

PERFIL DE EXPRESSÃO DOS FATORES DE TRANSCRIÇÃO STAT1, STAT4 E T-BET NO CARCINOMA ESCAMOSO DE PÊNIS

MAURO RICARDO LIMA MARQUES

**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: Prof. Dr. Fernando Augusto Soares

Co-Orientador: Dra. Leuridan Cavalcante Torres

São Paulo

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Ensino Apoio ao aluno da Fundação Antônio Prudente*

M355 Marques, Mauro Ricardo Lima

Perfil de expressão dos fatores de transcrição STAT1, STAT4 e T-bet no carcinoma escamoso de pênis. Mauro Ricardo Lima Marques – São Paulo, 2020.

52p.

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

Orientador: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. Fatores de transcrição/Transcription Factors. 2. Neoplasias Penianas/Penile Neoplasms. 3. Citometria de Fluxo/Flow Cytometry. 4. Linfócito T/T Lymphocytes. 5. Fator de Transcrição STAT1/STAT1 Transcription Factor. 6. Fator de Transcrição STAT4/STAT4 Transcription Factor.

Elaborado por Suely Francisco CRB 8/2207

*Todos os direitos reservados à FAP. A violação dos direitos autorais constitui crime, previsto no art. 184 do Código Penal, sem prejuízo de indenizações cabíveis, nos termos da Lei nº 9.610/08.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Joardivan e Nidete**, por sempre terem acreditado em mim e não terem medido esforços para prover a educação para seus filhos, em um ambiente de muito carinho, amor e respeito.

À minha esposa, **Cynthia**, pela tolerância, paciência e ajuda, sempre comigo nas horas mais felizes e nas mais difíceis.

Aos meus filhos, **Victor e Luana**, por terem completado o sentido da minha vida.

Às minhas irmãs, **Alessandra e Juliana**, companheiras para todas as horas, sempre por perto, mantendo forte a união da nossa família.

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes que participaram do estudo, por nos permitir gerar conhecimento científico em um momento tão difícil de suas vidas;

Ao Prof. Dr. **Fernando Augusto Soares**, pela orientação e por ter compartilhado seu vasto conhecimento científico e pelo empenho na geração deste Dinter;

À Dra. **Leuridan Cavalcante Torres**, alma do projeto, minha coorientadora, sem a qual não teríamos conseguido trilhar este caminho desconhecido e árduo. Mas a sua força, conhecimento e paixão pelo o que nos motivou a seguir sempre em frente. A você, meu agradecimento e todo meu respeito;

Ao Professor Dr. **José Iran Costa Júnior**, por ter sido uma pessoa chave na realização deste projeto e ter acreditado na nossa capacidade e no futuro científico do Hospital de Câncer de Pernambuco;

Aos amigos **do grupo do doutorado**, pela iniciativa deste projeto, pelo encorajamento nos momentos de desânimo e pelo cuidado dedicado a todos;

Aos amigos **Felipe da Silva Marinho e Felipe Dubourcq de Barros, Gustavo Borges Vasconcelos Gouveia e Jorge da Motta Silveira Barbosa Júnior**, pela colaboração na elaboração do projeto, dedicação aos pacientes na tentativa de providenciar o melhor tratamento, sempre de forma humanizada;

À **Direção Geral do Hospital de Câncer de Pernambuco e do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira**, pelo apoio ao projeto de pesquisa e pelo suporte à sua realização;

À **equipe do Laboratório de Pesquisa Translacional do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira**, pelo cuidado e seriedade com que realizam seu trabalho;

Aos médicos e funcionários do Serviço de Urologia do Hospital de Câncer de Pernambuco, todos e cada um, em suas atribuições, colaboraram para que eu pudesse seguir em frente;

Aos fellows de urologia oncológica do Hospital de Câncer de Pernambuco, pela assistência diária e cuidado com os pacientes;

À **bibliotecária Edna Maria Leite Meirelles Paixão**, pela paciência e esmero no fornecimento dos artigos científicos solicitados, sempre disposta a nos ajudar no que fosse preciso;

A todos do Bloco Cirúrgico do Hospital de Câncer de Pernambuco, sempre dispostos a nos ajudar no que fosse preciso;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste projeto.

RESUMO

Marques MR. **Perfil de expressão dos fatores de transcrição STAT-1, STAT-4 e T-bet no carcinoma escamoso de pênis.** [Tese]. São Paulo; Programa de Pós-Graduação em Oncologia da Fundação Antônio Prudente em Parceria com o Hospital de Câncer de Pernambuco; 2020.

Introdução: O câncer de pênis (CaPe) é uma doença rara em países desenvolvidos, porém representa um problema de saúde pública em países em desenvolvimento. O Brasil tem a maior incidência de CaPe do mundo, chegando a atingir até 6,8 casos por 100.000 homens, principalmente na região norte/nordeste, onde o índice de desenvolvimento humano é o pior do país. Seu diagnóstico ocorre geralmente de forma tardia, retardando o tratamento e piorando o prognóstico. As células Th1 atuam na imunidade celular e expressam fatores de transcrição como transdutor de sinal e ativador de transcrição 1 (STAT1) e 4 (STAT4). Os fatores STAT1 e STAT4 estão relacionados a diversas funções do sistema imune e na oncogênese, além de promover o início do processo de diferenciação das células T “naive” em T efectoras do tipo Th1. A desregulação da via JAK/STAT está associada com a formação de tumores primários, assim como com a supressão da resposta imune, o que leva ao aumento da sobrevivência tumoral e da angiogênese. **Objetivo:** O objetivo geral deste estudo foi avaliar a expressão de STAT1, STAT4 e T-bet nos linfócitos T circulantes pacientes com carcinoma escamoso de pênis. **Métodos:** Foi realizado um estudo de corte transversal, com 30 pacientes com CaPe atendidos no ambulatório de Urologia do Hospital de Câncer de Pernambuco e 15 controles saudáveis do sexo masculino. As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Pesquisa Translacional do IMIP. A análise da expressão de STAT1, STAT4 e T-bet foi realizada por citometria de fluxo. Para análise estatística das variáveis numéricas foi aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Foi utilizado teste não paramétricos de Mann-Whitney e o de correlação de Spearman. Foi adotado o nível de significância estatística de $p < 0.05$. Para análise de correlação foi realizado o teste de Spearman. Toda a análise estatística foi realizada através do GraphPadPrism v6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). **Resultados:** Foi observado redução dos níveis percentuais de linfócitos B no sangue periférico de pacientes com CaPe quando comparados aos controles ($p=0.0002$). Os níveis percentuais de linfócitos T com expressão de STAT1 e STAT4 foram elevados ($p=0,004$ e $p=0,008$, respectivamente) em comparação ao grupo controle. Os níveis de linfócitos T com expressão de T-bet nos pacientes foram inferiores quando comparados aos dos controles ($p=0,02$). Observou-se que pacientes

com tamanho tumoral $<3,5$ cm apresentaram níveis percentuais elevados de células T CD8+ quando comparados aos com tamanho $\geq 3,5$ cm ($p=0,04$). Verificou-se que os pacientes com IPN negativa obtiveram níveis percentuais elevados de linfócitos T CD8+ ($p=0,04$) e de linfócitos T com expressão de STAT1, STAT4 e T-bet quando comparados aos pacientes IPN positiva ($p=0,0004$, $p=0,02$ e $p=0,0001$, respectivamente). Foi observada também a correlação entre T-bet e STAT4 nos pacientes com CaPe ($r=0,58$; $p=0.002$). **Conclusão:** Os fatores de transcrição STAT1, STAT4 e T-bet estão associados a doença avançada, e podem estar diretamente relacionados as alterações dos níveis de linfócitos B e TCD8+ nos pacientes com câncer de pênis.

Descritores: Fatores de transcrição, Neoplasias Penianas, Citometria de Fluxo, Linfócitos T. Fatores de transcrição STAT1, Fatores de transcrição STAT4

ABSTRACT

Marques MR. [Expression profile of STAT-1, STAT-4 and T-bet transcription factors in squamous carcinoma of the penile]. [Tese]. São Paulo; Programa de Pós-Graduação em Oncologia da Fundação Antônio Prudente em Parceria com o Hospital de Câncer de Pernambuco; 2020.

Introduction: Penile cancer (CaPe) is a rare disease in developed countries, but it represents a public health problem in developing countries. Brazil has the highest incidence of CaPe in the world, reaching up to 6.8 cases per 100,000 men, mainly in the north / northeast region, where the human development index is the worst in the country. Its diagnosis usually occurs late, delaying treatment and worsening the prognosis. Th1 cells act on cellular immunity and express transcription factors such as signal transducer and transcription activator 1 (STAT1) and 4 (STAT4). The factors STAT1 and STAT4 are related to several functions of the immune system and oncogenesis, in addition to promoting the differentiation of “naive” T cells into effector T-type Th1 cells. Deregulation of the JAK / STAT pathway is associated with the formation of primary tumors, as well as with the suppression of the immune response, which leads to increased tumor survival and angiogenesis. Objective: The general objective of this study was to evaluate the expression of STAT1, STAT4 and T-bet in circulating T lymphocytes in patients with squamous carcinoma of the penis. Methods: A cross-sectional study was carried out with 30 CaPe patients seen at the Urology outpatient clinic of the Hospital de Câncer de Pernambuco and 15 healthy male controls. Laboratory analyzes were performed at the Translational Research Laboratory at IMIP. The analysis of the expression of STAT1, STAT4 and T-bet was performed by flow cytometry. For statistical analysis of numerical variables, the Shapiro-Wilk normality test was applied. Mann-Whitney non-parametric tests and Spearman's correlation tests were used. The level of statistical significance was set at $p < 0.05$. For correlation analysis, the Spearman test was performed. All statistical analysis was performed using GraphPadPrism v6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Results: A reduction in the percentage levels of B lymphocytes in the peripheral blood of patients with CaPe was observed when compared to controls ($p = 0.0002$). The percentage levels of T lymphocytes with STAT1 and STAT4 expression were high ($p = 0.004$ and $p = 0.008$, respectively) compared to the control group. The levels of T lymphocytes with T-bet expression in patients were lower when compared to controls ($p = 0.02$). It was observed that patients with tumor size < 3.5 cm had high percentage

levels of CD8 + T cells when compared to those with size ≥ 3.5 cm ($p = 0.04$). It was found that patients with negative IPN obtained high percentage levels of CD8 + T lymphocytes ($p = 0.04$) and T lymphocytes with expression of STAT1, STAT4 and T-bet when compared to patients with positive IPN ($p=0.0004$, $p = 0.02$ and $p = 0.0001$, respectively). The correlation between T-bet and STAT4 was also observed in patients with CaPe ($r = 0.58$; $p = 0.002$). Conclusion: The transcription factors STAT1, STAT4 and T-bet are associated with advanced disease and may be directly related to changes in the levels of B lymphocytes and TCD8 + in patients with penile cancer.

Keywords: Transcription factors, Penile Neoplasms, Flow Cytometry, Lymphocytes T. STAT1 Transcription factors, STAT4 Transcription factors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Lesão tumoral peniana localizada em glândula e prepúcio.....	4
Figura 2	As citocinas IL-12 ou IL-4 promove a ativação das células TCD4+ “naive” levando a expansão clonal e diferenciação de células efetoras Th1 e Th2, respectivamente.....	8
Figura 3	Ativação da via JAK/STAT, dimerização da molécula STAT, seguido de translocação nuclear e ativação da transcrição	10
Figura 4	Sinalização e transcrição na diferenciação Th1. Indução de T-bet e IFN- γ pelo TCR, seguido pela ativação de STAT4 e STAT1	12
Figura 5	Ativação das NK feita através da integração dos sinais de ativação e receptores inibitórios	13
Figura 6	Análises dos valores percentuais de T CD3+, T CD4+, T CD8+, linfócitos B e células NK no sangue periférico de pacientes com câncer de pênis (CaPe) e grupo controle (CTRL)	23
Figura 7	Análises dos valores percentuais de linfócitos T com expressão de STAT1, STAT4 e T-bet no sangue periférico de pacientes com câncer de pênis (CaPe) e grupo controle (CTRL)	24
Figura 8	Análises dos valores percentuais de T CD3+, T CD4+, T CD8+, linfócitos B e células NK no sangue periférico de pacientes com câncer de pênis com tumores < 3,5 cm e $\geq$ 3,5 cm.....	25

Figura 9	Análise dos percentuais de linfócitos T com expressão de STAT1, STAT4 e T-bet no sangue periférico dos pacientes com CaPe com tamanho do tumor < 3,5 e ≥ 3,5 cm.....	26
Figura 10	Análises dos valores percentuais de T CD3, T CD4, T CD8, linfócitos B e células NK no sangue periférico de pacientes com câncer de pênis com presença de invasão perineural (IPN+) e ausência de IPN (IPN-).....	27
Figura 11	Análise dos percentuais de linfócitos T com expressão de STAT1, STAT4 e T-bet no sangue periférico dos pacientes com câncer de pênis com presença de invasão perineural (IPN+) e ausência de IPN (IPN-).....	28
Figura 12	Correlação entre STAT4 e STAT1, T-bet e STAT1, e T-bet e STAT4 no grupo câncer de pênis e no grupo controle.....	29
Tabela 1	Descrição da frequência absolutas e relativas das características clínicas dos pacientes com câncer escamoso de pênis.....	22

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AJCC	do inglês, <i>American Joint Committee on Cancer</i>
APC	do inglês, <i>Antigen Presenting Cell</i>
CaPe	Câncer de Pênis
CEC	Carcinoma Escamocelular
CTRL	Controles
DNA	do inglês, <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DC	do inglês, <i>Dendritic Cells</i>
HPV	do inglês, Human Papiloma Virus
HCP	Hospital do Câncer de Pernambuco
IFN-γ	Interferon gama
IL	Interleucina
IMIP	Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira
IPN+	com Invasão Perineural
IPN-	sem Invasão Perineural
JAK	do inglês, <i>Janus Kinase</i>
LNM	Metástase Linfonodal
MHC I/II	do inglês, <i>Major histocompatibility complex class I e II</i>
NK	do inglês, <i>Natural killer</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação de Cadeia de Polimerase
PET/CT	Tomografia Computadorizada com emissão de Pósitrons
RNM	Ressonância Magnética Nuclear
STAT1	do inglês, Signal Transducer and Activator of Transcription 1
STAT4	do inglês, Signal Transducer and Activator of Transcription 4
TC	Tomografia Computadorizada
TCR	do inglês, <i>T Cell Receptor</i>
T-bet	do inglês, <i>T-box expressed in T Cells</i>
TCD4⁺	Linfócito T CD4 positivo
TCD8⁺	Linfócito T CD8 positivo
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
Th	do inglês, <i>T helper</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Câncer de Pênis.....	2
1.1.1	Epidemiologia e Histologia	2
1.1.2	História Natural, Diagnóstico e Tratamento	3
1.1.3	Sistema Imune no Câncer de Pênis.....	5
2	JUSTIFICATIVA	12
3	OBJETIVOS	14
3.1	Objetivo Geral	15
3.2	Objetivos Específicos	15
4	MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1	Detalhes do Estudo e Aspectos Éticos.....	17
4.2	População do Estudo.....	17
4.3	Critérios de Elegibilidade	17
4.3.1	Critérios de Inclusão	17
4.3.2	Critérios de Exclusão	17
4.4	Procedimentos de Captação de Pacientes e Controles	18
4.5	Testes Laboratoriais.....	18
4.5.1	Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo	18
4.6	Análises Estatísticas.....	19
4.6.1	Análises Descritivas e de Associação	19
4.6.2	Análise de Correlação.....	19
5	RESULTADOS	21
5.1	Descrição das características clínicas	22
5.2	Análises dos níveis de linfócitos TCD3+, TCD4+, TCD8+, B e células NK nos pacientes e controles	23
5.3	Análises dos níveis de STAT1, STAT4 E T-bet em linfócitos nos pacientes e	

	controles.....	24
5.4	Análises dos níveis de linfócitos TCD3+, TCD4+, TCD8+, B e células NK de acordo com o tamanho do tumor	25
5.5	Análises dos níveis de STAT1, STAT4 E T-bet em linfócitos de acordo com o tamanho do tumor	26
5.6	Análises dos níveis de linfócitos TCD3+, TCD4+, TCD8+, B e células NK de pacientes com e sem invasão perineural	27
5.7	Análises dos níveis de STAT1, STAT4 E T-bet de pacientes com e sem invasão perineural	28
5.8	Análises Análise da correlação entre STAT4 vs STAT1, T-bet vs STAT1 e T-bet vs STAT4 de pacientes e controles	29
6	DISCUSSÃO	30
7	CONCLUSÃO.....	37
8	REFERÊNCIAS.....	39

APÊNDICES

Apêndice 1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Apêndice 2 Questionário padrão / ficha clínica

ANEXOS

Anexo 1 Comprovante de aprovação pelo CEP do HCP

Anexo 2 TNM pela AJCC 7ª Edição



INTRODUÇÃO



1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE PÊNIS

1.1.1 Epidemiologia e Histologia

O câncer de pênis (CaPe) é uma doença agressiva e mutilante, tendo incidência global estimada em 26.000 casos por ano, a qual varia significativamente conforme sua localização geográfica (Bleeker et al. 2009). Trata-se de uma patologia rara em países desenvolvidos, porém representa um problema de saúde pública em países em desenvolvimento, como o Brasil. Nos Estados Unidos (EUA) a incidência é cerca de 0,5% de todas as malignidades que acometem o sexo masculino, enquanto em países da África, Índia e América do Sul, pode estar acima de 6% (Bleeker et al. 2009; Bethune et al. 2012; Clark et al. 2013; Mentrikoski et al. 2014; Siegel et al. 2016). Mesmo nos países desenvolvidos a incidência varia geograficamente, estando mais elevada na Inglaterra e Dinamarca, com taxas de 1,6% e 1,4% de todas as malignidades, respectivamente (Sewell et al. 2015; Keeping et al. 2015).

O Brasil é responsável por uma das maiores casuísticas de CaPe no mundo, variando entre 2,1 a 6,8 casos por 100.000 habitantes. A incidência tem se mostrado inversamente proporcional ao nível sócio-econômico e educacional de uma população (McIntyre et al. 2011; Hakenberg et al. 2015). As regiões norte e nordeste, as quais concentram a maioria dos casos, possuem o pior índice de desenvolvimento humano do país e apresentam incidência de CaPe acima de 10% de todas as malignidades do homem (Favorito et al. 2008; Pow-Sang et al. 2010).

A incidência do CaPe aumenta com a idade, atingindo o pico em torno da sexta década de vida. Porém, em países em desenvolvimento, onde se registra uma maior incidência da doença, observa-se um aumento do percentual de diagnósticos em homens jovens, abaixo dos 45 anos de idade (Barnholtz-Sloan et al. 2007; Favorito et al. 2008; Hakenberg et al. 2015). Até o momento, a idade não é considerada fator prognóstico no CaPe, porém o diagnóstico em indivíduos jovens tem sido associado a maior agressividade da doença (Paiva et al. 2015).

O carcinoma escamocelular (CEC) é o principal tipo histológico do CaPe, presente em cerca de 95% dos casos e origina-se geralmente na glândula ou no prepúcio. Apesar disto, existe uma variedade distinta de subtipos histológicos de CEC de pênis de acordo com as características clínico-patológicas. A OMS reclassificou as variantes do CEC em dois grupos, de acordo com a infecção pelo HPV. Os subtipos basaloide, papilar basaloide, células claras, linfopitelioma-like e warty estão relacionados ao HPV e os subtipos usual, verrucoso,

pseudoglandular, circulatum, papilar, adenoescamoso, sarcomatoide e misto não possuem relação (Cubilla et al. 1998 e 2001; Chaux et al. 2010; Guimarães et al. 2011; Chaux e Cubilla 2012).

O subtipo usual está presente em torno de 70% dos casos, sendo o mais frequente subtipo de CEC de pênis e caracteriza-se por sua agressividade e tendência a disseminação metastática e apesar de não estar relacionado ao HPV, está presente em cerca de um terço dos casos (Compérat 2018).

1.1.2 História Natural, Diagnóstico e Tratamento

O diagnóstico do CaPe muitas vezes é feito de forma tardia. O atraso pode ocorrer devido ao medo, vergonha, ignorância, negação pessoal e dificuldade de acesso ao serviço de saúde. A presença de fimose, ao encobrir a glândula, pode dificultar a visualização da lesão, além de prejudicar a higiene genital. O retardo no diagnóstico pode acontecer por mais de um ano em até 50% dos casos, levando à morte precoce por ausência de tratamento adequado (Misra et al. 2004). Após o diagnóstico, os pacientes vão à óbito em torno de 2 anos, caso não seja realizado o tratamento (Kroon et al. 2005). A lesão tumoral, geralmente indolor, é a principal queixa, localizando-se principalmente na glândula e prepúcio, seguido pelo corpo peniano. Pode invadir corpos cavernosos e esponjoso. Outros sintomas são corrimento, dor, sangramento e disúria.



Figura 1 - Lesão tumoral peniana localizada em glândula e prepúcio

A etiologia é multifatorial, sendo os principais fatores de risco a fimose, inflamações crônicas do prepúcio, higiene genital inadequada, tabagismo, múltiplos parceiros sexuais, zoofilia, trauma peniano e a infecção pelo papilomavírus humano (HPV) (Dillner et al. 2000; Bezerra et al. 2001; Kayes et al. 2007; Christodoulidou et al. 2015). Apesar de aumentar os riscos de doenças sexualmente transmissíveis, como o HPV, o prepúcio não é condição independente para câncer de pênis, sendo observado baixa incidência tumoral em países desenvolvidos com baixas taxas de circuncisão.

O diagnóstico do CaPe é feito através da história clínica, exame físico e biópsia da lesão com amostra da camada profunda e centro da lesão e obtendo fragmentos do tecido normal. Pode ser incisional ou excepcional naqueles tumores pequenos. A disseminação primária ocorre através dos canais linfáticos. A glândula e os corpos cavernosos drenam para os linfonodos inguinais superficiais e profundos, enquanto o prepúcio, apenas para os superficiais. A metástase linfonodal (LNM) é o principal fator prognóstico e determinante de sobrevida no CaPe (Lopes et al. 1996). Nestes casos, mesmo com a linfadenectomia, quimioterapia e radioterapia, o prognóstico é sombrio, com sobrevida em torno de 6 meses em casos de LNM pélvica (Di Lorenzo et al. 2013). O estadiamento tumoral e o grau histológico também são considerados fatores de risco, além de serem fatores preditivos positivos para LNM (Kroon et al. 2005). A invasão perineural (IPN) foi incluída na 8ª atualização do guideline do *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) TNM, onde a classificação T1 do CaPe foi dividida em T1a na ausência de IPN, invasão angio-linfática ou grau tumoral 3, e T1b na presença de pelo menos um destes fatores (Paner et al. 2018). Outros fatores como volume tumoral, profundidade da invasão, subtipo histológico e margem de ressecção positiva também são descritos como tendo valor prognóstico, apesar dos estudos apresentarem resultados conflitantes (Novara et al. 2007; Velazquez et al. 2008; Mannweiler et al. 2013).

O grau histológico tumoral é classificado de acordo com a diferenciação celular em Grau 1 (baixo grau), Grau 2 (intermediário) e Grau 3 (alto grau). O tumor Grau 1 é considerado bem diferenciado, semelhante às células escamosas normais. O Grau 2, moderadamente diferenciado, é quando o tumor exibe alterações celulares mais pronunciadas que o Grau 1, porém sem a presença de anaplasia. O Grau 3 apresenta anaplasia, sendo considerado um tumor mal diferenciado.

No exame físico, a avaliação da região inguinal é fundamental, uma vez que a disseminação ocorre primariamente para os linfonodos inguinais (Mosconi et al. 2005). Apesar disso, cerca de 25% dos pacientes com exame físico inguinal normal apresentam micrometástases. Assim, a linfadenectomia inguinal é indicada na presença de linfonodos

inguinais palpáveis ou, de forma profilática, no estadio tumoral □ T1b. Este procedimento cirúrgico está associado a elevada morbidade, podendo apresentar complicações em 40 a 70% dos casos, como linfedema, deiscência e infecção de ferida operatória, impactando negativamente na qualidade de vida do paciente. Até o momento, os exames de imagem indicados, RNM, TC e o PET-CT, não apresentam bons resultados na detecção de micrometástases (<2mm). Além disso, ainda não dispomos de marcadores biomoleculares na prática clínica. O diagnóstico do CaPe é feito pela biópsia da lesão primária e o tratamento pela ressecção tumoral, a qual geralmente é realizada pela amputação parcial ou total do pênis. O custo do tratamento é elevado, sendo similar com o de qualquer outro câncer urológico e apesar de sua baixa incidência, a morbi-mortalidade ainda permanecem elevadas (Screpanti et al. 2001).

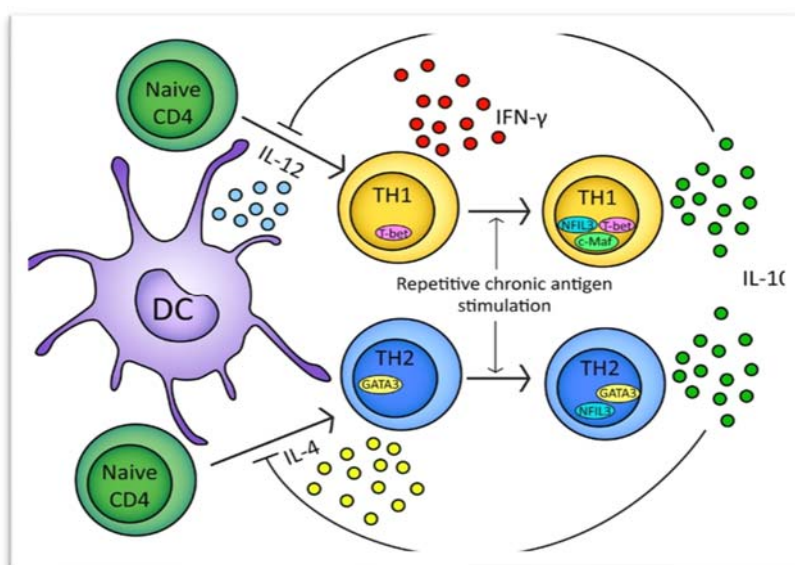
1.1.3 Sistema Imune no Câncer de Pênis

O CaPe se apresenta caracteristicamente como lesão sólida ulcerada ou vegetante, que é constituída por uma variedade de componentes celulares, como as células malignas, endoteliais, estruturais e do sistema imune (Albini e Sporn 2007). O microambiente tumoral é composto por células do sistema imune, como linfócitos efetores T CD8⁺ (T citotóxico) e T CD4⁺ (T helper – Th), células Natural Killer (NK), células B, macrófagos, células dendríticas (DCs) e *invariant* NKT, que demonstram a tentativa do sistema imune de promover uma resposta antitumoral (Zitvogel et al. 2011; Motohashi et al. 2011; Emmanuel et al. 2019).

O linfócito T é a principal célula envolvida no sistema imune adaptativo celular. A expressão de um receptor de célula T (TCR- *T cell receptor*) e das moléculas CD4 e CD8 participam do processo de maturação dos linfócitos T, a partir de células naive e a ativação destas células ocorre após o contato do TCR com o antígeno proteico processado e apresentado pelas células apresentadoras de antígenos (APC), através das moléculas de histocompatibilidade principal (MCH). As APCs integram a imunidade inata e são capazes de fagocitar o antígeno encontrado no hospedeiro, degradá-lo e expor seus peptídeos na membrana, acoplados às moléculas de MHC. As moléculas de MHC são divididas em classe I, presentes em todas as células nucleadas, e classe II, presentes nas células APCs (macrófagos, células B, e DCs), e são imprescindíveis no microambiente tumoral, pois geram a resposta imune eficaz contra o tumor. O linfócito T CD4 reconhece apenas a molécula MHC II, enquanto o T CD8 apenas a MHC I.

As células T se diferenciam em células efectoras através de estímulos inflamatórios e/ou infecciosos, produzindo e secretando citocinas que desempenham diferentes funções, e são

classificadas de acordo com o perfil de citocinas produzidas. Os linfócitos T CD4 possuem quatro populações: Th1, Th2, T reguladoras e Th17. As células Th1 atuam na imunidade celular, produzindo interferon gama (IFN- γ) e interleucina (IL)-2, IL-12, IL-16 e IL-18 (Szabo et al. 2003). Por sua vez, as células Th2 produzem e secretam IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 e participam da resposta imune humoral e dos processos alérgicos por meio da produção de anticorpos IgE (Kotenko e Pestka 2000) (Figura 2).



Fonte: Sky et al. (2013)

Figura 2 - As citocinas IL-12 ou IL-4 promove a ativação das células TCD4+ “naive” levando a expansão clonal e diferenciação de células efectoras Th1 e Th2, respectivamente.

A IL-12 é uma potente citocina pró-inflamatória, produzida principalmente pelas APCs, tendo ação principal na resposta imune contra patógenos e importante ação anti-tumoral. Tem papel fundamental na diferenciação do linfócito T em Th1, através de estímulo da secreção do IFN- γ e inibição da IL-4, levando à inibição da resposta Th2 (Gately et al. 1998; Sinigaglia et al. 1999). É responsável por estabelecer uma conexão entre a imunidade inata e a adaptativa, uma vez que seus receptores estão localizados principalmente nas células NK e T, estimulando seu crescimento. Devido ao seu papel na produção do IFN- γ , tem sido estudada como opção de imunoterapia contra o câncer (Lasek et al. 2014).

IFN- γ é um interferon tipo II, fundamental para a defesa do hospedeiro contra vários patógenos devido ao seu papel na resposta Th1, sendo a principal citocina envolvida na ativação dos macrófagos e na imunidade anti-tumoral. Tem atuação fundamental no reconhecimento e eliminação tumoral por apoptose e citólise de células malignas (Bach et al. 1997).

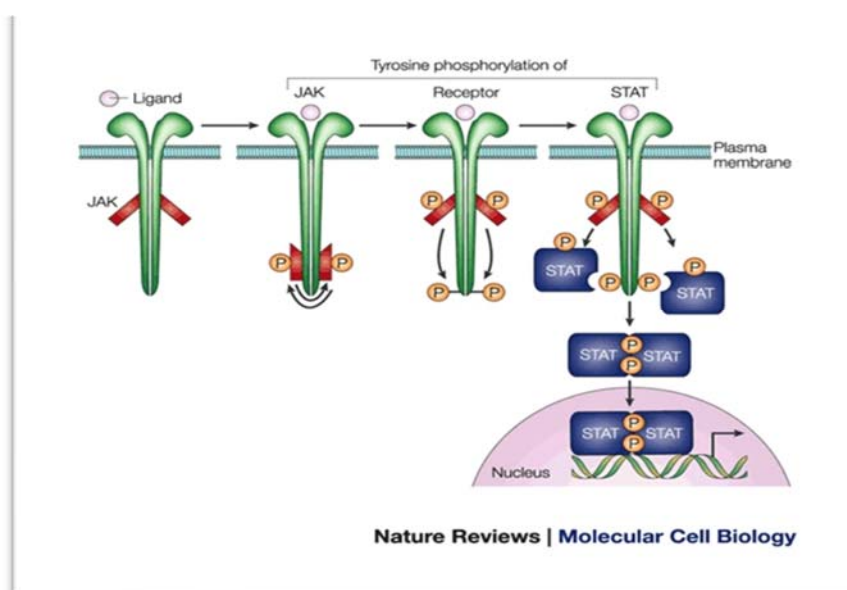
No centro da resposta Th1 está o fator de transcrição T-bet (do inglês *T-box expressed in T cells*), um regulador crítico da diferenciação Th1. T-bet ativa o programa Th1, além de inibir simultaneamente a resposta Th2, Th17 e poder reprogramar as células de padrão Th2 para o fenótipo Th1 (Szabo et al. 2000). Também induz a produção de IFN- γ e regula a expressão de quimiocinas, através do controle de seus receptores, orquestrando a migração das células Th1. A regulação da resposta inflamatória Th1 é fundamental para a prevenção de disfunções do sistema imune e autoimunidade órgão-específico. Estudos têm demonstrado que a alta expressão de T-bet protege os linfócitos T CD8 da exaustão, diminui os receptores inibitórios de resposta Th1 e inibe a morte celular, levando à geração ou a uma maior sobrevivência das células de memória (Darnell 1998; Lim et al. 2000; Linton e Thoman 2001; Intlekofer et al. 2005; Malaguarnera et al. 2012). Os linfócitos T CD4 da classe Th1 expressam transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STAT) 1 e 4, os quais são ativados pelo IFN- γ e IL-12, respectivamente.

As STATs correspondem a uma família de proteínas citoplasmáticas responsáveis por transmitir sinais da superfície celular até o núcleo, através da transdução e translocação, onde se ligam a promotores específicos de sequências de DNA, ativam o processo de transcrição e regulam a expressão gênica (Darnell et al. 1994; Schindler e Brutsaert 1999; Lu et al. 2008; Xiong et al. 2008; Bowman 2010). Essas proteínas estão envolvidas numa ampla rede de processos necessários para a homeostase e desenvolvimento dos mamíferos. Agem na função imune, diferenciação e crescimento celular, apoptose, angiogênese e desempenham papel fundamental na regulação do processo inflamatório, além de serem responsáveis pela maioria das respostas imunológicas mediadas pelas citocinas (Ihle 1995; Mui 1999; Smithgall et al. 2000).

A principal via de ativação das STATs é realizada pela clássica via Janus Kinase (JAK)/STAT, a qual possibilita a comunicação extracelular com o núcleo, através de receptores da membrana celular, levando ao processo de transcrição (Schindler e Darnell 1995). Vários estudos têm demonstrado a participação da via JAK/STAT na oncogênese humana, tanto na atividade promotora, quanto na supressão tumoral (Turkson e Jove 2000; Kusaba et al. 2005; Kupferman et al. 2009). Desde a descoberta da primeira STAT como mediadora chave da sinalização do IFN em 1994, um total de sete membros da família STAT foram identificados nos mamíferos, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b e STAT6 (Darnell 1997 e 1998).

As citocinas, quimiocinas, hormônios e fatores de crescimento se ligam aos receptores transmembrânicos da família JAK (JAK1, JAK2, JAK3, tyrosine kinase 2), promovendo sua

fosforilação e consequente ativação (Sansone e Bromberg 2012). As moléculas STAT possuem um resíduo tirosina conservado próximo da terminação C que é fosforilado pelas JAKs ativadas, levando a sua ativação e formação de dímeros homo-STAT ou hetero-STAT, e subsequente translocação através do núcleo, onde se ligam a regiões específicas do DNA, promovendo regulação através da supressão ou ativação da expressão gênica (Figura 3). Anormalidades da via JAK/STAT contribuem diretamente para fatores envolvidos na oncogênese, incluindo progressão do ciclo celular, apoptose, angiogênese, invasão, metástase e evasão do sistema imune (Ramana et al. 2000; Boudny e Kovarik 2002; Li et al. 2007; Adamkova et al. 2007; Lai et al. 2010). A via JAK/ STAT é responsável por manter um delicado balanço entre a estimulação e a inibição da expressão gênica, e alterações deste equilíbrio estão relacionados tanto com a promoção, quanto com a progressão de doenças, como a oncogênese e os processos auto-imunes (Catlett-Falcone et al. 1999; Bromberg e Darnell 2000; Gotthardt e Sexl 2017).



Fonte: Ihle (1995)

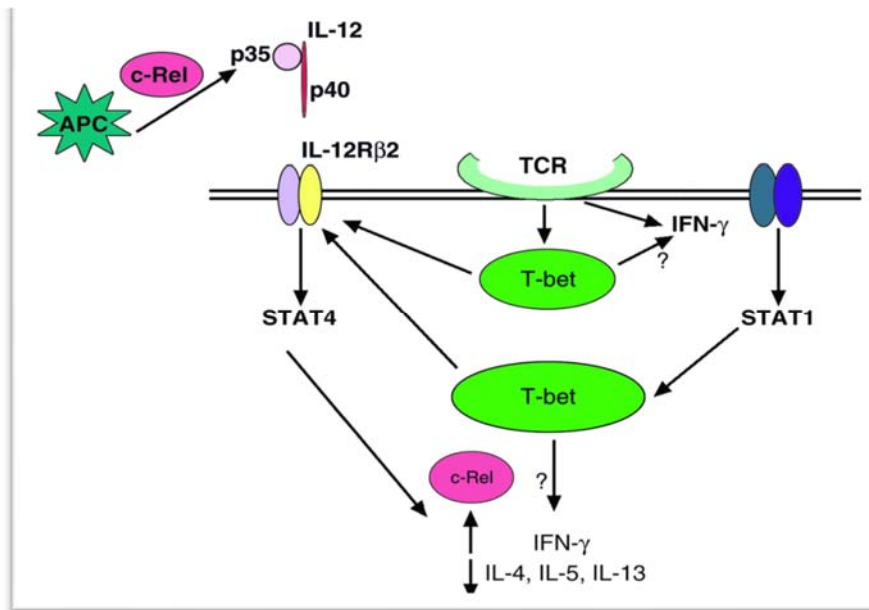
Figura 3 - Ativação da via JAK/STAT, dimerização da molécula STAT, seguido de translocação nuclear e ativação da transcrição.

A proteína STAT1 funciona como mediadora de várias citocinas, principalmente IFN- γ , sendo descrita como envolvida no processo de supressão tumoral, e age através do sistema imune inato e adaptativo, colaborando na eliminação de vírus, bactérias e de células anômalas recém transformadas (Meraz et al. 1996). Além disso, aumenta a atividade das células dendríticas e dos macrófagos citotóxicos, promovendo um incremento no processamento e apresentação dos antígenos e na destruição das células oncogênicas (Shuai e Liu 2003).

Também participa na diferenciação das células B e T (Quigley et al. 2008; Barbi et al. 2009). A deficiência da STAT1 predispõe a múltiplas variedades de neoplasias intra-epiteliais em modelo animal, sendo que a sua expressão no epitélio tumoral e no estroma contribuem para seu efeito anti-tumoral (Schneckenleithner et al. 2011). Tem sido demonstrado uma tentativa de evasão tumoral dos efeitos da resposta imunológica através do bloqueio das atividades anti-tumorais da STAT1, por meio da diminuição da sua expressão ou bloqueio da sua ativação (Dunn et al. 2006).

Por outro lado, apesar da atividade anti-tumoral da STAT1 nas neoplasias iniciais, tem sido descrito sua participação na progressão de tumores já estabelecidos, além de alterar a resposta tumoral aos tratamentos preconizados. O aumento da expressão da STAT1 nas células tumorais foi associado ao aumento da incidência de metástases no câncer de pulmão (Efimova et al. 2009). Alguns autores demonstraram uma correlação da atividade da STAT1 e a progressão tumoral nos casos de carcinoma ductal invasivo e *in situ* de mama (Hix et al. 2013). Em contrapartida, outros estudos demonstraram bom prognóstico em tipos estabelecidos de câncer de mama associados a sua ativação (Legrier et al. 2016). STAT1 é o principal fator de transcrição associado à resistência de diversos tipos de câncer à radioterapia (Liu et al. 2020).

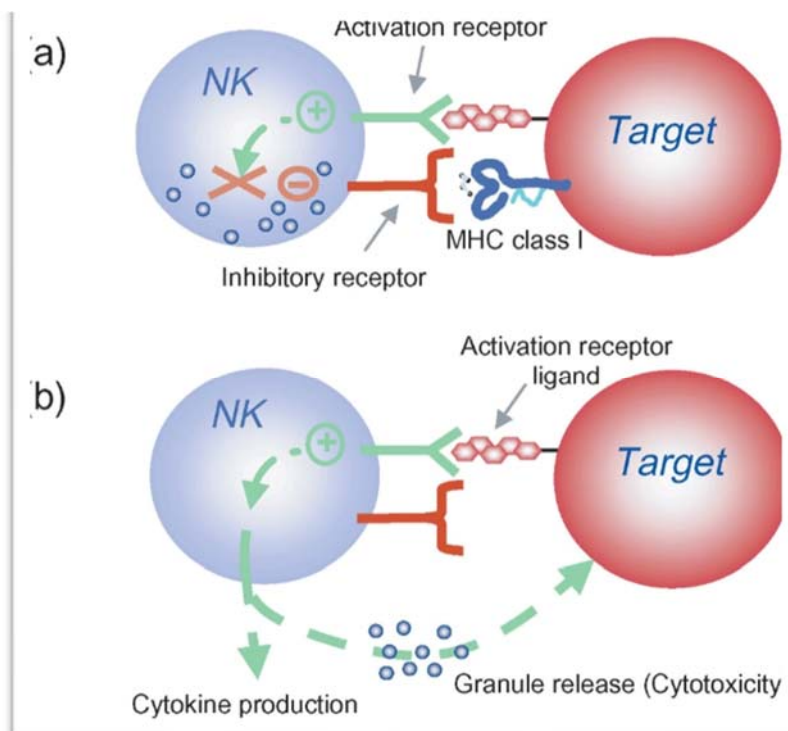
Em comparação com os outros membros da família STAT, os estudos sobre STAT4 são limitados. A STAT4 age como fator de transcrição para síntese de IL-12 especificamente e participa da atividade de inúmeras células do sistema imune, estando envolvida com a supressão tumoral (Kaplan et al. 1998). A expressão da STAT4 é vista no timo, testículos e células mielóides. A diferenciação de linfócitos T naive em células Th1 requer a ação da IL-12 e IFN- γ , os quais levam à ativação da STAT4 e STAT1, respectivamente. Através da sinalização via TCR, IFN- γ e STAT1 induzem a expressão de T-bet em células T CD4⁺. De forma subsequente, a expressão de T-bet é conduzida pela IL-12 e STAT4, sem a estimulação via TCR (Hix et al. 2013) (Figura 4).



Fonte: Szabo et al. (2002)

Figura 4 - Sinalização e transcrição na diferenciação Th1. Indução de T-bet e IFN- γ pelo TCR, seguido pela ativação de STAT4 e STAT1.

As células NK (do inglês *Natural Killer cells*) são grandes células granulares que fazem parte de um subgrupo único de linfócitos, pois caracterizam-se pela expressão da molécula CD56 e ausência da CD3, ou seja, não expressam receptores de linfócitos T ou B. Correspondem a cerca de 5 a 15% das células mononucleares do sangue periférico de indivíduos saudáveis e participam do sistema imune inato, sendo importantes na resposta inicial contra as células malignas e os patógenos (Zhao et al. 2015). Destroem as células tumorais ou infectadas liberando no citoplasma potentes grânulos contendo perforina e granzima, ou ativando receptores de morte celular na superfície da membrana (Screpanti et al. 2001). São ativadas em resposta a citocinas, principalmente IL-12, produzidas pelos macrófagos e DCs. Também atuam reconhecendo e destruindo células que não expressam ou não possuem a molécula própria de MHC I (Figura 5). As células NK também secretam citocinas, dentre elas o IFN- γ , agindo coordenadamente com outras células do sistema imunológico, como as DCs e os linfócitos T, para exercer atividades anti-tumorais.



Fonte: Gotthardt e Sexl (2017)

Figura 5 - Ativação das NK feita através da integração dos sinais de ativação e receptores inibitórios. (a) receptor reconhecendo molécula MHC I e promovendo inibição. (b) ausência da molécula MHC I, levando à ativação da célula NK e liberação dos grânulos citotóxicos, promovendo processo de apoptose.



JUSTIFICATIVA



2 JUSTIFICATIVA

O câncer de pênis é um problema de saúde pública em países em desenvolvimento. Em diversas ocasiões o diagnóstico é feito em fase tardia, prejudicando a terapêutica e aumentando a morbi-mortalidade câncer específica. Trata-se de doença mutilante, onde o tratamento realizado é frequentemente através de amputação peniana parcial ou total, podendo causar disfunção urinária e sexual, além de comprometimento estético, psicológico e da qualidade de vida. Em casos de metástases linfonodais, além de ser o principal fator de mal prognóstico, a linfadenectomia está associada a elevado índice de complicações, como linfedema, necrose de pele e infecção de ferida operatória.

Em países em desenvolvimento como o Brasil, o ônus social desta neoplasia é expressivo, não somente pela alta incidência da doença, como também pelo retardo no diagnóstico, levando à detecção dos casos em estágios avançados, causando maior tempo de internação hospitalar e aumento do custo de tratamento. Mesmo em países desenvolvidos, o CaPe não tem demonstrado melhora da sobrevida câncer específica nas últimas três décadas, diferentemente de outros tipos de câncer.

O câncer de pênis é patologia pouco pesquisada no meio científico, sendo que a maioria das informações provém de estudos retrospectivos. Estudos em humanos têm demonstrado uma significativa associação entre a resposta imunológica e a clínica no tratamento de pacientes com diversos tumores sólidos. Nas últimas décadas, houve um enorme avanço da compreensão da tentativa tumoral de escapar do sistema imune, assim como das formas de evitar essa evasão e melhorar o tratamento contra o câncer. A avaliação do infiltrado linfocitário tumoral nos pacientes oncológicos têm sido cada vez mais estudado no meio científico. Entretanto, existem poucos estudos até o momento que avaliem a resposta imune celular no sangue periférico com ênfase na expressão das STATs em pacientes com CaPe. Por isso, a investigação dos fatores de transcrição e transdução associados a resposta imune do tipo Th1, como STAT1, STAT4 e T-bet, ainda configuram um grande desafio para ciência atual. Com o desenvolvimento da imunoterapia contra o câncer, o conhecimento sobre a resposta imune no CaPe é fundamental para potencializar e fornecer opções terapêuticas, além de diminuir os efeitos adversos do seu tratamento.



OBJETIVOS



3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão dos fatores de transcrição STAT1, STAT4 e T-bet em linfócitos T de pacientes com carcinoma escamoso de pênis.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

No sangue periférico de pacientes com carcinoma escamoso de pênis e controles:

- Avaliar os níveis de linfócitos T totais e subpopulações, células B e de Natural Killer (NK) e dos fatores de transcrição STAT1, STAT4 e T-bet;
- Associar os níveis de linfócitos T totais e subpopulações, células B e de NK e dos fatores de transcrição STAT1, STAT4 e T-bet com as características clínicas dos pacientes;
- Correlacionar os níveis de expressão entre STAT1 vs STAT4, STAT4 vs T-bet e STAT1 vs T-bet.



MATERIAIS E MÉTODOS



Mauro Ricardo Lima Marques

4 MATERIAIS E METODOS

4.1 DETALHES E ASPECTOS ÉTICOS DO ESTUDO

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 52507115.9.0000.5205 (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 pacientes com diagnóstico histológico de carcinoma escamoso de pênis e idade acima de 18 anos. O grupo-controle foi composto por voluntários do sexo masculino com idade acima de 18 anos.

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, 38 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. A revisão da análise histológica da biopsia tumoral foi 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.

Foram avaliados um total de 30 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 os quais concordaram em participar do estudo.

4.5 TESTES LABORATORIAIS

4.5.1 Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo

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.

As células foram fixadas com 100 µL de BD Cytofix/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 µL de anticorpos monoclonais anti-CD3 (marcador de linfócitos T), anti-CD4, anti-CD8, anti-CD20 (marcador de linfócitos B) e anti-CD16-56 (Marcadores de células NK) (BD Biosciences, USA). Os anticorpos monoclonais são adquiridos comercialmente

conjugados a fluóforos, como PE, FITC, PerCP e PECY-7, que diferem um do outro em relação à cor que emitem.

Os fatores de transcrição STAT1, STAT4, e T-Bet são expressos no interior das células. 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 µL 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 x g 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-STAT1, anti-STAT4, anti-T-bet, sendo incubado por 40 minutos protegido da luz. Em seguida, uma nova etapa de lavagem foi realizada, o sobrenadante descartado e as células foram ressuspendidas em 300 µL 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 *FACSSUITE* (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA) e expressas em valores percentuais.

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

4.6.1 Análises Descritivas e de Associação

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*. 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)

4.6.2 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) (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).



RESULTADOS



5 RESULTADOS

5.1 DESCRIÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Foram avaliados os dados clínicos e demográficos de 30 pacientes com diagnóstico câncer escamoso de pênis. A maioria dos pacientes tinha idade inferior a 65 anos (73,3%). Quanto ao tamanho do tumor, 40% dos pacientes apresentaram tumores menores que 3,5 cm, enquanto 60% foram maiores ou iguais a 3,5 cm. Houve a presença de invasão perineural em 36,7% dos tumores. Quanto ao grau histopatológico, G1, G2 e G3, observamos 10,5%, 73,7% e 15,8%, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1 - Descrição da frequência absolutas e relativas das características clínicas dos pacientes com câncer escamoso de pênis

CARACTERÍSTICAS	N=30 N (%)
IDADE	
< 65 anos	22 (73,3%)
≥ 65 anos	8 (26,6%)
TAMANHO DO TUMOR	
< 3,5 cm	12 (40,0%)
≥ 3,5 cm	18 (60,0%)
INVASÃO PERINEURAL	
Sim	11 (36,7%)
Não	19 (63,3%)
GRAU	
1	2 (10,5%)
2	14 (73,7%)
3	3 (15,8%)

5.2 ANÁLISES DOS NÍVEIS DE LINFÓCITOS TCD3⁺, TCD4⁺, TCD8⁺, B E CÉLULAS NK

- Entre os pacientes com câncer de pênis (CaPe) e controles saudáveis (CTRL)

Foi observado redução dos níveis percentuais de linfócitos B no sangue periférico de pacientes com CaPe quando comparado aos controles ($p=0.0002$). Para as demais populações celulares, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas (Figura 6).

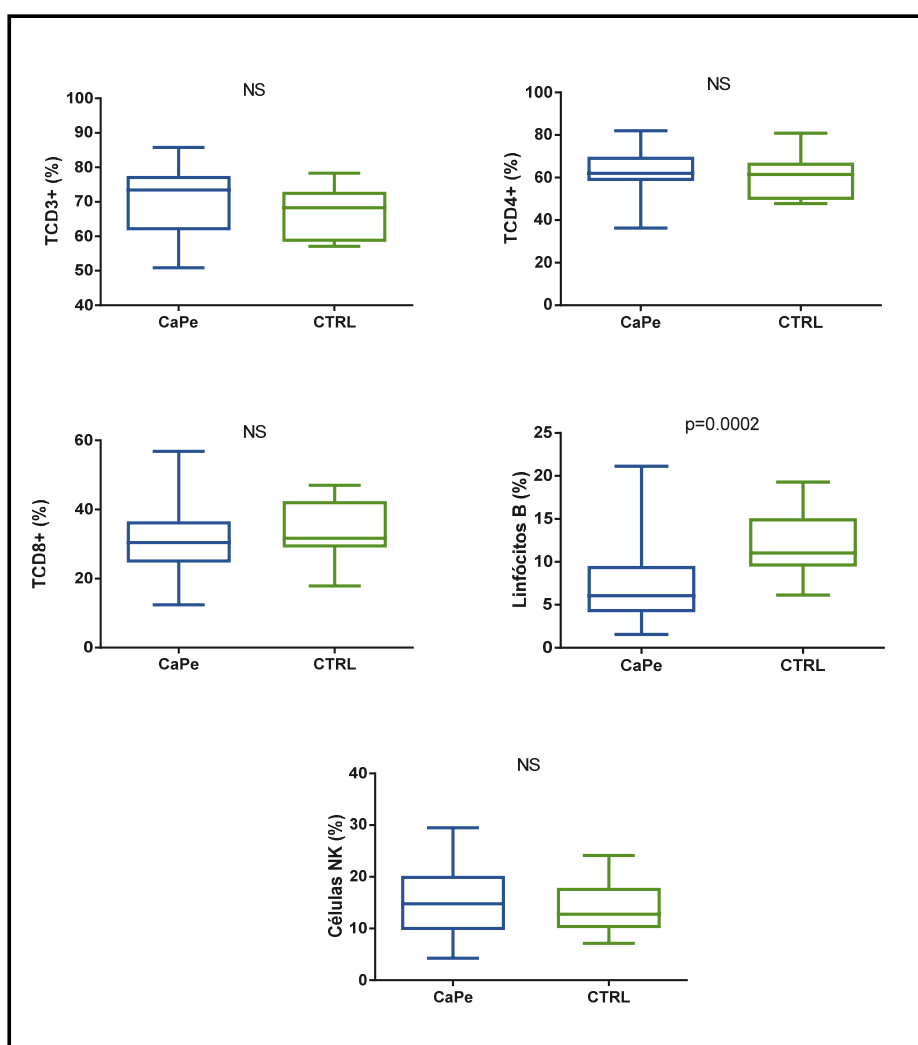


Figura 6 - Análises dos valores percentuais de T CD3⁺, T CD4⁺, T CD8⁺, linfócitos B e células NK no sangue periférico de pacientes com câncer de pênis (CaPe) e grupo controle (CTRL). Os gráficos foram representados em mediana e interquartil (25-75). Foi considerado significativo $p < 0.05$. Ns: não significativo.

5.3 ANÁLISES DOS NÍVEIS DE STAT1, STAT4 e T-bet EM LINFÓCITOS T

- Entre os pacientes com câncer de pênis (CaPe) e controles saudáveis (CTRL)

Verificou-se que o grupo dos pacientes apresentou níveis percentuais elevados de linfócitos T com expressão de STAT1 e STAT4 quando comparados ao grupo controle ($p=0,004$ e $p=0,008$, respectivamente). Já o percentual de linfócitos T com expressão de T-bet foi menor ao comparar com o grupo controle ($p=0,02$) (Figura 7).

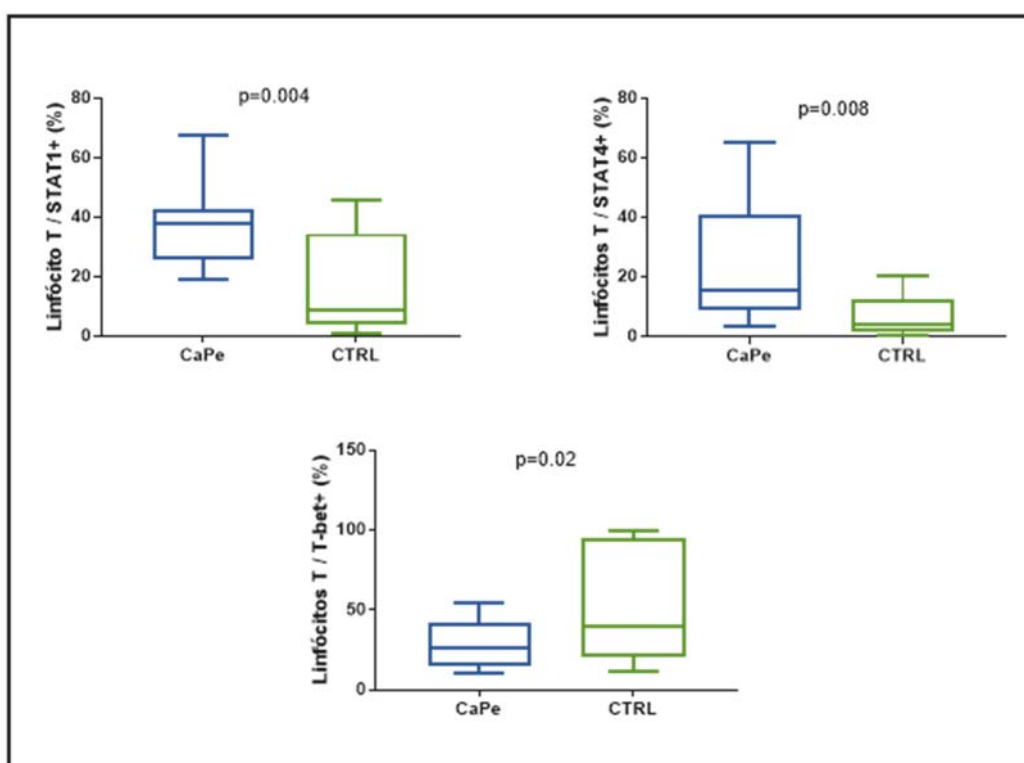


Figura 7 - Análises dos valores percentuais de linfócitos T com expressão de STAT1, STAT4 e T-bet no sangue periférico de pacientes com câncer de pênis (CaPe) e grupo controle (CTRL). Os gráficos foram representados em mediana e interquartil (25-75). Foi considerado significativo $p < 0.05$. Ns: não significativo.

5.4 ANÁLISE DOS PERCENTUAIS DE LINFÓCITOS T CD3⁺, T CD4⁺, T CD8⁺, B E NK DE ACORDO COM O TAMANHO DO TUMOR < 3,5 E ≥ 3,5 cm

Foi realizada a análise dos percentuais de linfócitos T totais (T CD3⁺), T CD4⁺, T CD8⁺, B e NK no sangue periférico de pacientes com tamanho tumoral < 3,5 cm e ≥ 3,5 cm. Observou-se que pacientes com tumores < 3,5 cm apresentavam níveis percentuais elevados de células T CD8⁺, quando comparados com aqueles com tamanho ≥ 3,5 cm (p= 0,04). Para as demais populações celulares estudadas, não foram observadas diferença estatisticamente significativas (Figura 8).

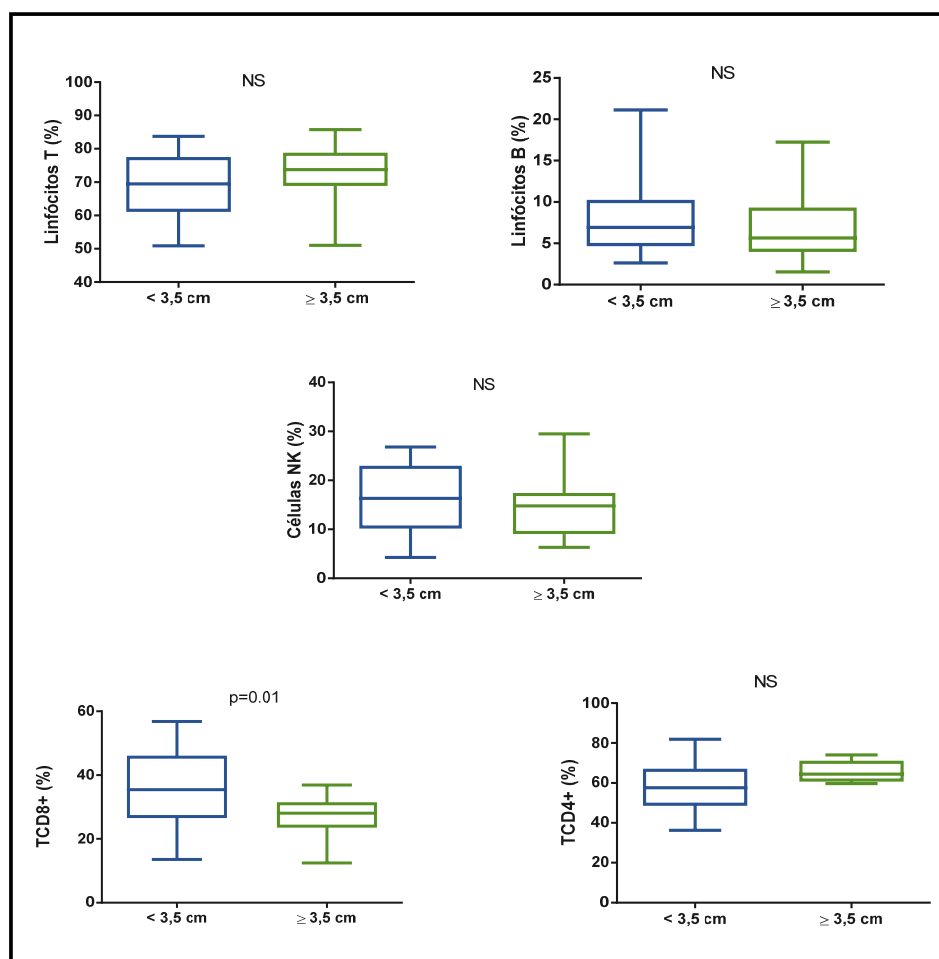


Figura 8 - Análises dos valores percentuais de T CD3⁺, T CD4⁺, T CD8⁺, linfócitos B e células NK no sangue periférico de pacientes com câncer de pênis com tumores < 3,5 cm e ≥ 3,5 cm. Os gráficos foram representados em mediana e interquartil (25-75). Foi considerado significativo p < 0.05. Ns: não significativo.

5.5 ANÁLISES DOS NÍVEIS DE STAT1, STAT4 e T-bet EM LINFÓCITOS T DE ACORDO COM O TAMANHO DO TUMOR $< 3,5$ E $\geq 3,5$ cm

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de pacientes com CaPe relacionando-os com o tamanho tumoral $< 3,5$ e $\geq 3,5$ cm (Figura 9).

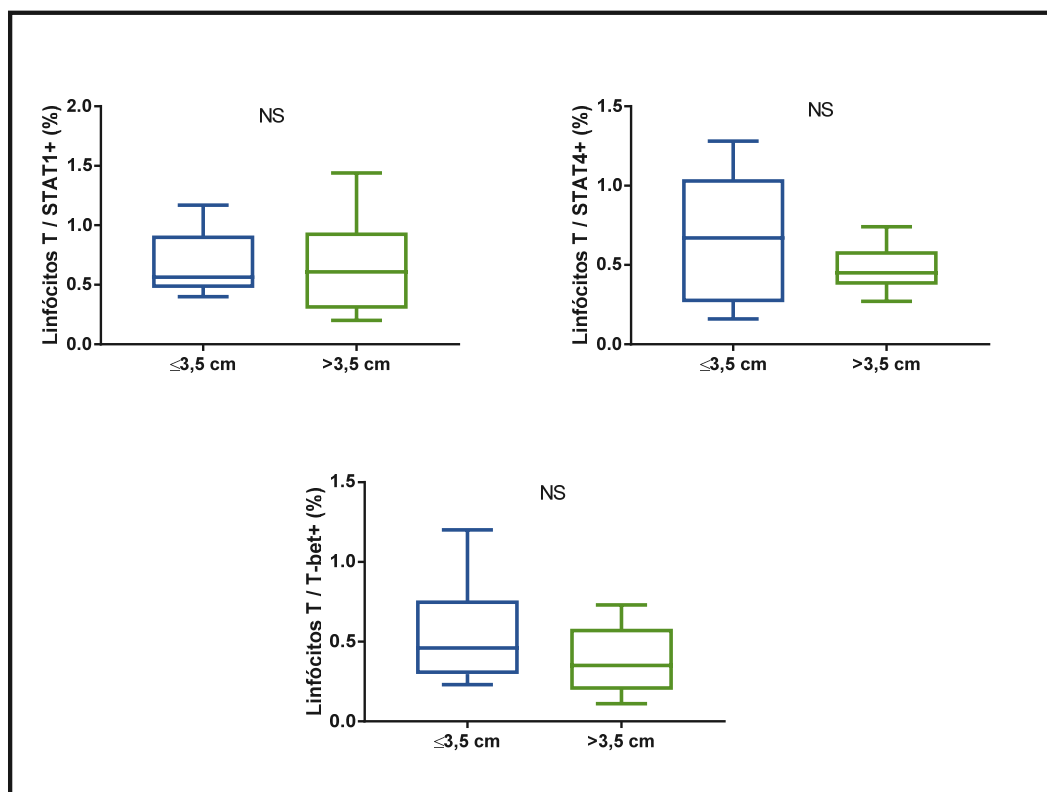


Figura 9 - Análise dos percentuais de linfócitos T com expressão de STAT1, STAT4 e T-bet no sangue periférico dos pacientes com CaPe com tamanho do tumor $< 3,5$ e $\geq 3,5$ cm. Os gráficos foram representados em mediana e interquartil (25-75). Foi considerado significativo $p < 0.05$. NS: não significativo.

5.6 ANÁLISE DOS PERCENTUAIS DE LINFÓCITOS T TOTAIS, T CD4⁺, T CD8⁺, B E NK

- Entre pacientes com e sem invasão perineural

Verificou-se que os pacientes com ausência de IPN (IPN-) obtiveram níveis percentuais elevados de linfócitos T CD8⁺ quando comparados aos pacientes IPN+, ($p=0,04$). Não houve diferença estatisticamente significativa para as demais populações de células entre os grupos analisados (Figura 10).

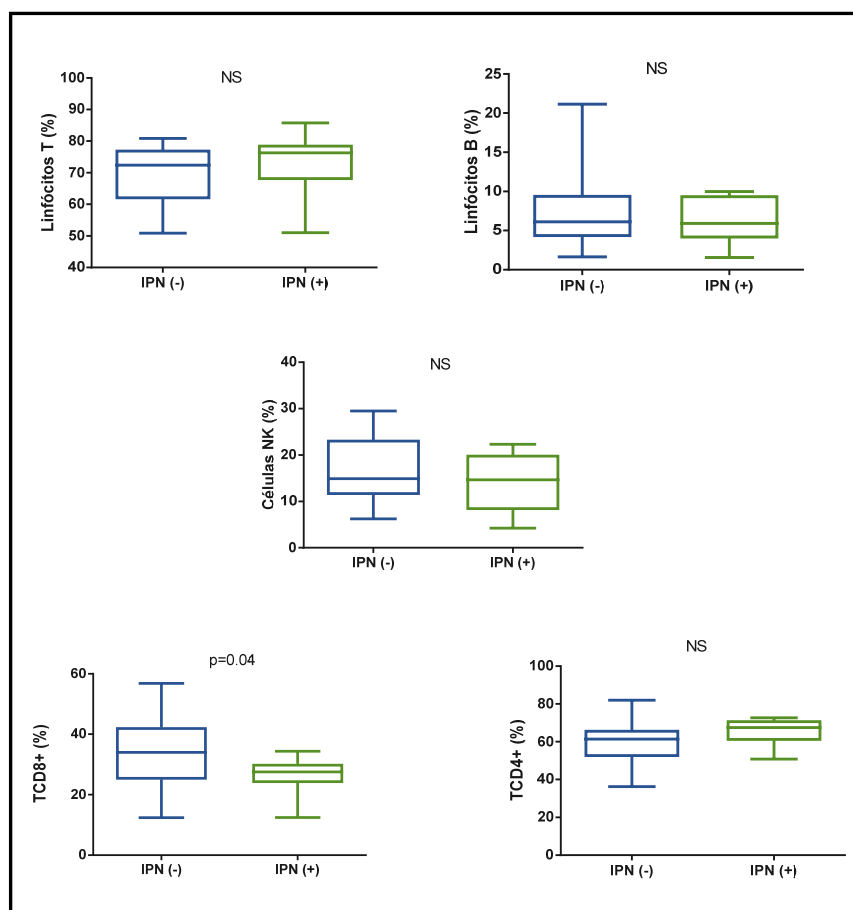


Figura 10 - Análises dos valores percentuais de T CD3, T CD4, T CD8, linfócitos B e células NK no sangue periférico de pacientes com câncer de pênis com presença de invasão perineural (IPN+) e ausência de IPN (IPN-). Os gráficos foram representados em mediana e interquartil (25-75). Foi considerado significativo $p < 0.05$. NS: não significativo.

5.7 ANÁLISES DOS NÍVEIS DE STAT1, STAT4 e T-bet EM LINFÓCITOS T

- Entre pacientes com e sem invasão perineural

Verificou-se que os pacientes com IPN-obtiveram níveis percentuais elevados de linfócitos T com expressão de STAT1, STAT4 e T-bet quando comparados ao grupo de pacientes com IPN+ ($p=0,0004$, $p=0,02$ e $p=0,0001$, respectivamente) (Figura 11).

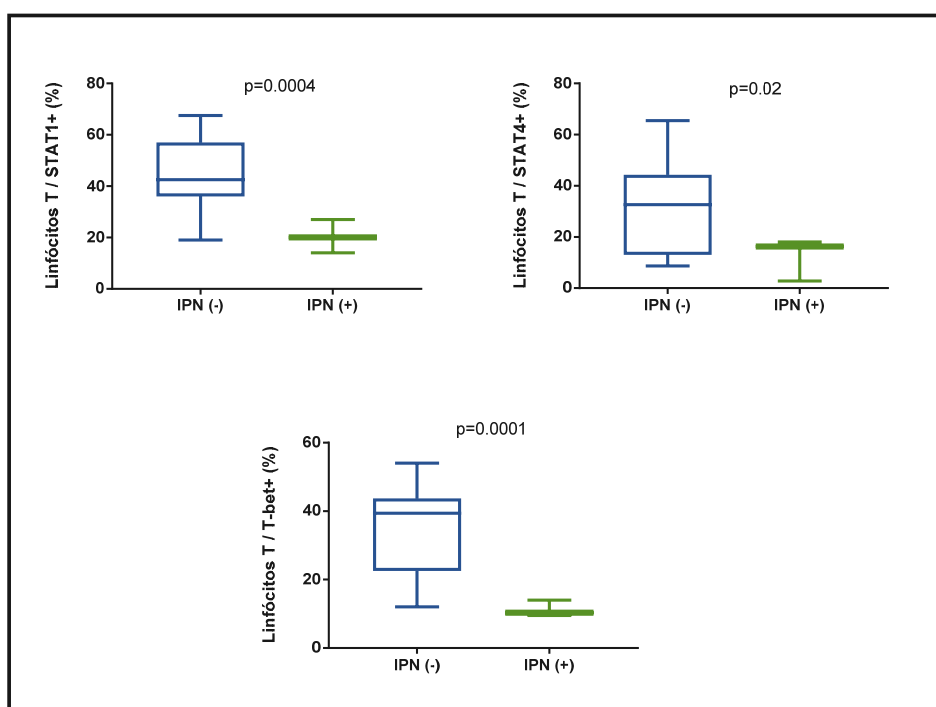


Figura 11 - Análise da expressão de STAT1, STAT4 e T-bet no sangue periférico dos pacientes com CaPe com (IPN+) e sem Invasão Perineural (IPN-). Os gráficos foram representados em mediana e interquartil (25-75). Foi considerado significativo $p < 0.05$. NS: não significativo.

5.8 ANÁLISE DA CORRELAÇÃO ENTRE STAT4/ STAT1, T-BET/ STAT1 E T-BET/ STAT4 NOS PACIENTES E CONTROLES

Nas análises de correlação entre STAT4 e STAT1, T-bet e STAT1 e T-bet e STAT4, foram observadas correlações entre T-bet e STAT4 nos pacientes com CaPe ($r=0,58$; $p=0,02$). Nas demais análises, não houve diferença significativa na correlação entre STAT4 e STAT1, T-bet e STAT1 e T-bet e STAT4 no grupo controle (Figura 12).

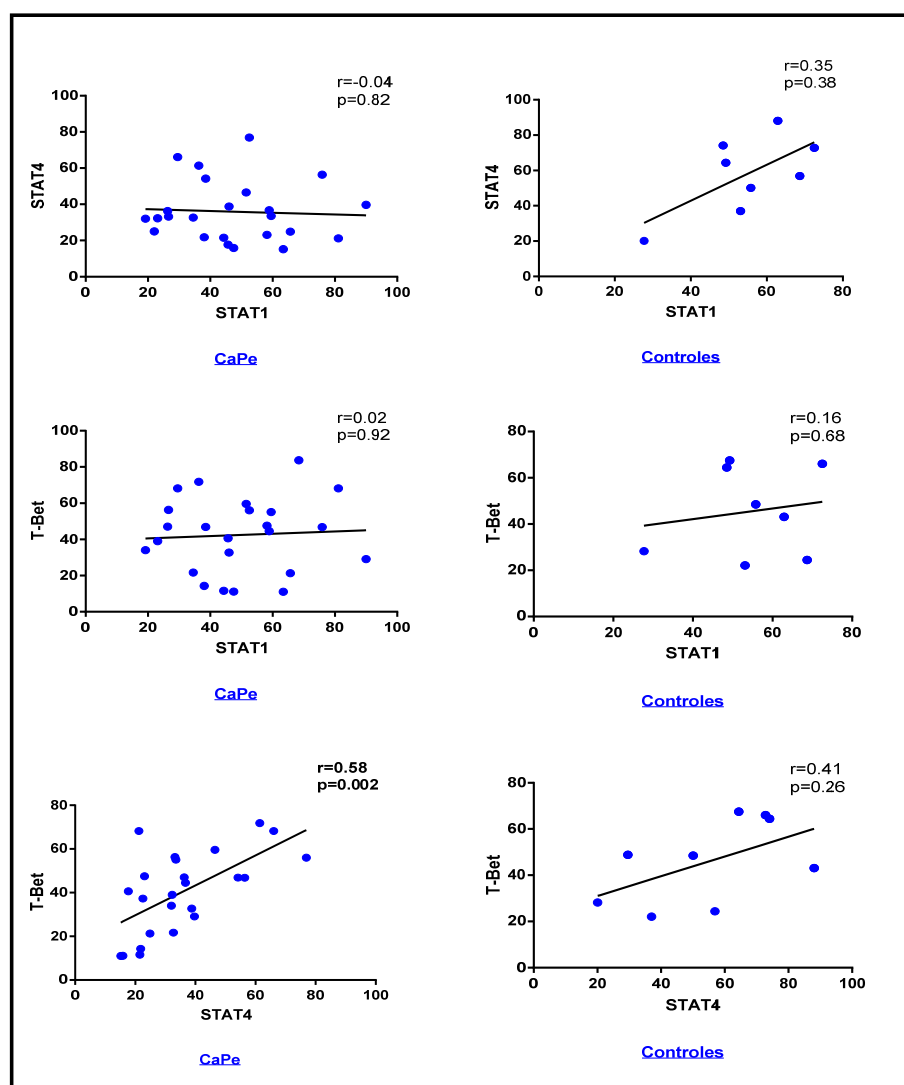


Figura 12 - Correlação entre STAT4 e STAT1, T-bet e STAT1, e T-bet e STAT4 no grupo câncer de pênis e no grupo controle. Teste de correlação de Spearman. Foi considerado significativo $p < 0.05$.



DISCUSSÃO



6 DISCUSSÃO

O CaPe pode ocorrer em qualquer idade, porém o pico de incidência ocorre em torno da sexta década de vida (Calmon et al. 2011). Estudo com 283 pacientes no Brasil, demonstrou incidência de 59,33% em indivíduos com menos de 65 anos de idade, sendo 19,41% com menos de 46 anos e 3,53% com menos de 26 anos (Favorito et al. 2008). Os estados do Maranhão e da Bahia, ambos no nordeste brasileiro, apresentaram incidência em indivíduos com menos de 40 anos de idade em 19,7% e 17% dos casos, respectivamente (Paiva et al. 2015; Coelho et al. 2018). No nosso estudo, 22 pacientes dos 30 avaliados (73,3%) tinham menos de 65 anos de idade, enquanto 8 (26,6%) tinham 65 anos ou mais. Estes dados estão de acordo com a literatura médica internacional.

Ao avaliarmos o grau histológico tumoral, observamos tumores G1 (baixo grau) em 10,5%, G2 (grau moderado) em 73,5% e G3 (alto grau) em 15,8%. O alto grau tumoral tem sido descrito na literatura como fator preditivo de metástase linfonodal e pior prognóstico no CaPe. Estudo brasileiro publicado pela Universidade Federal do Piauí em parceria com o A.C.Camargo Cancer Center em 2016, acompanhando 163 pacientes por três ou mais anos, demonstrou que o Grau 3 foi o principal fator prognóstico independente de sobrevida câncer específica no CaPe (Aita et al. 2016). Outro estudo brasileiro envolvendo 648 pacientes, demonstrou alta sobrevida câncer específica ao longo de 10 anos em tumores Grau 1, quando comparados aos Grau 2 e 3 (Ornellas et al. 2008). Em Meta-análise realizada em 2019, abrangendo 25 estudos e totalizando 2.680 pacientes com CaPe, 1.028 indivíduos (38%) apresentaram tumores Grau 1 e 1.652 (62%) tumores Grau 2 e 3 e demonstrou que os dois últimos foram preditores significantes de metástase linfonodal, tanto em análise univariável, quanto multivariável (Hu et al. 2019).

Esta mesma Meta-análise também demonstrou que o tamanho tumoral (>3,0 cm) foi reportado como fator preditor significativo de metástase linfonodal em 4 estudos. Foi concluído que a presença de fatores patológicos invasivos como IPN, volume tumoral, invasão angio-linfática, profundidade da invasão tumoral, invasão de uretra e/ou corpo cavernoso, aumenta significativamente o risco de metástase linfonodal (Hu et al. 2019). No nosso estudo, 18 indivíduos (60%) apresentaram tumores $\leq$ 3,5 cm, enquanto 12 (40%) apresentaram tumores $>$ 3,5 cm.

Kalinsk et al. em 2005 e Kalos e June et al. em 2013, demonstraram que a resposta imunológica, através do maior número e atividade de linfócitos T citotóxicos e células NK no sangue periférico e no infiltrado tumoral, está fortemente correlacionada com melhora do prognóstico, diminuição do volume tumoral e aumento da sobrevida dos pacientes com câncer. Segundo Dudley e Rosenberg em 2003 e Mellman et al. em 2011, a imunoterapia aumenta a resposta imunológica contra células malignas, através da estimulação de componentes específicos do sistema imune. Nhung et al. em 2018, demonstrou que a imunoterapia, através da expansão clonal autóloga *Ex vivo* de células NK e linfócitos T CD8⁺ provenientes do sangue periférico de pacientes com câncer de pulmão, melhorou a qualidade de vida. Quando associada aos tratamentos oncológicos preconizados (cirurgia, quimioterapia e radioterapia), a imunoterapia aumenta a eficácia em cerca de 30%, demonstrando a importância do sistema imunológico no combate contra o câncer (Terunuma et al. 2013). Porém, nem todos os tipos de câncer respondem da mesma forma à imunoterapia e compreender sua resposta imune anti-tumoral é fundamental para a melhoria do tratamento.

As células NK têm participação importante na imunidade inata e conhecida atividade citotóxica contra células tumorais, sem sensibilização prévia (Cheng et al. 2013; Zhao et al. 2015). É comum as alterações na expressão de proteínas na superfície de células malignas. As células NK reconhecem estas alterações e promovem a eliminação de células anômalas, porém a tentativa tumoral de evasão do sistema imune é reconhecida como uma das características do processo oncogênico. Segundo Ames e Murphy (2014), as células NK são encontradas principalmente no sangue e raramente no infiltrado tumoral. A quantidade de células NK, assim como sua produção de citocinas e a expressão de receptores ativos, estão diminuídos em pacientes oncológicos (Sutlu e Alici 2009). Elas agem através de receptores naturais de citotoxicidade, que pertencem à superfamília das imunoglobulinas, e reconhecem antígenos tumorais expressos na leucemia, linfoma, melanoma e no carcinoma, segundo Brandt et al. (2009). O microambiente tumoral constitui um desafio para a ação das células NK devido à supressão crônica do sistema imune, dificultando a infiltração e ativação dentro dos ninhos tumorais (Vitale et al. 2014).

Devido a capacidade de produção de citocinas pró-inflamatórias, as células NK podem reverter o efeito anti-inflamatório do microambiente tumoral e potencializar a resposta imune adaptativa, promovendo diferenciação, ativação e o recrutamento de células imune para a área tumoral. A Imunoterapia com transferência de células NK tem se mostrado promissora no tratamento de vários tipos de câncer e já vem sendo estudada como opção no tratamento do câncer de pênis (Pan et al. 2013; 2014). Estudo brasileiro avaliou as células mononucleares do

sangue periférico de 39 pacientes com CaPe e demonstrou diminuição significativa da atividade das células NK neste grupo em comparação com o grupo controle, embora a presença de metástase não tenha demonstrado diferença estatisticamente significativa (Campos et al. 1998). Apesar disso, não observamos achados estatisticamente significativos ao analisarmos os níveis de células NK circulantes no grupo CaPe comparando-os com o tamanho tumoral, IPN e com o grupo controle.

Ao compararmos o percentual de linfócitos T CD3⁺, T CD4⁺, T CD8⁺ no sangue periférico do grupo CaPe com o grupo CTRL, não observamos diferenças estatisticamente significantes. Porém, ao analisarmos o grupo CaPe estratificando pelo tamanho tumoral (<3,5cm e ≥3,5cm), observamos uma diferença estatisticamente significativa no percentual de linfócitos T CD8⁺. Os pacientes com tumores <3,5 cm apresentaram percentual de linfócitos T CD8⁺ maior quando comparados com os tumores ≥3,5 cm (p=0,01). Além disso, observamos maior percentual de linfócitos T CD8⁺ no sangue periférico de pacientes com ausência de invasão perineural (IPN), quando comparados com IPN positiva, sendo achado estatisticamente significativo (p=0,04). Quatro estudos analisados através de Meta-análise publicada em 2019 demonstram que tanto o volume tumoral, quanto a IPN são fatores preditivos positivos para metástase linfonodal (Hu et al. 2019). Estes achados sugerem que a presença de fatores de pior prognóstico oncológico no CaPe, como maior volume tumoral e IPN, está associada com alterações da resposta imune celular, caracterizada pelo menor percentual de linfócitos T citotóxicos circulantes, e consequentemente, comprometimento da resposta anti-tumoral. Estudo realizado em 2018 pelo grupo de Amsterdam, analisando o valor prognóstico de fatores imunológicos no microambiente tumoral em 213 indivíduos com CaPe, demonstrou valores mais elevados de linfócitos T CD8⁺ e de linfócitos T-Reg no estroma do que na área tumoral, não havendo diferenças quanto ao status de HPV. Demonstrou ainda que a baixa infiltração de linfócitos T CD8⁺ no estroma está associado com metástase linfonodal (Ottenhof et al. 2018).

As células B têm um importante papel na modulação da resposta imune contra o câncer, inibindo o desenvolvimento tumoral através da produção de anticorpos, identificando e reconhecendo antígenos tumorais, ativando a cascata de complementos, promovendo a ação citotóxica das células NK, fagocitose pelos macrófagos e participando da ativação dos linfócitos T. É o segundo tipo de linfócito mais abundante no microambiente tumoral.

Em contrapartida, as células B também podem inibir a resposta imune anti-tumoral. Células B regulatórias podem suprimir a resposta Th1 e a ação dos linfócitos T CD8⁺. Ratos com depleção de células B apresentaram maior resistência ao desenvolvimento de fibrosarcoma, crescimento tumoral lento e diminuição da incidência de metástase pulmonar

(Brodt e Gordon 1978). Alguns anticorpos anti-tumorais, produzidos pelas células B, podem gerar imuno complexos circulantes (ICC). Esses ICC estão associados a mal prognóstico, pois não se correlaciona com atividade anti-tumoral (Tan e Coussens 2007; Kumar et al. 2009). Esta relação pró-tumorigênica e ICC também foi demonstrada por de Visser et al. em 2005, utilizando um modelo de camundongo geneticamente modificado para CEC. As células B também podem promover um aumento da angiogênese e da linfangiogênese, provocando aumento tumoral e do risco de metástases. Estudos têm demonstrado aumento na população de células B circulantes e no microambiente tumoral. Nosso estudo não demonstrou resultados estatisticamente significativos ao analisarmos os linfócitos B relacionando-os com o tamanho tumoral e IPN nos pacientes com CaPe. Porém, observamos um maior percentual de linfócitos B no sangue periférico do grupo controle quando comparado ao grupo CaPe, sendo achado estatisticamente significativo ($p=0,0002$). Estes dados sugerem que a resposta imunológica, através dos linfócitos B, esteja alterada em pacientes com CaPe, contribuindo para o desenvolvimento tumoral.

STAT1 é um mediador de imunidade essencial contra microorganismos e tumores. As principais citocinas envolvidas nas atividades da STAT1, IL-12 e IFN, têm participação fundamental na regulação das células NK. Ausência de atividade da STAT1 está associada a prejuízo da citotoxicidade das células NK, contribuindo para maior sobrevida tumoral (Lee et al. 2000; Putz et al. 2016). Dalton et al. em 1993, corroborou estes achados, demonstrando redução das atividades das células NK em ratos com deficiência de IFN- γ e enfatizando a importância do papel do IFN, não apenas como efetor das ações das NK, como também modulador da atividade in vivo.

A participação da STAT1 tem sido demonstrada na supressão tumoral em várias malignidades através do sistema imune efetor. Crnčec et al. em 2018, demonstrou a supressão tumoral promovida pela STAT1 no câncer colo-retal associado à colite nos homens e ratos do sexo masculino. Holthof et al. em 2017, por sua vez, demonstrou que a diminuição na expressão de STAT1 no CEC de vulva está associado a variantes de maior agressividade, aumento da incidência de metástases e da recorrência tumoral.

Em contrapartida, outros estudos têm demonstrado uma relação positiva entre a expressão de STAT1 e a oncogênese. Kharm et al. (2014) definiu STAT1 como promotor oncogênico no carcinoma endometrial papilar seroso, modulando a progressão tumoral com pior prognóstico e sugerindo a STAT1 como novo alvo na terapia molecular. A literatura médica tem demonstrado resultados conflitantes na participação das STATs na oncogênese, quando avaliado o tipo tumoral e o estadiamento, além de alterações na resposta ao tratamento.

Segundo estudos de Wang et al. (2015) e Li et al. (2016) os níveis de STAT4 estão diminuídos nos pacientes com carcinoma hepatocelular e foi negativamente correlacionado com estadio TNM, embolo tumoral de veia porta, número de linfonodos comprometidos e cirrose, demonstrando sua ação na supressão tumoral, podendo ser um potencial alvo para terapia molecular. Até o momento, pouco se sabe sobre a expressão das STATs no CaPe.

Nosso estudo demonstrou níveis percentuais elevados de linfócitos T circulantes com expressão de STAT1 e STAT4 no grupo CaPe quando comparados ao grupo controle, sendo achado estatisticamente significativo ($p=0,004$ e $p=0,008$, respectivamente). Apesar disto, observamos diminuição da expressão de T-bet em comparação ao grupo controle. Estes dados sugerem a ativação da via de sinalização STAT1 e STAT4 pelo sistema imune dos pacientes com CaPe, porém comprometimento da resposta Th1 demonstrado pela diminuição da expressão de T-bet.

Quando comparado ao tamanho tumoral, não houve diferença estatisticamente significativa em relação à expressão de STAT1, STAT4 e T-bet nos pacientes com CaPe. Porém, observamos elevação da expressão destes três fatores em pacientes com IPN- em comparação com IPN+, sendo achado estatisticamente significativo. Como a presença da IPN nos tumores tem sido demonstrada como fator de pior prognóstico, ao demonstrarmos diminuição da expressão da STAT1, STAT4 e T-bet em indivíduos com CaPe e presença de IPN, sugerimos que a expressão destes fatores está associada com a atividade imune anti-tumoral.

Em relação as análises de correlação entre STAT4 e STAT1, T-bet e STAT1 e T-bet e STAT4, no grupo CaPe e no grupo controle, observamos correlação positiva apenas na relação T-bet/ STAT4 no grupo CaPe ($r=0,58$) ($p=0,002$). Desta forma, demonstramos uma relação proporcional entre T-bet e STAT4 nos pacientes com CaPe. A expressão de T-bet é induzida via TCR e IFN- γ – STAT1 a produzir precursores de células Th e é conduzida de forma subsequente, pela IL-12 – STAT4, sem a estimulação TCR. Esta interrupção da sinalização TCR é necessária para T-bet induzir a expressão de receptores para IL-12, o que leva a uma amplificação da expressão de T-bet. Ou seja, a correlação positiva entre STAT4 e T-bet observada nos pacientes com CaPe é importante para a amplificação da resposta Th1. Como observamos um déficit de resposta via STAT4, sugerimos comprometimento da resposta imune anti-tumoral nos pacientes com CaPe.

Apesar dos dados conflitantes observados na literatura a respeito da atuação da família STAT nos diferentes tipos de câncer, nosso estudo demonstra participação das STAT1 e STAT4 na resposta imune anti-tumoral no CaPe. A nossa casuística foi fator limitante para algumas

análises, como inclusão do estudo da presença do HPV, invasão angio-linfática, presença de metástase linfonodal. Desta forma, esperamos que novos estudos possam contribuir para um maior conhecimento nesta área e propiciar a abertura de novos caminhos na propedêutica do CaPe, visando a diminuição da morbi-mortalidade presente na doença, assim como melhorar a qualidade de vida destes pacientes.

O atual estudo demonstra o envolvimento e a importância do sistema imune no processo tumoral do câncer de pênis. Este foi o primeiro estudo analisando a expressão das STATs 1 e 4 e do fator T-bet no sangue periférico de indivíduos com CaPe. As análises demonstraram alterações na expressão de STAT4 e do percentual de linfócitos T CD8⁺ e células B no CaPe. A compreensão da imunologia tumoral é fundamental para o desenvolvimento de novas terapias contra o câncer, visando não apenas o tratamento, como também a diminuição de seus efeitos adversos.



CONCLUSÃO



7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitiram concluir que:

- Existem alterações no perfil de expressão STAT1/STAT4 e T-bet no carcinoma escamoso de pênis, o que podem estar associadas a comprometimento funcional dos linfócitos T efetores do tipo Th1;
- As alterações dos níveis STAT1/STAT4 e T-bet ocorreu no grupo de pacientes com doença avançada (IPN+);
- A redução dos níveis de células B e TCD8+ encontrado nos pacientes pode estar a deficiência funcional de linfócitos TCD4+ do tipo Th1;
- Existem correlação na expressão de T-bet/STAT4 nos pacientes com carcinoma de pênis



REFERÊNCIAS



8 REFERÊNCIAS

Adamkova L, Souckova K, Kovarik J. Transcription protein STAT1: biology and relation to cancer. *Folia Biol.* 2007;53:1-6.

Aita GA, Zequi SC, Costa WH, Guimarães GC, Soares FA, Giuliangelis TS. Tumor histologic grade is the most important prognostic factor in patients with penile cancer and clinically negative lymph nodes not submitted to regional lymphadenectomy. *Int Braz J Urol.* 2016;42(6):1136-43.

Albini A, Sporn MB. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(2):139-47.

Ames E, Murphy WJ. Advantages and clinical applications of natural killer cells in cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2014;63(1):21-8.

Bach EA, Aguet M, Schreiber RD. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:563-91.

Barbi J, Snider HM, Bhardwaj N, Lezama-Davila CM, Durbin JE, Satoskar AR. Signal transducer and activator of transcription 1 in T cells plays an indispensable role in immunity to *Leishmania major* by mediating Th1 cell homing to the site of infection. *FASEB J.* 2009;23(11):3990-9.

Barnholtz-Sloan JS, Maldonado JL, Pow-sang J, Guiliano AR. Incidence trends in primary malignant penile cancer. *Urol Oncol: Semin Orig Invest.* 2007;25(5):361-7.

Bethune G, Campbell J, Rocker A, Bell D, Rendon R, Merrimen J. Clinical and pathologic factors of prognostic significance in penile squamous cell carcinoma in a North American population. *Urology.* 2012;79(5):1092e7.

- Bezerra AL, Lopes A, Santiago GH, Ribeiro KC, Latorre MR, Villa LL. Human papillomavirus as a prognostic factor in carcinoma of the penis: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy. *Cancer*. 2001;91(12):2315-21.
- Bleeker MC, Heideman DA, Snijders PJ, Horenblas S, Dillner J, Meijer CJ. Penile cancer: epidemiology, pathogenesis and prevention. *World J Urol*. 2009;27(2):141–50.
- Boudny V, Kovarik J. JAK/STAT signaling pathways and cancer. Janus kinases/signal transducers and activators of transcription. *Neoplasma*. 2002;49(6):349-55.
- Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene*. 2000;19(21):2474-88.
- Brandt CS, Baratin M, Yi EC, Kennedy J, Gao Z, Fox B, et al. The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J Exp Med*. 2009;206(7):1495-503.
- Brodth P, Gordon J. Anti-tumor immunity in B lymphocyte-deprived mice. I. Immunity to a chemically induced tumor. *J Immunol*. 1978;121(1):359–62.
- Bromberg J, Darnell JE Jr. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene*. 2000;19(21):2468-73.
- Calmon MF, Tasso Mota M, Vassallo J, Rahal P. Penile carcinoma: risk factors and molecular alterations. *Scientific World J*. 2011;11:269-82.
- Campos MM, de Souza MH, Pires V, Scheiner MA, Esteves EB, Ornellas AA. Clinical implications of natural killer cytotoxicity in patients with squamous cell carcinoma of the penis. *Nat Immun*. 1998;16(5-6):256-62.
- Catlett-Falcone R, Dalton WS, Jove R. STAT proteins as novel targets for cancer therapy. Signal transducer and activator of transcription. *Curr Opin Oncol*. 1999;11(6):490-6.

Chaux A, Velazquez EF, Algaba F, Ayala G, Cubilla AL. Developments in the pathology of penile squamous cell carcinomas. *Urology*. 2010;76(2 Suppl 1):S7S14.

Chaux A, Cubilla AL. Advances in the pathology of penile carcinomas. *Hum Pathol*. 2012;43(6):771-89.

Cheng M, Chen Y, Xiao W, Sun R, Tian Z. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cell Mol Immunol*. 2013;10(3):230-52.

Christodoulidou M, Sahdev V, Houssein S, Muneer A. Epidemiology of penile cancer. *Curr Probl Cancer*. 2015;39(3):126-36.

Clark PE, Spiess PE, Agarwal N, et al. Penile cancer: clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2013;11(5):594-615.

Coelho RWP, Pinho JD, Moreno JS, Garbis DVEO, do Nascimento AMT, Larges JS, et al. Penile cancer in Maranhão, Northeast Brazil: the highest incidence globally? *BMC Urol*. 2018;18(1):50.

Compérat E. Pathology of penile cancer. *Eur Urol Suppl*. 2018;17(6):132-7.

Crnčec I, Modak M, Gordziel C, Svinka J, Scharf I, Moritsch S, et al. STAT1 is a sex-specific tumor suppressor in colitis-associated colorectal cancer. *Mol Oncol*. 2018;12(4):514-28.

Cubilla AL, Reuter VE, Gregoire L, Ayala G, Ocampos S, Lancaster WD, et al. Basaloid squamous cell carcinoma: a distinctive human papilloma virus-related penile neoplasm: a report of 20 cases. *Am J Surg Pathol*. 1998;22(6):755-61.

Cubilla AL, Reuter V, Velazquez E, Piris A, Saito S, Young RH. Histologic classification of penile carcinoma and its relation to outcome in 61 patients with primary resection. *Int J Surg Pathol* 2001; 9(2):111-20.

Dalton DK, Pitts-Meek S, Keshav S, Figari IS, Bradley A, Stewart TA. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science*. 1993;259(5102):1739-42.

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(5164):1415-21.
Darnell JE Jr. STATs and gene regulation. *Science*. 1997;277:1630-5.

Darnell JE Jr. Studies of IFN-induced transcriptional activation uncover the Jak-Stat pathway. *J Interferon Cytokine Res*. 1998;18:549-54.

de Visser KE, Korets LV, Coussens LM. De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. *Cancer Cell*. 2005;7(5):411-23.

Di Lorenzo G, Perdonà S, Buonerba C, Sonpavde G, Gigantino V, Pannone G, et al. Cytosolic phosphorylated EGFR is predictive of recurrence in early stage penile cancer patients: a retrospective study. *J Transl Med*. 2013;11:161.

Dillner J, von Krogh G, Horenblas S, Meijer CJLM. Etiology of squamous cell carcinoma of the penis. *Scand J Urol Nephrol*. 2000;34(205):189-93.

Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(9):666-75.

Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(11):836-48.

Efimova EV, Liang H, Pitroda SP, Labay E, Darga TE, Levina V, et al. Radioresistance of Stat1 over-expressing tumour cells is associated with suppressed apoptotic response to cytotoxic agents and increased IL6-IL8 signalling. *Int J Radiat Biol*. 2009;85(5):421-31.

Emmanuel A, Nettleton J, Watkin N, Berney DM. The molecular pathogenesis of penile carcinoma: current developments and understanding. *Virchows Arch*. 2019;475(4):397-405.

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(5):587–91.

Gately MK, Renzetti LM, Magram J, Stern AS, Adorini L, Gubler U, et al. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:495-521.

Gotthardt D, Sexl V. STATs in NK-cells: the good, the bad, and the ugly. *Front Immunol*. 2017;7:694.

Guimarães GC, Rocha RM, Zequi SC, Cunha IW, Soares FA. Penile cancer: epidemiology and treatment. *Curr Oncol Rep*. 2011;13(3):231-9.

Hakenberg OW, Comperat EM, Minhas S, Necchi A, Protzel C, Watkin N. EAU guidelines on penile cancer: 2014 update. *Eur Urol*. 2015;67(1):142-50.

Hix LM, Karavitis J, Khan MW, Shi YH, Khazaie K, Zhang M. Tumor STAT1 transcription factor activity enhances breast tumor growth and immune suppression mediated by myeloid-derived suppressor cells. *J Biol Chem*. 2013;288(17):11676-88.

Holthof ER, Byrum SD, Mackintosh SG, Kelly T, Tackett AJ, Quick CM, et al. Vulvar squamous cell carcinoma aggressiveness is associated with differential expression of collagen and STAT1. *Clin Proteomics*. 2017;14:40.

Hu J, Cui Y, Liu P, Zhou X, Ren W, Chen J, et al. Predictors of inguinal lymph node metastasis in penile cancer patients: a meta-analysis of retrospective studies. *Cancer Manag Res*. 2019;11:6425-41.

Ihle JN. Cytokine receptor signaling. *Nature*. 1995;377(6550):591-4.

Intlekofer AM, Takemoto N, Wherry EJ, Longworth SA, Northrup JT, Palanivel VR, et al. Effector and memory CD8⁺ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat. Immunol*. 2005; 6(12):1236-44.

- Kalinski P, Mailliard RB, Giermasz A, Zeh HJ, Basse P, Bartlett DL, et al. Natural killer-dendritic cell cross-talk in cancer immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther*. 2005;5(10):1303-15.
- Kalos M, June CH. Adoptive T cell transfer for cancer immuno- therapy in the era of synthetic biology. *Immunity*. 2013;39(1):49-60.
- Kaplan MH, Wurster AL, Grusby MJ. A signal transducer and activator of transcription (Stat)4-independent pathway for the development of T helper type 1 cells. *J Exp Med*. 1998;188(6):1191-6.
- Kayes O, Ahmed HU, Arya M, Minhas S. Molecular and genetic pathways in penile cancer. *Lancet Oncol*. 2007;8(5):420-9.
- Keeping ST, Tempest MJ, Stephens SJ, Carroll SM, Sangar VK. Penile cancer treatment costs in England. *BMC Public Health*. 2015;15:1305.
- Kharm B, Baba T, Matsumura N, Kang HS, Hamanishi J, Murakami R, et al. STAT1 drives tumor progression in serous papillary endometrial cancer. *Cancer Res*. 2014;74(22):6519-30.
- Kotenko SV, Pestka S. Jak-Stat signal transduction pathway through the eyes of cytokine class II receptor complexes. *Oncogene*. 2000;19(21):2557-65.
- Kroon BK, Horenblas S, Lont AP, Tanis PJ, Gallee MP, Nieweg OE. Patients with penile carcinoma benefit from immediate resection of clinically occult lymph node metastases. *J Urol*. 2005;173(3):816-9.
- Kumar S, Mohan A, Guleria R. Prognostic implications of circulating anti-p53 antibodies in lung cancer--a review. *Eur J Cancer Care (Engl)*. 2009;18(3):248-54.
- Kupferman ME, Jayakumar A, Zhou G, Xie T, Dakak-Yazici Y, et al. Therapeutic suppression of constitutive and inducible JAK\STAT activation in head and neck squamous cell carcinoma. *J Exp Ther Oncol*. 2009;8(2):117-27.

- Kusaba T, Nakayama T, Yamazumi K, Yakata Y, Yoshizaki A, Nagayasu T, et al. Expression of p-STAT3 in human colorectal adenocarcinoma and adenoma; correlation with clinicopathological factors. *J Clin Pathol*. 2005;58(8):833-8.
- Lai SY, Johnson FM. Defining the role of the JAK-STAT pathway in head and neck and thoracic malignancies: implications for future therapeutic approaches. *Drug Resist Updat*. 2010;13(3):67-78.
- Lasek W, Zagożdżon R, Jakobisiak M. Interleukin 12: still a promising candidate for tumor immunotherapy? *Cancer Immunol Immunother*. 2014;63(5):419-35.
- Lee C-K, Rao DT, Gertner R, Gimeno R, Frey AB, Levy DE. Distinct requirements for IFNs and STAT1 in NK cell function. *J Immunol*. 2000;165(7):3571-7.
- Legrier ME, Bièche I, Gaston J, Beurdeley A, Yvonnet V, Déas O, et al. Activation of IFN/STAT1 signalling predicts response to chemotherapy in oestrogen receptor-negative breast cancer. *Br J Cancer*. 2016;114(2):177-87.
- Li J, Yu B, Song L, Eschrich S, Haura EB. Effects of IFN-gamma and Stat1 on gene expression, growth, and survival in non-small cell lung cancer cells. *J Interferon Cytokine Res*. 2007;27(3):209-20.
- Li J, Liang L, Liu Y, Luo Y, Liang X, Luo D, et al. Clinicopathological significance of STAT4 in hepatocellular carcinoma and its effect on cell growth and apoptosis. *Onco Targets Ther*. 2016;9:1721-34.
- Lim DG, Bieganowska Bourcier K, Freeman GJ, Hafler DA. Examination of CD8⁺ T cell function in humans using MHC class I tetramers: similar cytotoxicity but variable proliferation and cytokine production among different clonal CD8⁺ T cells specific to a single viral epitope. *J Immunol*. 2000;165(11):6214-20.
- Linton P, Thoman ML. T cell senescence. *Front Biosci*. 2001;6:D248-D261.

- Liu S, Imani S, Deng Y, Pathak JL, Wen Q, Chen Y, Wu J. Targeting IFN/STAT1 pathway as a promising strategy to overcome radioresistance. *Onco Targets Ther.* 2020;13:6037-50.
- Lopes A, Hidalgo GS, Kowalski LP, Torloni H, Rossi BM, Fonseca FP. Prognostic factors in carcinoma of the penis: multivariate analysis of 145 patients treated with amputation and lymphadenectomy. *J Urol.* 1996;156(5):1637-42.
- Lu Y, Zhou J, Xu C, Lin H, Xiao J, Wang Z, et al. JAK/STAT and PI3K/AKT pathways form a mutual transactivation loop and afford resistance to oxidative stress-induced apoptosis in cardio-myocytes. *Cell Physiol Biochem.* 2008;21(4):305-14.
- Malaguarnera M, Cristaldi E, Romano G, Malaguarnera L. Autoimmunity in the elderly: implications for cancer. *J Cancer Res Ther.* 2012;8(4):520-7.
- Mannweiler S, Sygulla S, Tsybrovskyy O, Razmara Y, Pummer K, Regauer S. Clear-cell differentiation and lymphatic invasion, but not the revised TNM classification, predict lymph node metastases in pT1 penile cancer: a clinicopathologic study of 76 patients from a low incidence area. *Urol Oncol.* 2013;31(7):1378-85.
- McIntyre M, Weiss A, Wahlquist A, Keane T, Clarke H, Savage S. Penile cancer: an analysis of socioeconomic factors at a southeastern tertiary referral center. *Can J Urol.* 2011;18(1):5524-8.
- Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature.* 2011;480(7378):480-9.
- Mentrikoski MJ, Stelow EB, Culp S, Frierson HF Jr, Cathro HP. Histologic and immunohistochemical assessment of penile carcinomas in a North American population *Am J Surg Pathol.* 2014;38(10):1340-8.
- Meraz MA, White JM, Sheehan KC, Bach EA, Rodig SJ, Dighe AS, et al. Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell.* 1996;84(3):431-42.

- Misra S, Chaturvedi A, Misra NC. Penile carcinoma: a challenge for the developing world. *Lancet Oncol.* 2004;5(4):240-7.
- Mosconi AM, AM, Roila F, Gatta G, Theodore C. Cancer of the penis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2005;53(2):165-77.
- Motohashi S, Okamoto Y, Yoshino I, Nakayama T. Anti-tumor immune responses induced by iNKT cell-based immunotherapy for lung cancer and head and neck cancer. *Clin Immunol.* 2011;140(2):167-76.
- Mui AL. The role of STATs in proliferation, differentiation, and apoptosis. *Cell Mol Life Sci.* 1999;55(12):1547-58.
- Mukaka MM. Statistics corner: a guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Med J.* 2012;24(3):69-71.
- Novara G, Galfano A, De Marco V, Artibani W, Ficarra V. Prognostic factors in squamous cell carcinoma of the penis. *Nat Clin Pract Urol.* 2007;4(3):140-6.
- Nhung HTM, Anh BV, Huyen TL, Hiep DT, Thao CT, Lam PN, et al. Ex vivo expansion of human peripheral blood natural killer cells and cytotoxic T lymphocytes from lung cancer patients. *Oncol Lett.* 2018;15(4):5730-8.
- Ornellas AA, Kinchin EW, Nóbrega BL, Wisnescky A, Koifman N, Quirino R. Surgical treatment of invasive squamous cell carcinoma of the penis: Brazilian National Cancer Institute long-term experience. *J Surg Oncol.* 2008;97(6):487-95.
- Ottenhof SR, Djajadiningrat RS, Thygesen HH, Jakobs PJ, Józwiak K, Heeren AM, et al. The prognostic value of immune factors in the tumor microenvironments of penile cell carcinoma. *Front Immunol.* 2018;9:1253.
- Paiva GR, de Oliveira Araújo IB, Athanazio DA, de Freitas LA. Penile cancer: impact of age at diagnosis on morphology and prognosis. *Int Urol Nephrol.* 2015;47(2):295-9.

- Pan K, Guan XX, Li YQ, Zhao JJ, Li JJ, Qiu HJ, et al. Clinical activity of adjuvant cytokine-induced killer cell immunotherapy in patients with post-mastectomy triple-negative breast cancer, *Clin Cancer Res*. 2014;20:3003-11.
- Pan K, Li YQ, Wang W, Xu L, Zhang YJ, Zheng HX, et al. The efficacy of cytokine-induced killer cell infusion as an adjuvant therapy for postoperative hepatocellular carcinoma patients. *Ann Surg Oncol*. 2013;20(13):4305-11.
- Paner GP, Stadler WM, Hansel DE, Montironi R, Lin DW, Amin MB. Updates in the eighth edition of the tumor-node-metastasis staging classification for urologic cancers. *Eur Urol*. 2018;73(4):560-9.
- Pow-Sang MR, Ferreira U, Pow-Sand JM, Nardi AC, Destefano V. Epidemiology and natural history of penile cancer. *Urology*. 2010;76(2):2-6.
- Putz EM, Majoros A, Gotthardt D, Prchal-Murphy M, Zebedin-Brandl EM, Fux DA, et al. Novel non-canonical role of STAT1 in natural killer cell cytotoxicity. *Oncoimmunology*. 2016;5(9):e1186314. eCollection 2016.
- Quigley M, Huang X, Yang Y. STAT1 signaling in CD8 T cells is required for their clonal expansion and memory formation following viral infection in vivo. *J Immunol*. 2008;180(4):2158-64.
- Ramana CV, Chatterjee-Kishore M, Nguyen H, Stark GR. Complex roles of Stat1 in regulating gene expression. *Oncogene*. 2000;19(21):2619-27.
- Sansone P, Bromberg J. Targeting the interleukin-6/Jak/stat pathway in human malignancies. *J Clin Oncol*. 2012;30(9):1005-14.
- Schindler C, Darnell JE Jr. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem*. 1995;64:621-51.
- Schindler C, Brutsaert S. Interferons as a paradigm for cytokine signal transduction. *Cell Mol Life Sci*. 1999;55(12):1509-22.

- Schneckenleithner C, Bago-Horvath Z, Dolznig H, Neugebauer N, Kollmann K, Kolbe T, et al. Putting the brakes on mammary tumorigenesis: loss of STAT1 predisposes to intraepithelial neoplasias. *Oncotarget*. 2011;2(12):1043-54.
- Screpanti V, Wallin RP, Ljunggren HG, Grandien A. A central role for death receptor-mediated apoptosis in the rejection of tumors by NK cells. *J Immunol*. 2001;167(4):2068-73.
- Sewell J, Ranasinghe W, De Silva D, Ayres B, Ranasinghe T, Hounsome L, et al. Trends in penile cancer: a comparative study between Australia, England and Wales, and the US. *Springerplus*. 2015;4:420.
- Shuai K, Liu B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(11):900-11.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*. 2016;66(1):7-30.
- Sinigaglia F, D'Ambrosio D, Panina-Bordignon P, Rogge L. Regulation of the IL-12/IL-12R axis: a critical step in T-helper cell differentiation and effector function. *Immunol Rev*. 1999;170:65-72.
- Sky Ng TH, Britton GJ, Hill EV, Verhagen J, Burton BR, Wraith DC. Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. *Front Immunol*. 2013;4:129.
- Smithgall TE, Briggs SD, Schreiner S, Lerner EC, Cheng H, Wilson MB. Control of myeloid differentiation and survival by stats. *Oncogene*. 2000;19(21):2612-8.
- Sutlu T, Alici E. Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: current insights and future prospects. *J Intern Med*. 2009;266(2):154-81.
- Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*. 2000;100(6):655-69.

Szabo SJ, Sullivan BM, Stemmann C, Satoskar AR, Sleckman BP, Glimcher LH. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science*. 2002;295(5553):338-42.

Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:713-58.

Tan TT, Coussens LM. Humoral immunity, inflammation and cancer. *Curr Opin Immunol*. 2007;19(2):209-16.

Terunuma H, Deng X, Nishino N, Watanabe K. NK cell-based autologous immune enhancement therapy (AIET) for cancer. *J Stem Cells Regen Med*. 2013;9(1):9-13.

Turkson J, Jove R. STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery. *Oncogene*. 2000;19(56):6613-26.

Velazquez EF, Velazquez EF, Ayala G, Liu H, Chaux A, Zanotti M, Torres J, et al. Histologic grade and perineural invasion are more important than tumor thickness as predictor of nodal metastasis in penile squamous cell carcinoma invading 5 to 10 mm. *Am J Surg Pathol*. 2008;32(7):974-9.

Vitale M, Cantoni C, Pietra G, Mingari MC, Moretta L. Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function. *Eur J Immunol*. 2014;44(6):1582-92.

Wang G, Chen JH, Qiang Y, Wang DZ, Chen Z. Decreased STAT4 indicates poor prognosis and enhanced cell proliferation in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2015;21(13):3983-93.

Xiong H, Zhang ZG, Tian XQ, Sun DF, Liang QC, Zhang YJ, et al. Inhibition of JAK1, 2/STAT3 signaling induces apoptosis, cell cycle arrest, and reduces tumor cell invasion in colorectal cancer cells. *Neoplasia*. 2008;10(3):287-97.

Zhao Y, Hu J, Li R, Song J, Kang Y, Liu S, et al. Enhanced NK cell adoptive antitumor effects against breast cancer in vitro via blockade of the transforming growth factor-beta signaling pathway. *OncoTargetsTher*. 2015;8:1553-9.

Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G. Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011;8(3):151-60.



APÊNDICES E ANEXOS



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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: **PERFIL DE EXPRESSÃO DOS FATORES DE TRANSCRIÇÃO STAT-1, STAT-4 E T-BET NO CARCINOMA ESCAMOSO 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. Mauro Ricardo Marques, no telefone (81) 99491-5901. 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____

Dr. Mauro Ricardo Marques

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: PERFIL DE EXPRESSÃO DOS FATORES DE TRANSCRIÇÃO STAT-1, STAT-4 E T-BET NO CARCINOMA ESCAMOSO DE PÊNIS

2. Pesquisadores Responsáveis: Cargo/Função:

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

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

Dr. Mauro Ricardo Marques - 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.

1.1.1 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 ____

Pesquisadores responsáveis

Apêndice 2 - Ficha Clínica

FICHA CLÍNICA

Nome

Idade:

Rg:

Data

Matricula:

Localização da lesão

Glande () corpo () base ()

Linfonodos palpáveis

Sim () não ()

LHP

CEC () outros ()

IHQ - p16

Positivo () negativo ()

Estadiamento clínico

T__n__m__

Cirurgia

Sim () não () quando _____

Tipo de cirurgia

Falectomia () cirurgia conservadora ()

LHP cirúrgico

Pt__pn__

Grau de diferenciação

G1 () g2 () g3 () g4 ()

IPN

Sim () não ()

IAL

Sim () não ()

Margens comprometidas

Sim () não ()

10. Metástases linfonodais

Sim () não ()

Linfonodo acometido

Inguinal () ilíaco ()

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 DE STAT1 E STAT4 E RESPOSTA TH1 NO CâNCER DE PÊNIS

Pesquisador: mauro ricardo lima marques

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 52507115.9.0000.5205

Instituição Proponente: SOCIEDADE PERNAMBUCANA DE COMBATE AO CâNCER -SPCC

Patrocinador Principal: Fundação Antônio Prudente-Hospital do Câncer-A C Camargo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.426.818

Apresentação do Projeto:

Introdução: o câncer de pênis (CaPe) é uma doença rara em países desenvolvidos, porém, representa um problema de saúde pública em países em desenvolvimento. O Brasil apresenta a maior incidência mundial de CaPe, chegando a atingir até 6,8 casos por 100.000 homens, principalmente na região norte/nordeste, onde o índice de desenvolvimento humano é o pior do país. Seu diagnóstico ocorre geralmente de forma tardia, retardando o tratamento e piorando o prognóstico. O principal tipo histológico do CaPe é carcinoma de células escamosas (CEC), que por sua vez subdivide-se em: usual, basalóide, verrucoso, condilomatoso, papilífero, sarcomatóide, adenoescamoso e misto. O subtipo usual é o mais comum, incidindo em cerca de 65% dos casos. O microambiente tumoral é composto por células do sistema imune, demonstrando a tentativa de promover uma resposta antitumoral. As células Th1 atuam na imunidade celular e expressam fatores de transcrição como transdutor de sinal e ativador de transcrição 1 e 4 (STAT1 e STAT4). Tanto a STAT1, quanto a STAT4 promovem o início do processo de diferenciação das células T "naive" em Th1. A desregulação da via JAK/STAT leva a formação de tumores primários, assim como a supressão da resposta imune, o que leva ao aumento da sobrevivência tumoral e da angiogênese. Na tentativa de elucidar os mecanismos da resposta celular envolvidos no CaPe, o estudo inclui a avaliação da expressão de STAT1, STAT4 e T-bet no infiltrado e microambiente

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.040-000

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)3217-8005

Fax: (81)3217-8005

E-mail: cep@hcp.org.br

SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC



Continuação do Parecer: 1.426.818

tumoral e sangue periférico, bem como as concentrações de citocinas produzida na resposta do tipo Th1. Objetivo: Avaliar a expressão protéica de STAT1, STAT4 e T-bet no carcinoma escamoso de pênis. Método: Será realizado um estudo corte transversal, prospectivo e translacional com dois grupos, sendo o primeiro formado por 60 homens entre 18 e 80 anos de idade, com diagnóstico de CaPe do tipo CEC usual e o segundo grupo, formado por 15 homens saudáveis que não apresentam suspeita clínica de CaPe. O estudo será realizado com os pacientes no ambulatório de Urologia do Hospital de Câncer de Pernambuco e análises laboratoriais serão realizadas no laboratório de pesquisa do IMIP. O período de estudo será de Fevereiro de 2016 a Julho de 2019. Neste período serão realizados: coleta de sangue periférico e tecido tumoral, testes laboratoriais com análises dos dados, análise estatística e elaboração dos manuscritos para publicação científica. A concentração das citocinas TH1/TH2/TH17 (IL-2, IL-4 e IFN-) será determinada nas amostras de sobrenadante de cultura celular estimuladas com mitógenos e antígenos. A determinação será realizada por citometria de fluxo, utilizando BD TM CBA – Human TH1/TH2 Cytokines Kit. A estatística descritiva será representada por tabelas de distribuição de frequência com medidas de tendência central e de dispersão (mediana e intervalo interquartil). As comparações estatísticas entre os grupos serão realizadas pelo teste T não paramétrico (Mann-Whitney e Kruskals-Wallis). Serão considerados significativos valores de $P < 0,05$.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a expressão protéica de STAT1, STAT4 e T-bet no carcinoma escamoso de pênis

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

PENDÊNCIA - PRECISAR COLOCAR OS RISCOS E BENEFÍCIOS DO TRABALHO

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

PENDÊNCIA - PRECISAR COLOCAR OS RISCOS E BENEFÍCIOS DO TRABALHO

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TERMOS DE APRESENTAÇÃO OBRIGATÓRIO SEM PENDÊNCIAS

Recomendações:

PRECISA ESCREVER NO PROJETO DETALHADO OS RISCOS E BENEFÍCIOS DO PACIENTE

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

PRECISA ESCREVER NO PROJETO DETALHADO OS RISCOS E BENEFÍCIOS DO PACIENTE

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado com recomendações, no projeto lançado na plataforma foi explicado os riscos e benefícios do projeto, contudo não foi adicionado no projeto detalhado.

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.040-000

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)3217-8005

Fax: (81)3217-8005

E-mail: cep@hcp.org.br

SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC



Continuação do Parecer: 1.426.818

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_635381.pdf	14/01/2016 22:33:31		Aceito
Outros	anuencia.pdf	14/01/2016 22:32:09	mauro ricardo lima marques	Aceito
Outros	anuencialab.docx	13/01/2016 16:43:04	mauro ricardo lima marques	Aceito
Outros	ficha_clinica.docx	07/01/2016 17:04:23	mauro ricardo lima marques	Aceito
Outros	termo_de_consentimento.docx	07/01/2016 16:45:36	mauro ricardo lima marques	Aceito
Outros	Carta_de_anuencia.docx	07/01/2016 16:03:41	mauro ricardo lima marques	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_doutorado.docx	09/12/2015 22:08:45	mauro ricardo lima marques	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_CONTROLE.docx	09/12/2015 22:02:56	mauro ricardo lima marques	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	09/12/2015 22:00:40	mauro ricardo lima marques	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	09/12/2015 21:55:56	mauro ricardo lima marques	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 26 de Fevereiro de 2016

Assinado por:
ISABEL CRISTINA LEAL
(Coordenador)

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.040-000

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)3217-8005

Fax: (81)3217-8005

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	metásteses 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)