientes com tumores sólidos. A análise de subgrupo mostrou que a expressão elevada de STAT3 foi associada com o pior prognóstico de câncer gástrico, câncer de pulmão, gliomas, câncer hepático, osteosarcoma, câncer de próstata, câncer pancreático, mas melhor prognóstico de câncer de mama.

Com relação aos níveis encontrados de células TCD3+ dos pacientes, foram encontrados baixos níveis dessas células nos tumores acima de 3,5 cm no sangue e tecido tumoral. YANG et al. (2017), realizado estudo em câncer de pulmão, relataram que os pacientes com índice elevado de linfócitos T apresentaram uma melhor sobrevida e sem progressão tumoral, indicando um prognóstico favorável.

Observou-se correlação dos níveis $CD44^{high}CD24^{low}pSTAT3+$, de pSTAT3 e de TCD3+SOX2+ entre o sangue e o tecido tumoral dos pacientes com câncer de pênis. Existe uma busca por marcadores pouco invasivos que possam servir para o diagnóstico e o prognóstico no câncer. O fato de termos encontrado correlação dos níveis desses marcadores entre o sangue e o tumor no câncer de pênis abre diversas possibilidades para que novos estudos avaliem esses marcadores antes e após tratamento, a associação com a sobrevida global e livre de doença ou de progressão. Segundo estudo de SODJA et al. (2016), a expressão de RNAm de SOX2 no sangue total pode ser um marcador não invasivo promissor para triagem molecular de câncer

de cabeça e pescoço e importante marcador prognóstico nos pacientes com doença avançada tratados com quimioterapia, indicando um papel importante dos reguladores de células-tronco tumorais circulantes na disseminação dos tumores.

Poucos trabalhos avaliaram pacientes com câncer de pênis, talvez por ser uma doença agressiva com importante impacto psicológico e social, e as maiores incidências são em países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos (FAVORITO et al. 2008).

Também é importante ressaltar que estudos comparando níveis de marcadores no sangue e no tecido tumoral utilizando um mesmo método de análises são poucos. Neste trabalho, foram utilizadas técnicas automatizadas quantitativas, o que reduz os vieses nos pontos de corte utilizados para os níveis percentuais marcadores no sangue e no tumor. Além disso, a investigação desses marcadores no sangue periférico apresenta algumas vantagens, como ser menos invasiva, de fácil acesso e possibilitando análises desde o diagnóstico, o tratamento e a recidiva. Este estudo amplia o conhecimento sobre a participação do SOX2+, STAT3+, CD44 e CD24 em um outro tipo de tumor, sendo que esses marcadores têm potencial com novas abordagens terapêuticas no câncer de pênis.

7 CONCLUSÃO

Com os resultados deste estudo, foi possível concluir:

- Existem alterações dos níveis de CD44^{high}CD24^{low}, CD44^{high}CD24^{low}pSTAT3⁺ e CD44^{high}CD24^{low}SOX2 no sangue e no tecido tumoral dos pacientes CaPE, sendo esses marcadores bem conhecidos para avaliar o prognóstico de diferentes tumores.
- A presença de níveis detectáveis de CD44^{high}CD24^{low}, CD44^{high}CD24^{low}pSTAT3⁺ e CD44^{high}CD24^{low}SOX2 no sangue periférico dos pacientes evidenciados por exames menos invasivos, de fácil acesso e o que possibilita obter diagnóstico e prognóstico.
- Os níveis elevados de CD44^{high}CD24^{low} e SOX2 nos pacientes com doença avançada sugerem que esses marcadores podem predizer o prognóstico no câncer de pênis;
- Existe correlação dos níveis de alguns marcadores CD44^{high}CD24^{low}pSTAT3⁺ entre o sangue e o tecido, o que reforça que é possível avaliar esses marcadores no sangue, sem a necessidade de esperar a ressecção do tumor de pênis;
- Existe associação dos níveis CD44^{high}CD24^{low} e CD44^{high}CD24^{low}SOX2 no sangue e no tecido com *status* de sobrevida, sendo a níveis baixos desses marcadores associados ao aumento da frequência do óbito no câncer de pênis, reforçando o valor do prognóstico do CD44, CD24 e SOX2;
- No câncer de pênis, a presença de p-STAT3 e TCD3⁺ foi associada a um prognóstico mais favorável, pois foram observados níveis mais elevados nos pacientes sem invasão e em estágio pT1.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aigner S, Ramos CL, Hafezi-Moghadam A, et al. CD24 mediates rolling of breast carcinoma cells on P-selectin. **FASEB J** 1998; 12:1241-51.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 2003; 100:3983-8.

Backert I, Koralov SB, Wirtz S, et al. STAT3 activation in Th17 and Th22 cells controls IL-22-mediated epithelial host defense during infectious colitis. **J Immunol** 2014; 193:3779-91.

Barros EN, Melo MCB. Câncer de pênis: perfil sócio-demográfico e respostas emocionais à penectomia em pacientes atendidos no Serviço de Psicologia do Hospital de Câncer de Pernambuco. **Rev SBPH** 2009; 12:99-111.

Bass AJ, Watanabe H, Mermel CH, Yu S, Perner S, et al. SOX2 is an amplified lineage survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas. **Nat Genet** 2009; 41:1238-42.

Baumgarten AS, Alhammali E, Hakky TS, et al. Salvage surgical resection for isolated locally recurrent inguinal lymph node metastasis of penile cancer international study collaboration. **J Urol** 2014; 192:760-4.

Benveniste EN, Liu Y, McFarland BC, Qin H. Involvement of the janus kinase/signal transducer and activator of transcription signaling pathway in multiple sclerosis and the animal model of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Interferon Cytokine Res** 2014; 34:577-88.

Bollrath J, Phesse TJ, von Burstin VA, et al. gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. **Cancer Cell** 2009; 15:91-102.

Botchkina IL, Rowehl RA, Rivadeneira DE, et al. Phenotypic subpopulations of metastatic colon cancer stem cells: genomic analysis. **Cancer Genomics Proteomics** 2009; 6:19-29.

Brasil. Ministério da Saúde. **Estatuto do idoso**. 3ª ed. 2ª reimp. Brasília; 2013. Disponível em: <URL: <https://bit.ly/2uNwiqo>> [2018 ago 12]

Brinton LA, Juan-Yao L, Shou-De R, et al. Risk factors for penile cancer: results from a case-control study in China. **Int J Cancer** 1991; 47:504-9.

Bromberg J, Darnell JE Jr. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. **Oncogene** 2000; 19:2468-73.

Burkholder B, Huangb R, Burgess R, et al. Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks. **Biochim Biophys Acta** 2014; 1845:182-201.

Camilo V, Barros R, Celestino R, et al. Immunohistochemical molecular phenotypes of gastric cancer based on SOX2 and CDX2 predict patient outcome. **BMC Cancer** 2014; 14:753.

Catalona WJ. Modified inguinal lymphadenectomy for carcinoma of the penis with preservation of saphenous veins: technique and preliminary results. **J Urol** 1988; 140:306-10.

Catalona WJ. Role of lymphadenectomy in carcinoma of the penis. **Urol Clin North Am** 1980; 7:785-92.

Chaux A, Tamboli P, Ayala A, et al. Warty-basaloid carcinoma: clinicopathological features of a distinctive penile neoplasm. Report of 45 cases. **Mod Pathol** 2010; 23:896-904.

Chen SH, Murphy DA, Lassoued W, Thurston G, Feldman MD, Lee WM. Activated STAT3 is a mediator and biomarker of VEGF endothelial activation. **Cancer Biol Ther** 2008; 7:1994-2003.

Chou YT, Lee CC, Hsiao SH, et al. The emerging role of SOX2 in cell proliferation and survival and its crosstalk with oncogenic signaling in lung cancer. **Stem Cells** 2013; 31:2607-19.

Chung SS, Aroh C, Vadgama JV. Constitutive activation of STAT3 signaling regulates hTERT and promotes stem cell-like traits in human breast cancer cells. **PLoS One** 2013; 8:e83971.

Coelho RWP, Pinho JD, Moreno JS, Garbis DVEO, do Nascimento AMT, et al. Penile cancer in Maranhão, Northeast Brazil: the highest incidence globally? **BMC Urol** 2018; 18:50.

Couto TC, Arruda RM, Couto MC, Barros FD. Epidemiological study of penile cancer in Pernambuco: experience of two reference centers. **Int Braz J Urol** 2014; 40:738-44.

Crawshaw JW, Hadway P, Hoffland D, et al. Sentinel lymph node biopsy using dynamic lymphoscintigraphy combined with ultrasound-guided fine needle aspiration in penile carcinoma. **Br J Radiol** 2009; 82:41-8.

Cruvinel WM, Mesquita Júnior D, Araújo JA, et al. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev Bras Reumatol** 2010; 50:434-61.

Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. Cancer stem cells: models and concepts. **Annu Rev Med** 2007; 58:267-84.

Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. **Science** 1994; 264:1415-21.

Darnell JE Jr. STATs and gene regulation. **Science** 1997; 277:1630-5.

Darnell JE Jr. Validating Stat3 in cancer therapy. **Nat Med** 2005; 11:595-6.

Dodd KM, Yang J, Shen MH, Sampson JR, Tee AR. mTORC1 drives HIF-1alpha and VEGF-A signaling via multiple mechanisms involving 4E-BP1, S6K1 and STAT3. **Oncogene** 2015; 34:2239-50.

Dong Z, Liu G, Huang B, Sun J, Wu D. Prognostic significance of SOX2 in head and neck cancer: a meta-analysis. **Int J Clin Exp Med** 2014; 7:5010-20.

Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. **Nat Rev Cancer** 2004; 4:11-22.

Du L, Wang H, He L, et al. CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. **Clin Cancer Res** 2008; 14:6751-60.

Fang X, Yu W, Li L, et al. ChIP-seq and functional analysis of the SOX2 gene in colorectal cancers. **Omics** 2010; 14:369-84.

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.

Ficarra V, Zattoni F, Artibani W, et al. Nomogram predictive of pathological inguinal lymph node involvement in patients with squamous cell carcinoma of the penis. **J Urol**

2006; 175:1700-4.

Folkman J, Klagsbrun M. Vascular physiology. a family of angiogenic peptides. **Nature** 1987; 329:671-2.

Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **N Engl J Med** 1971; 285:1182-6.

Fonseca AG, Pinto JASA, Marques MC, Drosdoski FS, Fonseca Neto LOR. Estudo epidemiológico do câncer de pênis no Estado do Pará, Brasil. **Rev Pan-Amaz Saude** 2010; 1:85-90.

Gen Y, Yasui K, Nishikawa T, Yoshikawa T. SOX2 promotes tumor growth of esophageal squamous cell carcinoma through the AKT/mammalian target of rapamycin complex 1 signaling pathway. **Cancer Sci** 2013; 104:810-6.

Ghuwalewala S, Ghatak D, Das P, et al. CD44 (high)CD24(low) molecular signature determines the cancer stem cell and EMT phenotype in oral squamous cell carcinoma. **Stem Cell Res** 2016; 16:405-17.

Graafland NM, Leijte JA, Valdés Olmos RA, Hoefnagel CA, Teertstra HJ, Horenblas S. Scanning with 18F-FDG-PET/CT for detection of pelvic nodal involvement in inguinal node-positive penile carcinoma. **Eur Urol** 2009; 56:339-45.

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, Leal ML, Campos RS, et al. Do proliferating cell nuclear antigen and MIB-1/Ki-67 have prognostic value in penile squamous cell carcinoma? **Urology** 2007; 70:137-42.

Guimarães GC, Cunha IW, Soares FA, et al. Penile squamous cell carcinoma clinicopathological features, nodal metastasis and outcome in 333 cases. **J Urol** 2009; 182:528-34.

Hakenberg OW, Compérat EM, Minhas S, Necchi A, Protzel C, Watkin N. EAU guidelines on penile cancer: 2014 update. **Eur Urol** 2015; 67:142-50.

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

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. **Cell** 2000; 100:57-70.

Hernandez BY, Barnholtz-Sloan J, German RR, et al. Burden of invasive squamous cell carcinoma of the penis in the United States 1998-2003. **Cancer** 2008; 113(10 Suppl):2883-91.

Heyns CF, Fleshner N, Sangar V, Schlenker B, Yuvaraja TB, van Poppel H. Management of the lymph nodes in penile cancer. **Urology** 2010; 76(2 Suppl 1):S43-57.

Honeth G, Bendahl PO, Ringnér M, et al. The CD44+/CD24- phenotype is enriched in basal-like breast tumors. **Breast Cancer Res** 2008; 10:R53.

Horenblas S, Van Tinteren H, Delemarre JF, Moonen LM, Lustig V, Kröger R. Squamous cell carcinoma of the penis: accuracy of the tumors, nodes and metastasis classification system, and role of lymphangiography, computerized tomography scan and fine needle aspiration cytology. **J Urol** 1991; 146:1279-83.

Huang CF, Xu XR, Wu TF, Sun ZJ, Zhang WF. Correlation of ALDH1, CD44, OCT4 and SOX2 in tongue squamous cell carcinoma and their association with disease progression and prognosis. **J Oral Pathol Med** 2014; 43:492-8.

Huynh J, Chand A, Gough D, Ernst M. Therapeutically exploiting STAT3 activity in cancer - using tissue repair as a road map. **Nat Rev Cancer** 2019; 19:82-96.

Jaggupilli A, Elkord E. Significance of CD44 and CD24 as cancer stem cell markers: an enduring ambiguity. **Clin Dev Immunol** 2012; 2012:708036.

Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, Shlomchik M. **Immunobiology: the immune system in health and disease**. 5th ed. New York: Garland Science; 2001. Principles of innate and adaptive immunity; p.1.5-1.13.

Ji J, Zheng PS. Expression of Sox2 in human cervical carcinogenesis. **Hum Pathol** 2010; 41:1438-47.

Kokko LL, Hurme S, Maula SM, et al. Significance of site-specific prognosis of cancer stem cell marker CD44 in head and neck squamous-cell carcinoma. **Oral Oncol** 2011; 47:510-6.

Kortylewski M, Kujawski M, Wang T, et al. Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. **Nat Med** 2005; 11:1314-21.

Kristiansen G, Winzer KJ, Mayordomo E, et al. CD24 expression is a new prognostic marker in breast cancer. **Clin Cancer Res** 2003; 9:4906-13.

Lawindy SM, Rodriguez AR, Horenblas S, Spiess PE. Current and future strategies in the diagnosis and management of penile cancer. **Adv Urol** 2011; 2011:593751.

Lee HJ, Choe G, Jheon S, Sung SW, Lee CT, Chung JH. CD24, a novel cancer biomarker, predicting disease-free survival of non-small cell lung carcinomas: a retrospective study of prognostic factor analysis from the viewpoint of forthcoming (seventh) new TNM classification. **J Thorac Oncol** 2010; 5:649-57.

Leung EL, Fiscus RR, Tung JW, et al. Non-small cell lung cancer cells expressing CD44 are enriched for stem cell-like properties. **PLoS One** 2010; 5:e14062.

Levy DE. Physiological significance of STAT proteins: investigations through gene disruption in vivo. **Cell Mol Life Sci.** 1999; 55:1559-67.

Liotta LA, Kleinerman J, Saidel GM. Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. **Cancer Res** 1974; 34:997-1004.

Liu AY, Cai Y, Mao Y, Lin Y, Zheng H, et al. Twist2 promotes self-renewal of liver cancer stem-like cells by regulating CD24. **Carcinogenesis** 2014; 35:537-45.

Lont AP, Gallee MP, Meinhardt W, van Tinteren H, Horenblas S. Penis conserving treatment for t1 and t2 penile carcinoma: clinical implications of a local recurrence. **J Urol** 2006; 176:575-80.

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, Rossi BM, Nakagawa WT. Câncer de pênis. **Ambito Hospitalar** 1994; 5:5-13.

Lundberg IV, Edin S, Eklöf V, Öberg Å, Palmqvist R, Wikberg ML. SOX2 expression is associated with a cancer stem cell state and down-regulation of CDX2 in colorectal cancer. **BMC Cancer** 2016; 16:471.

McDougal WS, Kirchner FK Jr, Edwards RH, Killion LT. Treatment of carcinoma of the penis: the case for primary lymphadenectomy. **J Urol** 1986; 136:38-41.

Meijer RP, Boon TA, van Venrooij GE, Wijburg CJ. Long-term follow-up after laser therapy for penile carcinoma. **Urology** 2007; 69:759-62.

Mesquita Júnior D, Araújo JA, Catelan TT, et al. Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Rev Bras Reumatol** 2010; 50:552-80.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Tipos de câncer: câncer de pênis: versão para profissionais de saúde**. Rio de Janeiro; Última modificação: 30/10/2018. Disponível em: <URL:<https://bit.ly/2N7Ch1f>> [2019 jan 13]

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.

Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: renal, penile, and testicular tumours. **Eur Urol** 2016; 70:93-105.

Mohs FE, Snow SN, Larson PO. Mohs micrographic surgery for penile tumors. **Urol Clin North Am** 1992; 19:291-304.

Montes Cardona CE, García-Perdomo HA. Incidence of penile cancer worldwide: systematic review and meta-analysis. **Rev Panam Salud Publica** 2017; 41:e117.

Moura CM, Pontes J Jr, Reis ST, et al. Expression profile of standard and variants forms of CD44 related to prostate cancer behavior. **Int J Biol Markers** 2015; 30:e49-e55.

Nagarajan D, McArdle SEB. Immune landscape of breast cancers. **Biomedicines** 2018; 6:E20.

Naor D, Wallach-Dayana SB, Zahalka MA, Sionov RV. Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination. **Semin Cancer Biol** 2008; 18:260-7.

Napier SL, Healy ZR, Schnaar RL, Konstantopoulos K. Selectin ligand expression regulates the initial vascular interactions of colon carcinoma cells: the roles of CD44V and alternative sialofucosylated selectin ligands. **J Biol Chem** 2007; 282:3433-41.

Olsen J, Espersen ML, Jess P, Kirkeby LT, Troelsen JT. The clinical perspectives of CDX2 expression in colorectal cancer: a qualitative systematic review. **Surg Oncol** 2014; 23:167-76.

Ong CW, Chong PY, McArt DG, et al. The prognostic value of the stem-like group in colorectal cancer using a panel of immunohistochemistry markers. **Oncotarget** 2015; 6:12763-73.

Ornellas AA, Seixas AL, Marota A, Wisnescky A, Campos F, de Moraes JR. Surgical treatment of invasive squamous cell carcinoma of the penis: retrospective analysis of 350 cases. **J Urol** 1994; 151:1244-9.

Palmer DC, Restifo NP. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in T cell differentiation, maturation, and function. **Trends Immunol** 2009; 30:592-602.

Pettaway CA, Srigley JR, Brookland RK, et al. Penis. In: Amin MB, Edge SB, Greene FL, et al. editors. **AJCC cancer staging manual**. 8th ed. New York: Springer; 2017. p.701.

Pickert G, Neufert C, Leppkes M, et al. STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. **J Exp Med** 2009; 206:1465-72.

Pinho MSL. Célula tronco tumoral: novo conceito em carcinogênese colorretal. **Rev Bras Colo-Proctol** 2009; 29:120-4.

Pompeo ACL. **Linfadenectomia inguinal estagiada em câncer de pênis: avaliação prospectiva de 50 pacientes**. São Paulo; 1993. [Tese de Livre Docência-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo].

Pompeo ACL. Câncer de pênis. In: Nardoza Júnior A, Zerati Filho M, Reis RB, editores. **Urologia fundamental**. São Paulo: Planmark; 2010. p.171-7.

Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2003; 4:33-45.

Ren ZH, Zhang CP, Ji T. Expression of SOX2 in oral squamous cell carcinoma and the association with lymph node metastasis. **Oncol Lett** 2016; 11:1973-9.

Rizzino A. The Sox2-Oct4 Connection: Critical players in a much larger interdependent network integrated at multiple levels. **Stem Cells** 2013; 31:1033-9.

Sahlberg SH, Spiegelberg D, Glimelius B, Stenerlöw B, Nestor M. Evaluation of cancer stem cell markers CD133, CD44, CD24: association with AKT isoforms and radiation resistance in colon cancer cells. **PLoS One** 2014; 9:e94621.

Saisorn I, Lawrentschuk N, Leewansangtong S, Bolton DM. Fine-needle aspiration cytology predicts inguinal lymph node metastasis without antibiotic pretreatment in penile carcinoma. **BJU Int** 2006; 97:1225-8.

Shackleton M. Normal stem cells and cancer stem cells: similar and different. **Semin Cancer Biol** 2010; 20:85-92.

Shah MF, Nasir IU, Pirzada MT, Anwer AW, Ahmed I, Mir K. Penile cancer: experience at tertiary care hospital. **J Cancer Allied Spec** 2017; 3:1-6.

Silva MJCN. **Análise da expressão de marcadores de células-tronco tumorais em queiliteactínica e carcinoma epidermóide de lábio**. São Paulo; 2017. [Dissertação de Mestrado-Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo].

Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. **Oncogene** 2010; 29:4741-51.

Siveen KS, Sikka S, Surana R, et al. Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: role of synthetic and natural inhibitors. **Biochim Biophys Acta** 2014; 1845:136-54.

Sodja E, Rijavec M, Koren A, Sadikov A, Korošec P, Cufar T. The prognostic value of whole blood SOX2, NANOG and OCT4 mRNA expression in advanced small-cell lung cancer. **Radiol Oncol** 2016; 50:188-96.

Spiess PE, Poch MA. Management of penile cancer. **Transl Androl Urol** 2017; 6:783-4.

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.

Stark GR, Darnell JE Jr. The JAK-STAT pathway at twenty. **Immunity** 2012; 36:503-14.

Stevanovic M, Zuffardi O, Collignon J, Lovell-Badge R, Goodfellow P. The cDNA sequence and chromosomal location of the human SOX2 gene. **Mamm Genome** 1994; 5:640-2.

Tabatabaei S, Harisinghani M, McDougal WS. Regional lymph node staging using lymphotropic nanoparticle enhanced magnetic resonance imaging with ferumoxtran-10 in patients with penile cancer. **J Urol** 2005; 174:923-7.

Tewari M, Kumar M, Shukla HS. Nd: Yag laser treatment of early stage carcinoma of the penis preserves form and function of penis. **Asian J Surg** 2007; 30:126-30.

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.

Tye H, Kennedy CL, Najdovska M, et al. STAT3-driven upregulation of TLR2 promotes gastric tumorigenesis independent of tumor inflammation. **Cancer Cell** 2012; 22:466-78.

Wallen JJ, Baumgarten AS, Kim T, Hakky TS, Carrion RE, Spiess PE. Optimizing penile length in patients undergoing partial penectomy for penile cancer: novel application of the ventral phalloplasty oncoplastic technique. **Int Braz J Urol** 2014; 40:708-9.

Wang J, Zeng H, Li H, Zhang J, Wang S. Roles of sex-determining region Y-box 2 in cell pluripotency and tumor-related signaling pathways. **Mol Clin Oncol** 2015; 3:1203-7.

Wang T, Niu G, Kortylewski M, et al. Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. **Nat Med** 2004; 10:48-54.

Wang X, Xin W, Zhang H, et al. Aberrant expression of p-STAT3 in peripheral blood CD4+ and CD8+ T cells related to hepatocellular carcinoma development. **Mol Med Rep** 2014; 10:2649-56.

Wang Y, Shen Y, Wang S, Shen Q, Zhou X. The role of STAT3 in leading the crosstalk between human cancers and the immune system. **Cancer Lett** 2018; 415:117-28.

Wanick FB, Teichner TC, Silva R, Magnanini MM, Azevedo LM. Squamous cell carcinoma of the penis: clinicopathologic study of 34 cases. **An Bras Dermatol** 2011;

86:1082-91.

Watanabe H, Ma Q, Peng S, et al. SOX2 and p63 colocalize at genetic loci in squamous cell carcinomas. **J Clin Invest** 2014; 124:1636-45.

Weiss G, Schaible UE. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. **Immunol Rev** 2015; 264:182-203.

Wen S, Ren W, Xue B, et al. Prognostic factors in patients with penile cancer after surgical management. **World J Urol** 2018; 36:435-40.

Wu P, Wu D, Zhao L, et al. Prognostic role of STAT3 in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. **Oncotarget** 2016; 7:19863-83.

Xin H, Zhang C, Herrmann A, Du Y, Figlin R, Yu H. Sunitinib inhibition of Stat3 induces renal cell carcinoma tumor cell apoptosis and reduces immunosuppressive cells. **Cancer Res** 2009; 69:2506-13.

Yang P, Ma J, Yang X, Li W. Peripheral CD4⁺ naïve/memory ratio is an independent predictor of survival in non-small cell lung cancer. **Oncotarget** 2017; 8:83650-9.

Yao A, Ingargiola MJ, Lopez CD, Sanati-Mehrizy P, Burish NM, Jablonka EM, Taub PJ. Total penile reconstruction: a systematic review. **J Plast Reconstr Aesthet Surg** 2018; 71:788-806.

Yu CL, Meyer DJ, Campbell GS, et al. Enhanced DNA-binding activity of a Stat3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein. **Science** 1995; 269:81-3.

Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. **Nat Rev Cancer** 2009; 9:798-809.

Yuvaraja TB, Waigankar S, Dharmadhikari N, Pednekar A. Organ preservation surgery for carcinoma penis. **Indian J Surg Oncol** 2017; 8:59-63.

Zhou L, Jiang Y, Yan T, et al. The prognostic role of cancer stem cells in breast cancer: a meta-analysis of published literatures. **Breast Cancer Res Treat** 2010; 122:795-801.

Apêndice 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do paciente e do controle

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: **AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO SOX2/SOX4 E DO RECEPTOR CD44 COMO BIOMARCADOR DE PROGNÓSTICO NO CÂNCER DE PÊNIS**

Nome do Voluntário: _____

Você é um paciente matriculado no HCP com diagnóstico confirmado de câncer de pênis, em breve, será submetido a tratamento com cirurgia e/ou tratamento clínico.

Por isso está sendo convidado a participar de um projeto que envolve a coleta de sangue e de um fragmento do seu tecido tumoral. Para que você possa decidir se quer participar ou não deste projeto, precisa conhecer seus benefícios, riscos e consequências. Após receber todas as informações abaixo, você poderá fornecer seu consentimento por escrito, caso queira participar.

PROPÓSITO E OBJETIVO DO PROJETO

Este projeto é um esforço conjunto entre pesquisadores para utilizar os recentes avanços na medicina na tentativa de diagnosticar precocemente casos de câncer de pênis, como também buscar soluções que facilitem o tratamento dos pacientes com câncer de pênis.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Voltamos a afirmar que você está sendo convidado para participar deste estudo e, se concordar em participar, será necessária a realização de coleta de sangue bem como da coleta de amostras do tumor (fazer biopsias). Você não precisará ser submetido a nem um procedimento a mais, para participar desta pesquisa, já que poderemos aproveitar a mesma biopsia que será realizada para fazer o seu diagnóstico.

Portanto, nada será retirado (nenhuma biopsia será realizada além da biopsia necessária para fazer seu diagnóstico e tratamento). Este material será armazenado em “congeladores” no Laboratório de pesquisa translacional-IMIP até o momento de ser utilizado na nossa pesquisa. Além disso, serão pesquisadas informações no seu prontuário, como por exemplo: idade, tipo do tumor e estadiamento do tumor após a cirurgia.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA - Isto é apenas um convite.

Caso você não aceite o convite para participar deste projeto de pesquisa, basta que você não assine este termo de Consentimento, e nenhuma amostra será utilizada nem os seus registros médicos serão consultados.

O seu tratamento será exatamente o mesmo, caso você participe ou não deste estudo. Não haverá risco adicional para a obtenção de amostras para o presente estudo. Durante o projeto, você terá o acompanhamento normal junto ao seu médico do HCP, que é responsável pela sua assistência.

BENEFÍCIOS

Possivelmente não haverá benefício para você diretamente durante o seu tratamento. Pode haver um benefício para seus familiares no caso de uma doença familiar ser

diagnosticada.

Este estudo poderá, no entanto, resultar em benefícios para outros pacientes que terão o diagnóstico de câncer de pênis e que irão fazer o tratamento.

Mapeamento genético da neoplasia maligna do pênis com a possibilidade de individualizar o tratamento para tumores mais agressivos e menos invasivo e para tumores não agressivos.

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

Além da equipe de saúde que cuidará de você, seus registros médicos poderão ser consultados pelo Comitê de Ética do Hospital de Câncer de Pernambuco e pela equipe de pesquisadores envolvidos. As amostras de tecido serão processadas de tal forma, que sua privacidade e identidade sejam preservadas. Seu nome não será revelado, ainda que as informações de seu registro médico sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos.

TRATAMENTO MÉDICO EM CASO DE DANOS

Caso você aceite este convite e se você tiver a necessidade de atendimento médico, durante ou após este estudo, este ficará a cargo da instituição. Seu tratamento e acompanhamento médico independem de sua participação neste estudo.

CUSTOS

Caso você aceite este convite e se você tiver a necessidade de atendimento médico, você não terá qualquer custo ou forma de pagamento pela participação no projeto de pesquisa. A participação no projeto é voluntária, e você não sofrerá nem uma penalidade, caso não autorize a sua participação. Todo o seu tratamento e acompanhamento médico serão os mesmos, independente de sua decisão de autorizar ou não a participação no projeto.

BASES DA PARTICIPAÇÃO

Caso você aceite este convite, é importante que você saiba que a sua participação neste estudo é completamente voluntária e que você pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento, sem penalidades ou perda de benefícios a que você tem direito. Em caso de desistência, a equipe assistente deve ser comunicada, e a coleta de amostras para os exames relativos ao estudo será imediatamente interrompida.

O médico responsável por sua internação pode interromper sua participação no estudo a qualquer momento, mesmo sem a sua autorização.

Nós estimulamos você ou seus familiares a fazer perguntas a qualquer momento do estudo. Neste caso, por favor, ligue para o Dr. Felipe Dubourcq, no telefone (81) 96661112. Se você tiver perguntas com relação a seus direitos como participante do estudo clínico, também pode contar com uma segunda pessoa imparcial, o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Pernambuco, Avenida Cruz Cabugá 1597, Santo Amaro, telefones (81) 3217-8197. E-mail: cep@hcp.org.br.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre esta pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Câncer de Pernambuco (CEP-HCP) que objetiva defender os interesses dos participantes, respeitando seus direitos e contribuir para o desenvolvimento da pesquisa desde que

atenda às condutas éticas.

O CEP-HCP está situado à Avenida Cruz Cabugá 1597 - Santo Amaro. Diretoria de Pesquisa do HCP, tel.: 3217-8197 – e-mail: cep@hcp.org.br O CEP/HCP funciona de segunda à sexta-feira, nos seguintes horários: 07:00 às 11:30 (manhã) e 13:30 às 16:00 (tarde).

CONSENTIMENTO

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o objetivo e os testes laboratoriais que serão realizados neste trabalho.

Ficaram claros para mim quais são os objetivos do estudo, os testes laboratoriais que serão realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que estou isento de despesas e que terei a garantia do acesso a tratamento hospitalar, quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízos ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido ou no meu atendimento neste serviço. Declaro estarem claros para mim quais são os objetivos desta atividade, como participarei, que terei garantia de confidencialidade e a certeza de que obterei esclarecimentos a qualquer momento bem como a retirada deste consentimento a qualquer momento. Estou ciente de que minha participação é isenta de despesas ou ganhos financeiros e que isso não irá interferir no meu tratamento.

Se os meus materiais biológicos guardados no Biorrepositório do Hospital de Câncer de Pernambuco forem utilizados em pesquisas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa, escolho livremente a opção abaixo assinalada:

Autorizo a utilização dos meus materiais biológicos sem necessidade de novo consentimento a cada pesquisa.

Desejo ser contatado para autorizar o uso dos meus materiais biológicos a cada pesquisa e, em caso de impossibilidade de contato comigo, indico que a nova autorização seja fornecida pelo senhor (a): _____
(nome e contato do familiar ou representante legal)

assinatura do participante

Assinatura do Responsável Legal/Testemunha Imparcial

Recife, _____ de _____ 20____

Dra. Leuridan Cavalcante Torres
Dr. Felipe Dubourcq de Barros
(Pesquisadores responsáveis)

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Controle
saudável)**

1. Nome Do Convidado.....

Documento de Identidade Nº: Sexo : M . F .

Data Nascimento:/...../.....

Endereço Nº Apto:

Bairro: Cidade

.....Cep:.....

Telefone: Ddd (.....)

2.Responsável Legal

Natureza (Grau De Parentesco, Tutor, Curador
Etc.)

Documento de Identidade:.....Sexo: M . F .

Data Nascimento.:/...../.....

Endereço: Nº Apto:

Bairro:.....Cidade:.....

Cep:.....Telefone:(.....).....

1. Título do Projeto: Avaliação da Expressão do Sox2/Sox4 e do Receptor Cd44 Como Biomarcador de Prognóstico no Câncer de Pênis

2. Pesquisadores Responsáveis: Cargo/Função:

Dr. Gustavo Guimaraes – Urologista do Hospital A. C. Camargo -SP

Dra. Leuridan Cavalcante Torres - Pesquisadora do Laboratório de Pesquisa Translacional do Imip

Dr. Felipe Dubourcq de Barros - Urologista do HCPE

3. Unidade: Hospital do Câncer de Pernambuco, Laboratório de Pesquisa Translacional do Imip

4. Avaliação do Risco da Pesquisa:

Sem Risco_

Risco Mínimo X

Risco Médio_

Risco Baixo_

Risco Maior_

5. Duração da Pesquisa: 48 Meses

6. O objetivo deste trabalho é estudar a imunidade dos pacientes com câncer de pênis. **Portanto, convidamos o senhor (a) para participar deste trabalho como indivíduo controle.**

7. Os testes laboratoriais serão relacionados com a imunidade.

8. Serão feitas coletas de 10 mL de sangue periférico para realização dos testes laboratoriais.

9. Existe um risco mínimo para o participante. A coleta poderá provocar uma mancha vermelha ou roxa no local da picada da agulha. Os pais dos pacientes serão orientados de como tratar, caso ocorra mancha vermelha ou roxa no local.

10. Não existe benefício direto **para a pessoa convidada.**

11. **Os pesquisadores envolvidos com este projeto estarão disponíveis para esclarecer as dúvidas que surgirão durante o desenvolvimento do estudo. Os principais investigadores são Dra. Leuridan Cavalcante Torres e Dr. Felipe da Silva Marinho, que são encontrados no Departamento de Oncologia Clínica do Hospital do Câncer de Pernambuco, na Avenida Cruz Cabugá 1597, Santo Amaro, Recife - PE (Telefone: 81 32178000). Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do HCP, na Avenida Cruz Cabugá 1597, Santo Amaro, Recife - PE (Telefone: 81 32178000). Horário: segunda à sexta, das 8h às 12h e das 14h às 16h.**

12. **Os convidados** poderão desistir de fazer parte da pesquisa.

13. Não serão divulgados os nomes dos **convidados.**

14. Os **convidados** poderão ser informados dos resultados obtidos nos testes laboratoriais.

15. Os **convidados** não terão nem um custo pessoal durante a realização do trabalho, incluindo exames e consultas. Não haverá compensação financeira para os participantes.

16. Em caso de dano físico, diretamente causado pela coleta de sangue, o convidado tem o direito a tratamento médico no Hospital do Câncer de Pernambuco.

17. Os pesquisadores deste trabalho se comprometem a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o objetivo e os testes laboratoriais que serão realizados neste trabalho. Ficaram claros para mim quais são os objetivos do estudo, os testes laboratoriais que serão realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que meu filho (a) ou **convidado está isento de despesas e que tem a garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário.** Concordo voluntariamente que meu filho (a) participe (ou em participar) deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízos ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido ou no atendimento neste serviço.

CONSENTIMENTO

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o objetivo e os testes laboratoriais que serão realizados neste trabalho.

Ficaram claros para mim quais são os objetivos do estudo, os testes laboratoriais que serão realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que estou isento de despesas e que terei a garantia do acesso a tratamento hospitalar quando

necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízos ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido ou no meu atendimento neste serviço.

Declaro estarem claros para mim quais são os objetivos desta atividade, como participarei, que terei garantia de confidencialidade e a certeza de que obterei esclarecimentos a qualquer momento, bem como retirada deste consentimento a qualquer momento. Estou ciente de que minha participação é isenta de despesas ou ganhos financeiros e que isso não irá interferir no meu tratamento.

Se os meus materiais biológicos guardados no Biorrepositório do IMIP/HCP/GENOMIKA forem utilizados em pesquisas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa, escolho livremente a opção abaixo assinalada:

Autorizo a utilização dos meus materiais biológicos sem necessidade de novo consentimento a cada pesquisa.

Desejo ser contatado para autorizar o uso dos meus materiais biológicos a cada pesquisa e, em caso de impossibilidade de contato comigo, indico que a nova autorização seja fornecida pelo senhor (a): _____

(nome e contato do familiar ou representante legal)

Assinatura do participante:

Assinatura do Responsável Legal/Testemunha Imparcial

Recife, _____ de _____ 20 _____

Dra. Leuridan Cavalcante Torres

Dr. Felipe Dubourcq de Barros

(Pesquisadores responsáveis)

Apêndice 2 - Ficha Clínica

FICHA CLÍNICA

1. **NOME**

2. **IDADE:**

3. **RG:**

4. **DATA**

5. **MATRICULA:**

6. **LOCALIZAÇÃO DA LESÃO**

GLANDE () CORPO () BASE ()

7. **LINFONODOS PALPÁVEIS**

SIM () NÃO ()

8. **LHP**

CEC () OUTROS ()

9. **IHQ - p16**

Positivo () Negativo ()

10. **ESTADIAMENTO CLÍNICO**

T__N__M__

11. **CIRURGIA**

SIM () NÃO () QUANDO _____

12. **TIPO DE CIRURGIA**

FALECTOMIA () CIRURGIA CONSERVADORA ()

13. **LHP CIRÚRGICO**

Pt__pN__

14. **GRAU DE DIFERENCIAÇÃO**

G1 () G2 () G3 () G4 ()

15. **IPN**

SIM () NÃO ()

16. **IAL**

SIM () NÃO ()

17. MARGENS COMPROMETIDAS

SIM () NÃO ()

10. METÁSTASES LINFONODAIS

SIM () NÃO ()

11. LINFONODO ACOMETIDO

INGUINAL () ILIACO ()

11 ÓBITO

SIM () NÃO () QUANDO _____

Anexo 1 - Parecer Consubstanciado do CEP/HCP

SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO SOX2/SOX4 E DO RECEPTOR CD44 COMO BIOMARCADOR DE PROGNOSTICO NO CÂNCER DE PÊNIS

Pesquisador: FELIPE DUBOURCQ DE BARROS

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 44832015.2.0000.5205

Instituição Proponente: SOCIEDADE PERNAMBUCANA DE COMBATE AO CÂNCER -SPCC

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
FUNDAÇÃO DE AMPARO A CIÊNCIA E TECNOLOGIA - FACEPE
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.098.227

Data da Relatoria: 09/06/2015

Apresentação do Projeto:

O projeto em questão será um estudo prospectivo, exploratório e translacional

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a expressão do receptor de superfície CD44 e dos fatores de transcrição SOX2 e SOX4 no câncer escamoso de pênis primário e metastático

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos para os sujeitos são inerentes ao tipo de tratamento e não a pesquisa em questão. Os riscos para a comunidade são mínimos.

Benefícios:

O potencial benefício advindo das informações geradas pela pesquisa poderá contribuir para o manejo de casos semelhantes no futuro. Os benefícios diretos para os sujeitos da pesquisa são inexistentes.

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.040-000

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (813)217-8197

Fax: (813)217-8197

E-mail: cep@hcp.org.br

SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC



Continuação do Parecer: 1.096.227

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto de acordo, atende aos critérios éticos. A metodologia está bem descrita nos detalhes da pesquisa, assim como está claro o local da pesquisa e o número de participantes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE com linguagem Clara e acessível ao paciente

Recomendações:

nenhuma

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

projeto aprovado, após apresentação da carta de anuência do laboratório

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita apreciação da CONEP:

Não

Considerações finais a critério do CEP:

RECIFE, 09 de Junho de 2015

Assinado por:
ISABEL CRISTINA LEAL
(Coordenador)

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597
Bairro: Santo Amaro CEP: 50.040-000
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (813)217-8197 Fax: (813)217-8197 E-mail: cep@hcp.org.br

Anexo 2 - Sistema de Estadiamento TNM AJCC 7ª EDIÇÃO

TUMOR PRIMÁRIO (T)		
Tx	Tumor primário não pode ser identificado	
T0	Sem evidência de tumor primário	
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>	
Ta	Carcinoma verrucoso não invasivo	
T1a	O tumor invade tecido conjuntivo subepitelial, sem invasão linfovascular ou de alto grau	
T1b	O tumor invade tecido conjuntivo subepitelial, com invasão linfovascular ou de alto grau	
T2	Tumor invade o corpo esponjoso ou cavernoso	
T3	Tumor invade invasão de uretra	
T4	Tumor invade estruturas adjacentes	
LINFONODOS REGIONAIS (N)		
	Clínico	Patológico
Nx	Não acessíveis	Não acessíveis
N0	Não palpáveis ou aumentados	Sem metástases linfonodais
N1	Linfonodo inguinal palpável e móvel unilateral	Metástase em um único linfonodo inguinal
N2	Linfonodos inguinais múltiplos ou bilaterais	Metástases múltiplas ou bilaterais em linfonodos regionais
N3	Massa inguinal palpável fixa ou linfadenomegalia pélvica uni ou bilateral	metástases com extensão extranodal ou metástases em linfonodos pélvicos
METÁSTASES A DISTÂNCIA (M)		
M0	Sem metástases a distância	
M1	Com metástases a distância	

Fonte: Adaptado de SOBIN et al. (2009)