

**AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE
HIPERMETILAÇÃO DOS GENES *CDKN2A* E
MGMT EM CÂNCER DE PÊNIS E SUA
ASSOCIAÇÃO COM O PADRÃO DE EXPRESSÃO
PROTEICA E COM VARIÁVEIS CLÍNICAS E
ANATOMOPATOLÓGICAS DAS LESÕES**

LUCIANE TSUKAMOTO KAGOHARA

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente
para a obtenção do título de Doutor**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Soares

**Co-orientadores: Dr. Ademar Lopes e Dra. Renata
de Almeida Coudry**

São Paulo

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Kagohara, Luciane Tsukamoto.

Avaliação da frequência de hipermetilação dos genes CDKN2A e MGMT em câncer de pênis e sua associação com o padrão de expressão proteica e com variáveis clínicas e anatomopatológicas das lesões. / Luciane Tsukamoto Kagohara - São Paulo, 2011.

111p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Oncologia.

Orientadora: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. NEOPLASIAS PENIANAS. 2. METILAÇÃO DE DNA. 3. IMUNOISTOQUÍMICA. 4. GENES P16.

DEDICATÓRIA

Á Kimiko Tsukamoto (*in memorian*), pelo exemplo de ser humano, pela humildade, pela bondade e por uma vida inteira de amor e dedicação à sua família. Obrigada por ter me amado duas vezes. Agradeço a influência na minha educação e na minha formação como ser humano, como uma mãe zelosa e preocupada com meu futuro, e pelos tantos mimos, que só caberiam num coração de vó.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço aos meus pais, Tizue Kagohara e Valdir Kagohara, por terem dedicado 30 anos de suas vidas para me educar e me tornar um ser humano íntegro. Obrigada por uma vida inteira de muito amor e ternura e por sempre terem colocado as minhas prioridades e sonhos acima das suas. Muito obrigada pelo incentivo para que eu pudesse superar todas as dificuldades e por sempre acreditarem na minha capacidade quando eu mesma não fui capaz. Agradeço sobretudo aos “puxões de orelha”, foi graças a eles que me tornei a pessoa que sou e que pude conquistar tudo o que mais tenho de importante: conhecimento, educação e integridade.

Agradeço à minha irmã, Glaucia Tsukamoto Kagohara, por sempre torcer pelo meu sucesso e por sempre se lembrar de mim com pequenos gestos de carinho.

Agradeço a todos os membros da minha família, minha avó Sidu, tios e primos que sempre estiveram presentes com muito carinho e amor e que sempre me deram forças para continuar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Dr. Fernando Augusto Soares por ter confiado na minha capacidade, pelo aprendizado, pela paciência e disposição, por todo o apoio para que este projeto progredisse da melhor maneira possível e, principalmente, por sempre demonstrar uma extrema vontade e prazer em ensinar e fazer pesquisa. Obrigada pelo exemplo de ética e profissionalismo.

Agradeço aos meus co-orientadores Dr. Ademar Lopes e Dra. Renata de Almeida Coudry pelo apoio para que esta tese pudesse ser concluída.

Agradeço ao Dr. Gustavo Guimarães pelas análises estatísticas, pela paciência em fazer e refazer as análises quando era meu desejo e pelas discussões tão produtivas a respeito dos carcinomas de pênis.

Às amigas Yukie Sato-Kuwabara, Edaise Silva, Ligia Petrolini e Mila Oyama que sempre me apoiaram durante o desenrolar deste projeto. Obrigada pelas discussões, críticas, elogios, risadas e momentos tão alegres compartilhados dentro e fora do laboratório.

Agradeço à Mariana Brait, Márcia Dellamano e Fabia Bettoni pela amizade e pelo carinho, que a distância não foi capaz de dissolver; pela torcida e por sempre dividirem comigo os momentos de tristeza, desespero (quando nada dava certo no laboratório) e por tornarem os momentos de felicidade muito mais prazerosos.

Agradeço a Mariana Maschietto pelo carinho e amizade, mas especialmente pela serenidade e calma que sempre me contagiaram quando necessário. Obrigada por ser sempre tão prestativa e paciente quando eu precisava de alguém para o desabafo e por todos as festas e comilanças.

Às amigas Claudia Menatti, Fernanda Inoue, Cristina Orikaza, Nahomi Yamaki, Camila Marconi e Aripuanã Watanabe pela sincera amizade desde os tempos de faculdade.

A todos os alunos, pesquisadores, médicos, residentes e técnicos do Depto. de Anatomia Patológica – Hospital A.C. Camargo pelos quatro anos de convívio e por terem proporcionado tantos momentos de aprendizado, tanto profissional quanto pessoal. Um “obrigada” especial a Alice, Katia, Mérin, Gilmar, Liliane, Marina, Rodrigo, Ivan, Fátima, Simone, Carlinhos e Severino pela ajuda sempre presente e pela simpatia e carinho.

À Amanda Gonçalves da Silva e Nair Hideko Muto pelo carinho, sinceridade e dos “momentos desabafo” (que não foram poucos) essenciais durante o desenrolar do projeto. Obrigada pela boa companhia de viagem e por pequenos gestos de amizade que tornavam os momentos de tormenta mais leves.

Agradeço a todos os alunos, pesquisadores e funcionários do CIPE – Hospital A.C. Camargo pelo ambiente de amizade e por tantas discussões produtivas que contribuíram para esse projeto e para outros tantos. Agradeço em especial Anderson e Felipe, por lavarem toda a “louça” que se acumulava nas pias; Aderbal, Cecília, Gustavo, Carolina, Alex, Cássia, Hellen, Luciana, Fernanda, Sara, Débora, Renata, Juan, Tiago, Cleiton e Rogério pelo apoio, risadas e pelos momentos de descontração na “hora do café”.

Aos amigos que me acompanharam durante o mestrado e cuja amizade sempre se fez presente. Um agradecimento especial para Aline Bolpetti, Danielle Renzoni, Andrea Quintela, Fabio Piccoli e Daniel Vidal.

Aos amigos de longa data, Marina Piza, Juliana Harumi Arita, Michelle Vivian, Fulvia Manchado e Fabio Salomão, que apesar da distância e longos períodos de ausência não deixaram a amizade se desintegrar. Sabemos que a ausência não nos impede de trocar sentimentos mútuos de carinho e positividade.

Agradeço à diretora da pós-graduação, Ana Maria Kuninari, e às secretarias, Luciana Pitombeiras e Vanuza Barros Rodrigues, da Pós-graduação do Hospital A.C. Camargo pela simpatia, suporte, competência e apoio ao longo desses quatro anos.

À equipe da biblioteca, Suely Francisco, Francyne Pólen, Nicélia Vicente de Araújo e Jefferson de Oliveira, pelas centenas de artigos pesquisados, pela atenção e dedicação nos momentos requeridos.

Ao Dr. Ricardo Renzo Brentani, presidente da Fundação Antonio Prudente, pelas excelentes condições de trabalho.

Aos membros da banca de qualificação, Dra. Dirce Maria Carraro e Dr. Athanase Billis, pelas correções e sugestões durante o andamento desse estudo.

Aos membros da banca examinadora desta tese por aceitarem o convite e pela disposição em ler e arguir este trabalho.

À FAPESP pelo suporte financeiro para que esse estudo pudesse ser realizado e pela bolsa de estudos concedida.

RESUMO

Kagohara LT. **Avaliação do perfil de hipermetilação dos genes *P16^{INK4a}* e *MGMT* em câncer de pênis.** São Paulo; 2011. [Tese de doutorado-Fundação Antonio Prudente].

O carcinoma de pênis é um tumor pouco frequente. No entanto, em países em desenvolvimento o trata-se uma doença comum e em algumas regiões é o câncer mais frequente em homens. O principal fator clínico para determinação do prognóstico é a presença de metástases linfonodais, que está associada a redução significativa da sobrevida dos pacientes com câncer de pênis. Porém, até o presente momento não foi possível estabelecer marcadores clínicos ou moleculares de prognóstico. No presente estudo, foi avaliada a presença de hipermetilação nos genes *CDKN2A* e *MGMT* em amostras de carcinoma epidermóide (CE) de pênis. Além disso, os níveis de expressão das proteínas codificadas por esses genes (p16 e MGMT, respectivamente) foram quantificados e sua associação com o status de metilação do gene avaliada. A frequência de hipermetilação, o padrão de expressão e os dados clínicos e anatomopatológicos foram analisados na tentativa de identificar possíveis marcadores de prognóstico para os pacientes com CE de pênis. A frequência de hipermetilação dos genes *CDKN2A* e *MGMT* foi avaliada em 128 amostras incluídas em parafina. Nenhum dos casos apresentou metilação do gene *CDKN2A* e o gene *MGMT* apresentou-se metilado em 57,4% dos casos. A análise dos níveis de expressão das proteínas p16 e MGMT, em 351 casos, indicou que em 33,2% e 12,6%, respectivamente, ocorreu redução na expressão proteica. Não houve associação entre a presença de hipermetilação do gene *MGMT* e a expressão da proteína. Níveis reduzidos de expressão de MGMT foram mais frequentes em pacientes com tumores com espessura maior do que 5 milímetros e em pacientes com linfonodos positivos ao exame clínico. Dentre os fatores clínicos e anatomopatológicos, o estadiamento N clínico, o grau de diferenciação do tumor e a invasão perineural se mostraram variáveis independentes de risco para a ocorrência de metástases linfonodais e para redução da sobrevida.

SUMMARY

Kagohara LT. [**Hypermethylation profile evaluation of the genes *P16^{INK4a}* e *MGMT* in penile cancer**]. São Paulo; 2011. [Tese de doutorado-Fundação Antonio Prudente].

Penile carcinoma is an infrequent tumor. However, in developing countries it is a common disease and in specific regions it may represent the most frequent tumor among men. The most important prognostic clinical factor is the presence of lymph node metastasis, which is associated with significant reduced survival to the penile carcinoma patients. Nevertheless, until the present date it was not possible to establish clinical or molecular prognostic markers. In the current study, it was evaluated the presence of hypermethylation in the genes CDKN2A and MGMT in penile squamous cell carcinoma (SCC) samples. Moreover, expression levels from the proteins coded by the two genes (p16 and MGMT, respectively) were quantified and their association with methylation status verified. Hypermethylation frequency, pattern of expression and the clinical and pathological data were analyzed to identify associations that could identify possible prognostic markers for penile SCC. The hypermethylation frequency analysis of the genes CDKN2A and MGMT were performed in 128 paraffin embedded samples. None of the cases showed methylation at CDKN2A and the MGMT gene was methylated in 57,4% of cases. Expression level analysis of the proteins p16 and MGMT, in 351 cases, indicated decreased protein expression in 33.2% and 12.6% of cases, respectively. There was no association between MGMT gene hypermethylation and the protein expression. Reduced MGMT expression levels were more frequent among patients with tumor thickness higher than 5 millimeters and with positive lymph nodes at clinical examination. The clinical and pathological factors associated to higher risk of lymph node metastasis development and survival reduction were clinical N stage, tumor differentiation grade and perineural invasion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Reação de adição de radical metil (CH_3) à base nitrogenada citosina.....	13
Figura 2	Silenciamento gênico induzido pela metilação.....	16
Figura 3	Hipótese do silenciamento gênico induzido através da alteração da conformação da cromatina.....	17
Figura 4	Desenho esquemático da reação de pirosequenciamento.....	23
Figura 5	Figura representativa do ciclo celular e o papel da proteína p16 durante a fase G1.....	27
Figura 6	Figura representativa do papel de proteína MGMT no reparo a danos ao DNA.....	30
Figura 7	Curva da probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica dos pacientes com carcinoma epidermóide de pênis.....	54
Figura 8	Curva da probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica dos pacientes com carcinoma epidermóide de pênis, de acordo com o estadiamento N clínico.....	55
Figura 9	Curva da probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica dos pacientes com carcinoma epidermóide de pênis, de acordo com o comprometimento linfonodal ao exame patológico.....	56

Figura 10	Curva da probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica dos pacientes com carcinoma epidermóide de pênis, de acordo com o grau de diferenciação do tumor.....	56
Figura 11	Curva da probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica dos pacientes com carcinoma epidermóide de pênis, de acordo com a presença de invasão perineural.....	57
Figura 12	Curva da probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica dos pacientes com carcinoma epidermóide de pênis, de acordo com a invasão dos corpos cavernosos.....	57
Figura 13	Curva da probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica dos pacientes com carcinoma epidermóide de pênis, de acordo com a presença de invasão vascular.....	58
Figura 14	Curva da probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica dos pacientes com carcinoma epidermóide de pênis, de acordo com a ocorrência de recidiva tumoral.....	58
Figura 15	Foto representativa de gel eletroforese da PCR do gene β - <i>ACTINA</i> , realizada com amostras submetidas ao tratamento com bissulfito de sódio.....	61
Figura 16	Foto representativa de gel de eletroforese da PCR para amplificação da região promotora do gene <i>CDKN2A</i>	62
Figura 17	Foto representativa de gel de eletroforese da PCR para amplificação da região promotora do gene <i>MGMT</i>	62
Figura 18	Pirogramas representativos do sequenciamento da região	63

promotora alvo do gene
CDKN2A.....

Figura 19	Pirogramas representativos do sequenciamento da região promotora alvo do gene <i>MGMT</i>	64
Figura 20	Figura representativa da reação de imunistoquímica contra a proteína p16.....	67
Figura 21	Figura representativa da reação de imunistoquímica contra a proteína <i>MGMT</i>	68

LISTA DE TABELAS

Quadro 1	Genes e frequências de hipermetilação descritos pelos estudo realizados em amostras de pacientes com CEC de pênis.....	22
Tabela 1	Frequência das variáveis clínicas e demográficas dos 351 pacientes portadores de carcinoma peniano.....	49
Tabela 2	Frequência das variáveis anatomopatológicas nos 351 pacientes portadores de carcinoma peniano.....	50
Tabela 3	Análise univariada para determinar a associação entre as variáveis clínicas e anatomopatológicas dos pacientes com câncer de pênis e o comprometimento linfonodal.....	53
Tabela 4	Probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica em 5 anos dos pacientes com carcinoma epidermóide de pênis de acordo com as variáveis epidemiológicas, clínicas e anatomopatológicas.....	59
Tabela 5	Fatores clínicos e anatomopatológicos de acordo com o status de metilação do gene <i>MGMT</i>	65
Tabela 6	Probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica em 5 anos dos pacientes com carcinoma epidermóide de pênis de acordo com o status de metilação do gene <i>MGMT</i>	66
Tabela 7	Distribuição das amostras de carcinoma epidermóide de pênis de acordo com o nível de expressão das proteínas p16 e <i>MGMT</i>	67
Tabela 8	Fatores clínicos e anatomopatológicos de acordo com a expressão da proteína p16 nos pacientes com câncer de pênis.....	69

Tabela 9	Fatores clínicos e anatomopatológicos de acordo com a expressão da proteína MGMT em pacientes com câncer de pênis.....	70
Tabela 10	Probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica em 5 anos dos pacientes com carcinoma epidermóide de pênis de acordo com o padrão de expressão das proteínas p16 e MGMT.....	71
Tabela 11	Expressão da proteína MGMT de acordo com a hipermetilação do gene <i>MGMT</i>	71

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrômetro
ATP	adenosina tri-fosfato
BMI-1	proteína codificada pelo oncogene <i>polycomb ring finger</i>
C	citosina
CCD	<i>charge coupled device</i>
CCND	ciclina
Cdk	quinase dependente de ciclina
Cdk1	quinase dependente de ciclina 1
Cdk2	quinase dependente de ciclina 2
Cdk4	quinase dependente de ciclina 4
Cdk6	quinase dependente de ciclina 6
CDKN2A	inibidor de quinase dependente de ciclina 2A
CE	carcinoma epidermóide
CKI	inibidor de quinase dependente de ciclina
DAPK	gene <i>Death Associated Protein Kinase</i>
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNMT	DNA metil-transferase
DNMT1	DNA metil-transferase 1
DNMT3a	DNA metil-transferase 3a
DNMT3b	DNA metil-transferase 3b
dNTP	deoxinucleotídeo
EDTA	ácido etileno-diamino-tetraacético
FHIT	gene <i>Fragile Histidine Triad</i>
G	guanina

HDAC	histona deacetilase
HPV	Papiloma vírus humano
IC	intervalo de confiança
LOH	perda de heterozigose
MBD	proteínas de ligação à domínios CpG metilados
MGMT	gene O ⁶ -metilguanina DNA metiltransferase
MGMT	proteína codificada pelo gene <i>MGMT</i>
mM	mili molar
MMP	metaloproteinase de matriz
MMP-2	metaloproteinase de matriz 2
MMP-9	metaloproteinase de matriz 9
mRNA	RNA mensageiro
MSP	<i>Methylation Specific PCR</i>
NA	não avaliado
NaCl	cloreto de sódio
ng	nanograma
<i>P14^{ARF}</i>	gene <i>P14^{ARF}</i>
p16	proteína codificada pelo gene <i>P16^{INK4a}</i>
<i>P16^{INK4a}</i>	gene <i>P16^{INK4a}</i>
PBS	solução salina fosfo-tamponada
PCNA	antígeno nuclear de proliferação celular
PCR	reação em cadeia da polimerase
PPi	pirofosfato
pRb	proteína codificada pelo gene Retinoblastoma
<i>RARβ</i>	gene <i>Retinoic Acid Receptor</i>
<i>RASSF1A</i>	gene <i>Ras Association Domain Family 1A</i>
<i>Rb</i>	gene Retinoblastoma
RNA	ácido ribonucléico
RR	risco relativo

<i>RUNX3</i>	gene <i>Run Related Transcription Factor 3</i>
SAM	S-adenosil-metionina
SDS	dodecil sulfato de sódio
TE	Tris-EDTA
TMA	<i>tissue microarray</i>
<i>TP53</i>	gene <i>TP53</i>
<i>TSP-1</i>	gene <i>Trombospondin-1</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Câncer de Pênis.....	1
1.2	A Metilação do DNA.....	12
1.3	O Carcinoma Epidermóide e Pênis e a Hipermetilação do DNA.....	19
1.4	Avaliação do Perfil de Hipermetilação Através da Técnica de Pirosequenciamento.....	22
1.5	O Gene <i>CDKN2A</i> e o Ciclo Celular.....	25
1.6	O Gene <i>MGMT</i> e o Reparo a Danos ao DNA.....	28
2	OBJETIVOS.....	33
2.1	Objetivo Geral.....	33
2.2	Objetivos Específicos.....	33
3	MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1	Seleção dos Pacientes.....	34
3.2	Extração do DNA das Amostras Incluídas em Parafina.....	35
3.3	Tratamento com Bissulfito de Sódio.....	36
3.4	Amplificação das Regiões Promotoras dos Genes <i>CDKN2A</i> e <i>MGMT</i>	38
3.5	Pirosequenciamento.....	40
3.6	Confecção do <i>Tissue Microarray</i> (TMA).....	42
3.7	Imunoistoquímica.....	43
3.8	Análise Estatística.....	45
4	RESULTADOS	47
4.1	Caracterização da amostra.....	47
4.2	Avaliação da Hipermetilação nas Regiões Promotoras dos Genes <i>CDKN2A</i> e <i>MGMT</i>	60
4.3	Expressão das Proteínas p16 e <i>MGMT</i>	66

5	DISCUSSÃO.....	72
6	CONCLUSÕES	94
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

ANEXOS

- Anexo 1** Ficha de Levantamento de Dados.
- Anexo 2** Tabela com os Dados da Quantificação por Espectrofotometria das Amostras de DNA de Carcinoma Epidermóide de Pênis Incluídas em Parafina.
- Anexo 3** Figura representativa da localização do fragmento seqüenciado para a determinação do padrão de hipermetilação do gene *CDKN2A*.
- Anexo 4** Figura representativa da localização do fragmento seqüenciado para a determinação do padrão de hipermetilação do gene *MGMT*.
- Anexo 5** Níveis de hipermetilação de cada sítio CpG avaliado para o gene *CDKN2A*, nível de hipermetilação da amostra e classificação de cada caso de acordo com o status de metilação. U – amostra não metilada; M – amostra metilada.
- Anexo 6** Níveis de hipermetilação de cada sítio CpG avaliado para o gene *MGMT*, nível de hipermetilação da amostra e classificação de cada caso de acordo com o status de metilação. U – amostra não metilada; M – amostra metilada.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE PÊNIS

O câncer de pênis é uma neoplasia rara em países desenvolvidos, nos quais as taxas de incidência são menores que 1/100.000 habitantes e esses tumores representam apenas 0,5% de todas as neoplasias malignas diagnosticadas em homens (RIPPENTROP et al. 2004; BARNHOLTZ-SLOAN et al. 2007; NOVARA et al. 2007; MINHAS et al. 2010). Nos Estados Unidos, o carcinoma de pênis corresponde a 0,4% dos cânceres em homens, sendo que em 2010 foram diagnosticados 1250 novos casos de câncer de pênis e foram registrados 310 óbitos devido à doença (Surveillance Research Program of the National Cancer Institute-SEER 2011). No entanto, em países em desenvolvimento, como Paraguai, Índia e Uganda, o carcinoma de pênis é uma doença comum, chegando mesmo a ser considerado um problema de saúde pública. Nessas regiões esses tumores são responsáveis por até 20% dos casos de câncer em homens e as taxas de incidência podem chegar a 19/100.000 habitantes (HEGARTY et al. 2006; NOVARA et al. 2007; ORNELLAS et al. 2008). As menores taxas de incidência são observadas em Israel, de aproximadamente 0,1/100.000 (POW-SANG et al. 2010).

No Brasil, o câncer de pênis corresponde a aproximadamente 2% dos tumores em homens e as taxas de incidência são de 2,9 a 6,8/100.000 habitantes, conferindo grande importância para o seu estudo. A incidência é maior nos estados das regiões Norte e Nordeste, onde são detectadas as piores condições socioeconômicas, e que concentram mais da metade das neoplasias malignas do pênis (FAVORITO et al.

2008; Ministério da Saúde 2009). No ano de 2009, foram registrados no país 4637 novos casos de câncer de pênis e os últimos dados referentes ao número de óbitos em consequência da neoplasia indicam que, em 2007, morreram 295 homens (Ministério da Saúde 2009).

O carcinoma de pênis ocorre principalmente entre a quinta e a sétima décadas de vida. Trata-se de um tumor infrequente em adultos na faixa etária dos 30 anos e é raramente descrito na infância (POW-SANG et al. 2010). No Brasil, a incidência é maior a partir dos 46 anos de idade (FAVORITO et al. 2008). Porém, a condição de doença que acomete homens em idade mais avançada está ameaçada, uma vez que um quarto dos casos são de pacientes com menos de 50 anos (SALVIONI et al. 2009).

A etiologia dos tumores malignos do pênis é pouco conhecida, porém alguns fatores já foram associados com maior risco para desenvolvimento da neoplasia, tais como a fimose, não circuncisão, más condições de higiene, vários parceiros sexuais, infecção pelo HPV, verrugas genitais ou outros antecedentes venéreos, lesões e inflamações crônicas, e o tabagismo (BLEEKER et al. 2009; SALVIONI et al. 2009; MINHAS et al. 2010).

A fimose, bastante frequente em pacientes com câncer de pênis, leva ao acúmulo de esmegma (composto por produtos urinários e células epidérmicas da descamação natural) na região peniana devido à má higienização. A retenção do esmegma pode acarretar irritação crônica e inflamação da glândula, que por sua vez criam uma condição propícia ao desenvolvimento de neoplasias. Por essa razão a circuncisão pode estar associada à redução do risco para desenvolvimento do câncer de pênis, uma vez que permite melhor higienização da glândula e também reduz a

incidência de lesões e inflamações nessa área (DILLNER et al. 2000; BLEEKER et al. 2009). A postectomia quando realizada ao nascimento é mais eficaz na proteção ao desenvolvimento de carcinomas penianos, do que quando é realizada mais tardiamente. Tal fato é corroborado pela incidência praticamente nula desses tumores em populações que realizam esse procedimento em recém-nascidos, por motivos religiosos ou culturais. A frequência de câncer de pênis é maior em homens não postectomizados na infância, com risco relativo 1,5 vezes maior quando comparados a indivíduos do grupo controle (DALING et al. 2005). No entanto, somente a circuncisão não explica a baixa taxa de incidência observada na Dinamarca, país onde não é comum a realização desse procedimento. As taxas de incidência do câncer de pênis variam ao redor do mundo de acordo com a associação entre a realização da circuncisão e os hábitos de higiene, em Israel a incidência é de 0,1/100.000 habitantes; na Dinamarca é de 1/100.000 habitantes, e isso se deve aos hábitos de higiene adequados; e no Paraguai, onde não existe o hábito da postectomia e os hábitos de higiene são precários, a incidência é de 4,2/100.000 (SCHOEN et al. 2000).

A maior incidência de câncer de pênis em pacientes não postectomizados também se deve ao fato de que esses indivíduos, além de desenvolverem fimose, apresentam risco aumentado para aquisição de infecção pelo papiloma vírus humano (HPV – *human papillomavirus*) e persistência desta. O HPV é um vírus oncogênico, cujo papel na progressão tumoral já é bem estabelecido nos carcinomas de colo de útero, no entanto pouco se sabe a respeito do seu papel na progressão do tumores penianos. Diversos estudos que avaliaram a presença de infecção pelo HPV em câncer de pênis chegaram a resultados bastante controversos, tanto a respeito da

incidência da infecção quanto do papel desta na tumorigênese e prognóstico (RUBIN et al. 2001; SCHEINER et al. 2008). A ocorrência da infecção viral parece ser mais frequente em pacientes não postectomizados devido a características histológicas do pênis. O corpo do pênis, assim como a superfície externa do prepúcio, apresentam ceratinização. Já a mucosa interna do prepúcio, não ceratinizada, é mais vulnerável à infecção (CASTELLSAGUÉ et al. 2002).

A detecção do DNA do HPV já foi descrita em 14,6% a 81,5% dos tumores (BACKES et al. 2009). Os HPVs de alto risco, principalmente os tipos 16 e 18, são os mais frequentemente encontrados nos tumores de pênis. O HPV 16 pode ser encontrado em até 79% dos casos com infecção viral (BEZERRA et al. 2001b; RUBIN et al. 2001; PROWSE et al. 2008; KRUSTRUP et al. 2009). Apesar da prevalência da infecção pelo HPV ser considerável, o valor prognóstico da presença do vírus nos tumores de pênis é controverso. Existem estudos relatando que a presença do vírus nos tumores não acarreta qualquer alteração no prognóstico dos pacientes (BEZERRA et al. 2001a; RUBIN et al. 2001; SCHEINER et al. 2008). No entanto, outro estudo sugere que a detecção do HPV parece estar associada a tumores com crescimento mais agressivo e de alto grau histológico (GREGOIRE et al. 1995). Resultados que contrariam o estudo anterior foram verificados por LONT et al. (2006), que observaram que os pacientes com infecção pelos HPVs de alto risco apresentaram maior sobrevida câncer específica em 5 anos do que aqueles do grupo negativo. O mesmo fato foi observado por um estudo que avaliou a presença do HPV em amostras de pacientes brasileiros (SCHEINER et al. 2008). No estudo de BEZERRA et al. (2001b), que investigaram a infecção pelo HPV em pacientes brasileiros, a positividade para o HPV só esteve associada com menor risco para

embolização linfática, não sendo observadas associações com outras variáveis de prognóstico.

Apenas dois achados parecem ser consenso nos diversos estudos que avaliaram a frequência de tumores com infecção pelo HPV, a prevalência dos subtipos virais e a distribuição da infecção de acordo com o tipo histológico. O HPV 16 é o mais frequentemente encontrado nos carcinomas penianos, podendo ser encontrado em 25% a 87% das lesões nas quais foi detectado DNA viral. Os subtipos histológicos basalóide e condilomatoso são os que apresentam as maiores taxas de infecção pelo HPV e nos carcinomas verrucosos é rara a presença do vírus (CHAN et al. 1994; RUBIN et al. 2001; BACKES et al. 2009; KRUSTRUP et al. 2009; MIRALLES-GURI et al. 2009).

A maior parte das neoplasias malignas do pênis é constituída por carcinomas epidermóides (CE) que representam aproximadamente 95% dos casos. Estes são derivados do epitélio escamoso tanto da glândula como do sulco coronal e prepúcio. O carcinoma de pênis geralmente se inicia como uma lesão em glândula que, se não tratada, pode se estender para o prepúcio e o corpo, invadindo corpos cavernosos, corpo esponjoso e uretra e chegando à autoamputação. O tamanho médio dos tumores de pênis varia de 3 a 4 cm e macroscopicamente formam massas esbranquiçadas e irregulares. Existem 3 padrões de crescimento: superficial (crescimento horizontal), invasivo (crescimento vertical) e multicêntrico (LOPES et al. 1996; GUIMARÃES et al. 2006; POW-SANG et al. 2010).

Os CEs de pênis ainda são divididos em diversos subtipos histológicos. Dentre as variantes mais frequentes estão o tipo usual, verrucoso, condilomatoso, papilífero e basalóide. Outras variantes mais raras são o sarcomatóide,

adenocarcinoma e acantolítico. Em uma revisão recente, CHAUX et al. (2010) descreveram brevemente os todos os subtipos histológicos de carcinomas penianos.

Os CEs usuais são o subtipo histológico mais comum, representam 48% a 65% das neoplasias penianas. Macroscopicamente, apresenta-se como uma lesão esbranquiçada que pode ser exofítica, de crescimento horizontal ou ulcerada. Recidivas são observadas em 28% dos pacientes e metástase linfonodais são detectadas em 28% a 39% dos casos. Aproximadamente 20% a 38% dos pacientes morrem em decorrência da doença e taxa de sobrevida em 10 anos é de 78%. O carcinoma verrucoso responde por 3% a 8% dos casos. Seu crescimento é lento e agressivo, porém local com raros relatos de metástases inguinais e mortalidade praticamente nula. O grau de diferenciação é alto e raramente apresenta infecção pelo HPV. Os carcinomas condilomatosos são geralmente pouco diferenciados e de crescimento lento. Frequentemente estão associados a infecções pelo HPV (20% a 100% dos casos). Apresenta crescimento papilomatoso e geralmente invade corpos cavernosos e esponjoso. O comprometimento linfonodal é observado em 18% dos casos e recidivas locais acometem 10% dos pacientes. A mortalidade associada a doença varia de 0% a 9%. Os tumores papilíferos correspondem a 5% a 15% dos carcinomas de pênis. Tratam-se de lesões exofíticas extensas e, microscopicamente, com frente irregular e infiltrativo e baixo grau de diferenciação. Lesões pré-neoplásicas, como a neoplasia intraepitelial e o líquen escleroso, estão frequentemente associadas a essa variante. As taxas de recidiva, metástase linfonodal e mortalidade são baixas, em torno de 10%. O tipo basalóide é um tumor agressivo associado a infecção pelo HPV em até 80% dos casos. Representa entre 4% a 10% dos CEs de pênis. Assim como o subtipo condilomatoso, costuma invadir corpos

cavernosos e esponjoso, porém apresenta-se como uma lesão ulcerada e preferencialmente na glândula. As taxas de recidiva e metástases linfonodais são elevadas em torno de 30% e 50% a 100% dos casos, respectivamente. Aproximadamente um terço dos pacientes morrem devido a metástases a distância (CHAUX et al. 2010).

O câncer de pênis apresenta uma tendência frequente para disseminação linfática, acometendo inicialmente os linfonodos regionais da região inguinal superficial e profunda e, em seguida, atingindo os linfonodos pélvicos ou ilíacos. Se as metástases não forem tratadas, pode ocorrer ulceração na pele ou invasão dos vasos femorais em decorrência do seu crescimento. As metástases a distância são raras e são eventos tardios na história natural do câncer de pênis, sendo observadas em apenas 1% a 10% dos casos (NOVARA et al. 2007; POW-SANG et al. 2010).

As abordagens empregadas no tratamento do tumor primário dependem da extensão da doença e tem como objetivos a melhora da sobrevida, preservação do órgão e redução da ocorrência de morbidades (SYED et al. 2003). Tumores em estágio inicial e de crescimento superficial podem ser tratados através de procedimentos mais conservadores que envolvem ressecção cirúrgica da lesão, radioterapia ou laser. Nos casos avançados, a penectomia parcial ou total ainda se fazem necessárias, acompanhadas de linfadenectomia (LONT et al. 2006; SALVIONI et al. 2009).

O principal fator clínico para determinação do prognóstico para os pacientes com câncer de pênis é o comprometimento linfonodal. A presença de metástases linfonodais está associada a pior prognóstico para os pacientes com câncer de pênis, levando a redução considerável da sobrevida câncer específica em 5 anos. Pacientes

com linfonodos palpáveis ao diagnóstico apresentam taxas de sobrevida entre 38% a 52%, enquanto que pacientes negativos ao exame clínico apresentam taxas mais elevadas de 70% a 93% (HORENBLAS et al. 1993; KAMAT et al. 1993; KULKARNI et al. 1994; LOPES et al. 1996; VILLAVICENCIO et al. 1997; BEZERRA et al. 2001a). Aproximadamente 28% a 64% dos pacientes apresentam linfonodos palpáveis no momento do diagnóstico do tumor primário. No entanto, somente em 47% a 85% é diagnosticada presença de metástase linfonodal ao exame patológico, provavelmente no restante dos pacientes a linfonodomegalia é consequência de processos inflamatórios decorrentes das infecções associadas ao tumor. Pacientes sem linfonodos palpáveis no momento do diagnóstico, podem apresentar micrometástases que só são detectadas após linfadenectomia e exame patológico. A taxa de ocorrência de micrometástases é de 12% a 24%. A extensão do comprometimento linfonodal para a região pélvica, ocorre em 22% a 56% dos pacientes. (FICARRA et al. 2005).

Um dilema no tratamento do câncer de pênis é qual conduta adotar nos casos sem linfonodos palpáveis. Até o momento o único método capaz de determinar com precisão a presença ou ausência de células tumorais nos linfonodos é a linfadenectomia inguinal (BHAGAT et al. 2010). A linfadenectomia profilática confere maiores taxas de cura, como demonstrado por ORNELLAS et al. (2008) que avaliaram a sobrevida câncer específica em 10 anos de pacientes submetidos ao esvaziamento inguinal profilático e tardio (realizado somente no momento do diagnóstico de linfonodos palpáveis) e observaram que a medida profilática aumentou a sobrevida de 30% para 70%. No entanto, é uma abordagem de tratamento invasiva e associada a diversas e frequentes morbidades. Metade dos

pacientes submetidos ao esvaziamento inguinal desenvolve complicações, que podem ser infecção da ferida (3% a 70%), necrose (2,5% a 64%), deiscência (38% a 61%), linfocele (2,7% a 87%), linfedema (5% a 100%); trombose (6% a 9%). Também não pode ser descartada a pequena taxa de mortalidade de aproximadamente 3% associada às complicações do procedimento cirúrgico. Devido a todas as morbidades associadas à linfadenectomia, essa não é a abordagem de tratamento empregada para todos os pacientes clinicamente sem comprometimento linfonodal, uma vez que 70% a 90% desses pacientes receberão tratamento desnecessário. (HORENBLAS et al. 2001; FICARRA et al. 2005; HEYNS et al. 2010).

Diversos estudos já foram realizados na tentativa de identificar quais fatores clínicos e anatomopatológicos podem ser empregados para prever o risco de acometimento linfonodal nos pacientes com CE de pênis, na tentativa de determinar quais pacientes se beneficiariam da linfadenectomia profilática. BHAGAT et al. (2010) avaliaram dois grupos de pacientes com CE de pênis, aqueles que foram submetidos a linfadenectomia e os que não foram submetidos. Observaram que pacientes com invasão linfática apresentam maior risco para o desenvolvimento de metástases linfonodais, corroborando os dados de LOPES et al. (1996), que também descreveram a espessura do tumor maior que 5 milímetros como fator de risco para metástase linfonodal. Além da invasão linfática, fatores como estadió do tumor e mais do que 50% das células tumorais pouco diferenciadas também conferem maior risco para comprometimento linfonodal (FRALEY et al. 1989; SLATON et al 2001; FICARRA et al. 2005). A invasão perieneural também foi descrita por VELAZQUEZ et al. (2008) como um importante fator preditivo de

comprometimento linfonodal para as neoplasias malignas de pênis. Em 2006, GUIMARAES et al. observaram que o padrão de invasão do tumor primário está associado com o risco de metástases linfonodais, sendo que pacientes com padrão infiltrante apresentam risco 4,18 vezes maior de metástases do que pacientes com tumores exofíticos.

Contudo, os fatores clínicos e anatomopatológicos ainda são imprecisos na determinação do prognóstico dos pacientes com CE de pênis. Por essa razão, vários estudos têm sido realizados com o intuito de identificar marcadores moleculares de prognóstico para esse tipo tumoral. No entanto, a maior parte dos estudos que buscam elucidar os mecanismos moleculares envolvidos na tumorigênese dos carcinomas penianos baseiam-se na avaliação dos níveis de expressão proteicos através da técnica de imunistoquímica.

O primeiro estudo que buscou a identificação de marcadores moleculares para o CE de pênis, demonstrou que a imunorreatividade da proteína p53, presente em 41,5% das amostras, estava associada com risco quase 5 vezes maior de desenvolvimento de metástases linfonodais e com redução significativa da probabilidade de sobrevida em 5 e em 10 anos (LOPES et al. 2002). MARTINS et al. (2002) e ZHU et al. (2007) também observaram que o aumento de expressão de p53 está associada com fatores de mau prognóstico, como invasão linfática e recidiva, e redução da sobrevida câncer específica.

O papel das metaloproteinases de matriz (MMPs), enzimas que degradam a matriz celular e que facilitam a migração e motilidade das células tumorais, também foi avaliado quanto ao seu papel na progressão dos tumores de pênis. Tumores bem diferenciados, com padrão exofíticos e que não invadem os corpos cavernosos

raramente mostram níveis elevados de MMPs. Por outro lado, tumores pouco diferenciados, com padrão invasivo, podendo atingir os corpos cavernosos, expressam níveis maiores de MMPs. Ou seja, a ativação das MMP-2 e MMP-9 pode estar associada a tumores localmente mais agressivos. SOARES et al. (2006) também observaram que o padrão de expressão da MMP-9 se altera de acordo com a progressão tumoral. No epitélio normal e na hiperplasia sem atipia, a expressão de MMP-9 se restringe às células da camada basal. Com a evolução da malignidade da lesão a expressão atinge células mais superficiais, sugerindo que a degradação da membrana basal só ocorre quando o epitélio é totalmente substituído por células neoplásicas e capazes de expressar MMPs. A expressão da MMP-2 também tem seu padrão de expressão de acordo com o aumento da malignidade. A MMP-2 é uma protease secretada. Porém, foi observada na membrana celular de lesões displásicas e bem diferenciadas. Com a evolução da lesão, associada à expressão em membrana, houve expressão citoplasmática. Esse fenômeno pode indicar o processo através do qual se dá a ativação da enzima. A expressão de MMP-9 também está associada com maior risco para ocorrência de recidivas (CAMPOS et al. 2006).

Os marcadores de proliferação celular PCNA e Ki-67 foram avaliados por GUIMARÃES et al. (2007), que observaram que a expressão positiva das duas proteínas é fator independente para risco de desenvolvimento de metástases linfonodais. No entanto, ZHU et al. (2007) não encontram associação significativa entre a expressão de Ki-67 e o comprometimento de linfonodos.

Em um estudo mais recente, os autores buscaram estabelecer um perfil de expressão capaz de determinar o risco para desenvolvimento de metástases linfonodais, através da técnica de microarranjos de RNA. No entanto, não foi

possível identificar classificadores para predição do prognóstico em CE de pênis (KROON et al. 2008).

Até o momento, a literatura a respeito dos aspectos moleculares do CE de pênis é escassa. Inclusive marcadores frequentemente alterados e amplamente estudados em CEs de outros sítios anatômicos foram pouco avaliados nas neoplasias de pênis. Pouco se sabe a respeito dos mecanismos biológicos envolvidos na tumorigênese desse tipo tumoral. Ainda se fazem necessários mais estudos visando a identificação de marcadores moleculares de prognóstico, uma vez que as variáveis clínicas e anatomopatológicas empregadas na determinação do prognóstico são imprecisas e não permitem o delineamento adequado do tratamento dos pacientes, que muitas vezes são submetidos a procedimentos desnecessários e associados a muitas morbidades.

1.2 A METILAÇÃO DO DNA

O processo de tumorigênese é constituído por múltiplos passos, durante os quais ocorrem ou se acumulam várias alterações genéticas (mutações pontuais, perda de heterozigose, deleções, inserções, aneuploidia, amplificação gênica, entre outras) e alterações epigenéticas. Os eventos epigenéticos são eventos herdáveis durante a divisão celular e que acarretam alteração do fenótipo sem alterações na sequência do DNA, interferindo no perfil de expressão gênica (EGGER et al. 2004; FEINBERG e TYCKO 2004).

A metilação é um processo biológico que ocorre após a síntese de DNA e que consiste na adição covalente de um radical metil (CH_3), a partir do doador S-

adenosilmetionina, ao carbono 5 das bases nitrogenadas citosinas (C) localizadas a 5' das guaninas (G), formando uma nova base nitrogenada: a 5-metilcitosina (Figura 1) (JONES e LAIRD 1999; PLASS 2002; LAIRD 2003). A reação é catalisada por uma família de enzimas chamadas DNA metil-transferases (DNMT): DNMT1, DNMT3a e DNMT3b. A DNMT1 é responsável pela manutenção da metilação. Essa enzima é transportada para a forquilha de replicação do DNA onde catalisa a reação de adição de radicais metil aos sítios hemimetilados na fita de DNA recém-sintetizada. As DNMT3a e DNMT3b são responsáveis pela adição de novos radicais metil ao DNA, processo conhecido como metilação *de novo* (PLASS 2002; WORM e GULDBERG 2002; LAIRD 2003).

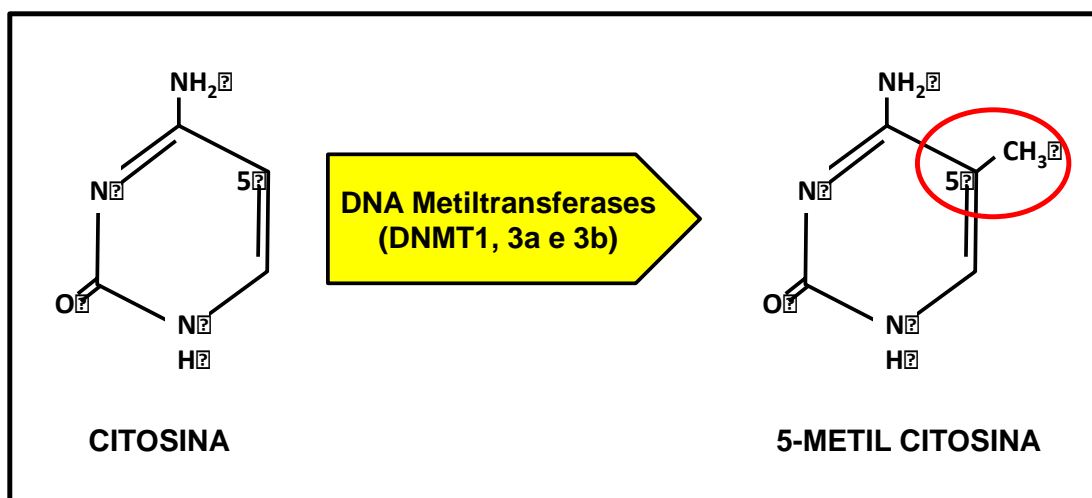


Figura 1 - Reação de adição de radical metil (CH₃) à base nitrogenada citosina. Essa reação é catalisada pelas DNA metiltransferases (DNMT1, 3a e 3b).

Os principais alvos da metilação em humanos são os dinucleotídeos CpG. Esse dinucleotídeo apresenta uma baixa frequência no genoma talvez devido a alta taxa de mutação da 5-metilcitosina para timina, o que, ao longo da evolução, teria

ocasionado a redução dos dinucleotídeos CpG do genoma (WORM e GULDBERG 2002; LAIRD 2003). No entanto, existem determinadas regiões do genoma que apresentam uma alta concentração de dinucleotídeos CpG, as chamadas ilhas de CpG. Estas regiões, que representam aproximadamente 1 a 2% do genoma, têm pelo menos 500 pares de base de extensão e um conteúdo de G+C de pelo menos 55%. Aproximadamente 50 a 60% dos genes possuem ilhas de CpG em suas regiões promotoras (GARDINER-GARDEN e FROMMER 1987; TAKAI e JONES 2002).

A metilação tem um importante papel no desenvolvimento, no silenciamento de elementos repetitivos, na proteção contra seqüências virais, na repressão transcricional de determinados genes, no *imprinting* genômico e na inativação de um cromossomo X nas mulheres (LAIRD 2003; EGGER et al. 2004; ROBERTSON 2005). O *imprinting* genômico é a modificação epigenética de um dos alelos parentais nos gametas ou no zigoto e que acarreta expressão diferencial do alelo silenciado. Através do *imprinting* genômico apenas um dos dois alelos parentais é expresso, enquanto o outro gene é mantido silenciado. A função desse mecanismo ainda não foi completamente elucidada mas existe uma hipótese segundo a qual o *imprinting* ocorre para balancear as necessidades intra-uterinas do feto e a saúde da mãe. A inativação de um cromossomo X nas mulheres ocorre durante a embriogênese com a finalidade de garantir a síntese de proteínas em quantidades equivalentes em homens e mulheres (COSTELLO e PLASS 2001; LAIRD 2003; ISSA 2004; ROBERTSON 2005).

Em células tumorais as ilhas de CpG presentes nos promotores de genes supressores de tumor são os principais alvos da chamada metilação aberrante ou hipermetilação (JONES e LAIRD 1999; EGGER et al. 2004; ROBERTSON 2005).

A presença de metilação nessas regiões está associada à supressão da expressão gênica (BIRD 1984; SIDRANSKY 2002; BAYLIN e OHM 2006), uma vez que esse evento inibe a transcrição gênica de maneira direta, pela inibição da ligação dos fatores de transcrição aos seus sítios (Figura 2A), ou indireta, através da ligação de complexos de proteínas com domínios de ligação ao DNA metilado, as *metil CpG-binding domain proteins* (MBDs), que têm maior afinidade pelo DNA metilado e competem com os fatores de transcrição pelos sítios de ligação presentes no DNA (Figura 2B). Além disso, o silenciamento pode ser consequência da ocorrência concomitante da metilação do DNA e da deacetilação de histonas, resultando na alteração da conformação da cromatina para um estado transcricionalmente menos ativo (Figura 3). Acredita-se que complexos protéicos com afinidade pelas MBDs também se liguem ao DNA, dentre essas proteínas estão as histonas deacetilases (JONES e LAIRD 1999; ROBERTSON e JONES 2000; BAYLIN et al. 2001; JONES e BAYLIN 2002; PLASS 2002; SIDRANSKY 2002; WORM e GULDBERG 2002; ROBERTSON 2005). As enzimas histona deacetilases deacetilam resíduos de lisina na porção N (amino)-terminal das histonas, aumentando sua positividade e sua avidéz por DNA ou por outras histonas, tornando a cromatina mais condensada (TYCKO 2000; COSTELLO e PLASS 2001; PLASS 2002).

Devido ao seu papel no silenciamento de genes com atividade supressora de tumor, a metilação tem sido considerada como uma via alternativa de inativação gênica às mutações e perdas cromossômicas (perda de heterozigose e deleções) na hipótese de Knudson, segundo a qual seriam necessários dois eventos para que ocorresse a inativação de genes supressores tumorais. A metilação pode inativar ambos os alelos, no caso dos cânceres esporádicos, ou um dos alelos no caso dos

tumores hereditários (JONES e LAIRD 1999; COSTELLO e PLASS 2001; JONES e BAYLIN 2002; EGGER et al. 2004; BAYLIN e OHM 2006).

Nos tumores, os genes mais frequentemente metilados são aqueles com atividade supressora tumoral, principalmente, aqueles envolvidos no controle do ciclo celular; no reparo do DNA; na apoptose; na diferenciação celular; na invasão, metástase e angiogênese; na resistência a drogas; e nas vias de metabolização de carcinógenos (COSTELLO e PLASS 2001; ROBERTSON 2005).

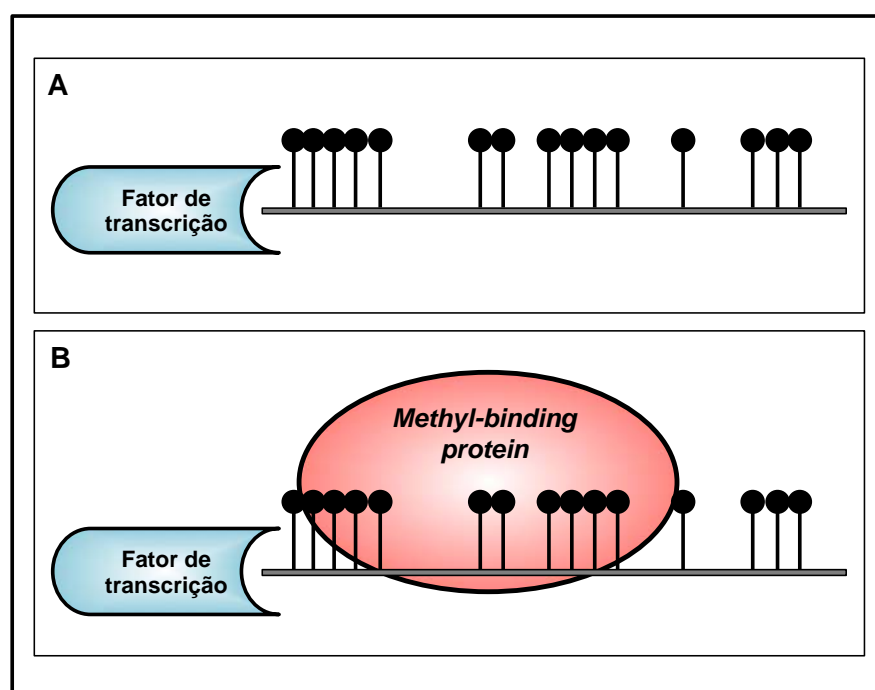


Figura 2 - Silenciamento gênico induzido pela metilação. A figura ilustra duas hipóteses aceitas para a inativação da transcrição via metilação. A inibição da transcrição pode ocorrer de maneira direta (A), na qual a própria presença dos radicais metil no DNA impediria a ligação do complexo de transcrição; de maneira indireta (B), a ligação das *methyl-binding proteins* ao DNA metilado não permitiria que o complexo de transcrição tenha acesso aos seus sítios de ligação no DNA.

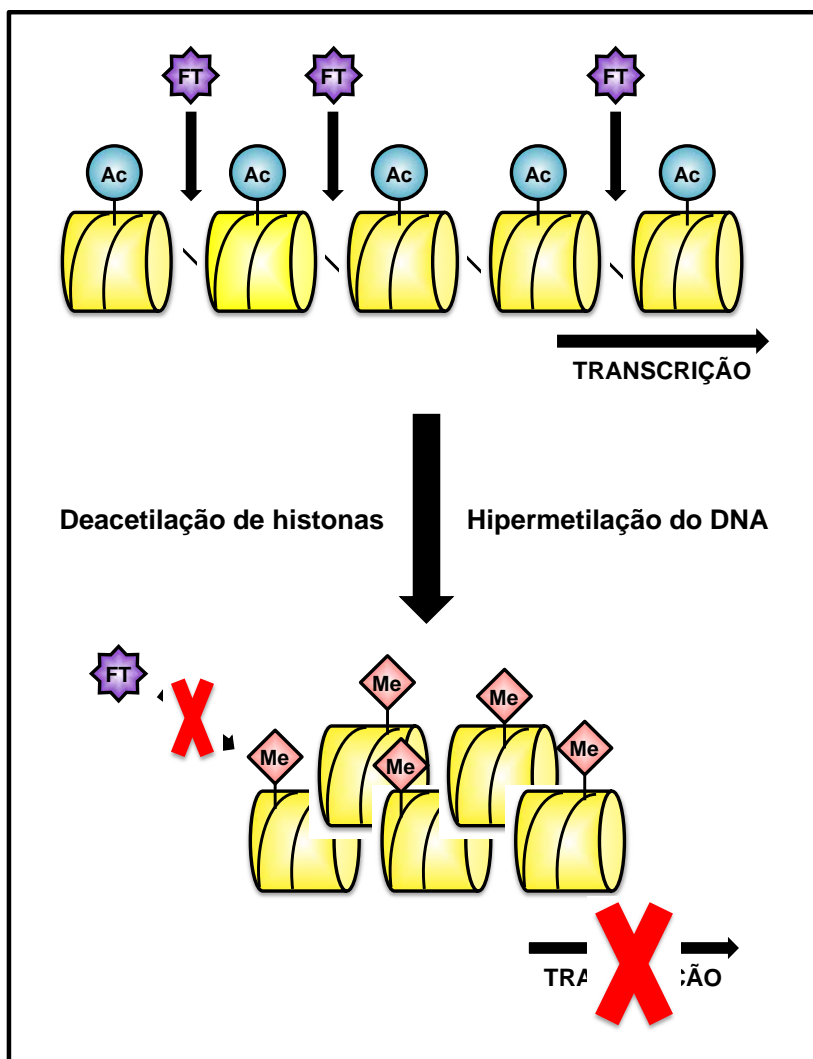


Figura 3 – Hipótese do silenciamento gênico induzido através da alteração da conformação da cromatina. Os processos de deacetilação de histonas e a metilação do DNA ocorrem concomitantemente, acarretando maior condensação da cromatina impedindo que os fatores de transcrição reconheçam seus sítios de ligação ao DNA. Em situações normais o DNA encontra-se acetilado e desmetilado e, portanto, menos condensado de forma que os sítios de ligação dos fatores de transcrição estão expostos, permitindo que a transcrição ocorra. FT – fatores de transcrição; Ac – radical acetil; Me – radical metil.

O padrão de hipermetilação de determinados promotores gênicos tem sido avaliado quanto a sua utilidade como marcador tumoral na tentativa de diferenciar os tipos tumorais, determinar o risco para o desenvolvimento do câncer, diagnosticar precocemente tumores, delinear o prognóstico dos pacientes e prever a resposta ao tratamento (BAYLIN e OHM 2006). Nesse contexto a hipermetilação de promotores

gênicos pode ser empregada na prática clínica auxiliando na detecção e na determinação do risco para o desenvolvimento de tumores malignos, uma vez que a metilação já foi descrita em neoplasias em estágios precoces; e na estratificação dos diferentes tipos tumorais, através da determinação do perfil molecular das lesões (LAIRD 2003; BAYLIN e OHM 2006).

Estudos têm demonstrado que a utilização da hipermetilação como marcador tumoral apresenta resultados mais satisfatórios quando avaliados diferentes grupos de genes para cada tipo tumoral. Isso porque algumas ilhas de CpG são preferencialmente metiladas em determinados tipos tumorais. A combinação de diversos marcadores fornece resultados com maior acurácia quando avaliados os parâmetros clínicos uma vez que, de acordo com o perfil de genes hipermetilados, é possível determinar o comportamento biológico do tumor e a evolução do paciente (BAYLIN et al. 2001; COSTELLO e PLASS 2001; SIDRANSKY 2002; ISSA 2004). Com isso é possível criar marcadores para classificar os tumores, sendo que para isso a metilação não precisa estar, obrigatoriamente, associada ao silenciamento do gene (USHIJIMA 2005).

As alterações epigenéticas estão presentes nos estágios pré-malignos e precoces dos tumores, induzindo a expansão das células malignas. Nas fases mais precoces dos tumores colorretais foi possível detectar a presença de hipermetilação, que poderia estar conferindo vantagens para a ocorrência de alterações genéticas e para a progressão desses clones celulares. Dessa forma, a detecção da metilação aberrante em células normais pode permitir a determinação do risco para o desenvolvimento de neoplasias (USHIJIMA 2005; BAYLIN e OHM 2006).

1.3 O CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE PÊNIS E A HIPERMETILAÇÃO DO DNA

Os estudos com o objetivo de analisar o valor do padrão de hipermetilação do DNA em amostras de câncer de pênis e seu possível papel para determinação do prognóstico dos pacientes são escassos, apesar de diversos genes já terem sido avaliados (Quadro 1).

Em 2003, FERREUX et al. (2003) avaliaram os mecanismos moleculares envolvidos na inativação da via *CDKN2A/CCND/Rb* em 53 amostras de carcinomas penianos. A presença de infecção pelo HPV, a hipermetilação do gene *CDKN2A* e o aumento de expressão da proteína BMI-1 parecem ser os três mecanismos responsáveis pelo desbalanço da via nos pacientes com neoplasias malignas do pênis. A infecção pelo HPV foi detectada em 38% (20) das amostras, dentre as quais 65% apresentaram aumento de expressão de p16, sugerindo que a inativação de pRb pela proteína E7 do vírus resulta na regulação positiva de p16. A hipermetilação do gene *CDKN2A* foi observada em apenas 17% dos casos (9), com perda de expressão da proteína em 8 casos. A ausência de hipermetilação foi mais frequente nos casos com aumento de expressão da proteína BMI-1, descrita em 10% (5) dos casos, que faz parte do complexo *polycomb* e regula negativamente p16. Segundo os autores, a identificação de alterações associadas a três diferentes mecanismos de controle de uma mesma via sugerem que o CE de pênis é uma doença heterogênea e sua etiologia pode ou não estar associada ao HPV.

Outro estudo que avaliou a hipermetilação do gene *CDKN2A* também avaliou a presença de mutações no gene. Foram selecionadas para o estudo três amostras de

câncer de pênis e duas amostras de líquen escleroso (lesão pré-maligna). Todas as neoplasias malignas apresentaram mutações no gene *CDKN2A* e ausência de hipermetilação. Nas amostras de líquen escleroso, não foram detectadas mutações e o perfil de hipermetilação não foi avaliado (SOUFIR et al 2007).

A hipermetilação de um painel amplo de genes foi avaliada por YANAGAWA et al. (2008), em 25 amostras provenientes de pacientes com CE de pênis. Foram avaliados pela reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*) específica para metilação (MSP – *methylation specific PCR*) os genes *DAPK*, *FHIT*, *MGMT*, *P14^{ARF}*, *CDKN2A*, *RAR β* , *RASSF1A* e *RUNX3*. Além do perfil de hipermetilação, foi avaliada também a presença de infecção pelo HPV. As frequências de hipermetilação foram: 28% para *DAPK*, 92% para *FHIT*, 20% para *MGMT*, 4% para *P14^{ARF}*, 24% para *CDKN2A*, 24% para *RAR β* , 12% para *RASSF1A* e 44% para *RUNX3*. A detecção do HPV foi positiva em 25% das amostras, sugerindo que a hipermetilação de *FHIT* pode ter um papel mais importante na patogênese dos tumores de pênis. Os autores também observaram que a metilação aberrante esteve associada com a perda de expressão da proteína Fhit em 87% dos casos. O estudo não relata qualquer avaliação estatística para verificar possíveis associações entre os achados moleculares e variáveis clínicas e anatomopatológicas.

No mesmo ano de 2008, GUERRERO et al. avaliaram o padrão de metilação dos genes *TSP-1* (*Trombospondin-1*), *RASSF1A* e *CDKN2A* e sua associação com fatores clínicos e anatomopatológicos dos CE de pênis. As amostras mostraram-se hipermetiladas para *TSP-1* em 46% dos casos, *RASSF1A* em 42% e *CDKN2A* em 38%, de um total de 24 amostras avaliadas. A hipermetilação de *TSP-1*, com perda de expressão da proteína, foi associada com grau histológico desfavorável, invasão

vascular e redução na sobrevida global. Tumores em estágio inicial (T1) foram associados com hipermetilação em *RASSF1A*, sugerindo que esse é um evento precoce na progressão dos CE de pênis. O único fator associado à hipermetilação de *CDKN2A* foi a perda de expressão da proteína através de ensaio de imunohistoquímica.

Em um estudo recente, POETSCH et al. (2011) avaliaram alterações no gene *CDKN2A* associados com o comportamento dos CEs de pênis. A hipermetilação desse gene foi detectada em 22 (42%) tumores. A presença de metilação aberrante em *CDKN2A* foi mais frequente nos casos que apresentaram perda de expressão da proteína p16, que foi avaliada por imunohistoquímica. Com relação às variáveis clínicas e anatomopatológicas, a hipermetilação foi mais frequente naqueles tumores com metástases linfonodais. Outras alterações como mutações e perda de heterozigose também foram pesquisadas nas mesmas amostras. A taxa de mutações foi relativamente baixa, no entanto em 62% dos casos foi observada perda de heterozigose que também se mostrou associada à ocorrência de metástases em linfonodos. Esses dados sugerem um importante papel de *CDKN2A* na progressão dos CEs de pênis.

Devido à escassez de estudos e ao pequeno número de casos de câncer de pênis avaliados na maioria dos estudos, ainda não foi possível estabelecer a hipermetilação de promotores gênicos como marcador molecular de prognóstico para os pacientes que desenvolveram essa neoplasia. Novos estudos abrangendo um número maior de pacientes são necessários para determinar se a metilação aberrante pode ser considerada uma alteração frequente nesses tumores e se tem algum papel importante para o prognóstico dos pacientes.

Quadro 1 – Genes e frequências de hipermetilação descritos pelo estudo realizados em amostras de pacientes com CE de pênis.

Estudo	Frequência de hipermetilação de acordo com o gene avaliado								
	<i>CDKN2A</i>	<i>DAPK</i>	<i>FHIT</i>	<i>MGMT</i>	<i>P14^{ARF}</i>	<i>RARβ</i>	<i>RASFA1</i>	<i>RUNX3</i>	<i>TSP1</i>
FERREUX et al. 2003 (n=53)	17%	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
SOUFIR et al. 2007 (n=3)	0%	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
YANAGAWA et al. 2008 (n=25)	24%	28%	92%	20%	4%	24%	12%	44%	NA
GUERRERO et al. 2008 (n=24)	38%	NA	NA	NA	NA	NA	42%	NA	46%
POETSCH et al. 2011 (n=52)	42%	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

NA – não avaliado

1.4 AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE HIPERMETILAÇÃO ATRAVÉS DA TÉCNICA DE PIROSSEQUENCIAMENTO

O sequenciamento através da abordagem do pirosequenciamento baseia-se no conhecimento que a cada nucleotídeo incorporado pela DNA polimerase é liberada uma molécula de pirofosfato (PPi). Após a amplificação da sequência de interesse, esta é submetida a uma reação catalisada por quatro enzimas: DNA polimerase, ATP sulfúrilase, luciferase e apirase. A DNA polimerase se liga ao fragmento alvo, já hibridado ao oligonucleotídeo iniciador, e inicia a incorporação dos nucleotídeos que são adicionados um a um durante a progressão da reação. O PPi liberado é convertido em ATP pela ATP sulfúrilase, usando como substrato a adenosina 5'-fosfosulfato. Essa reação produz a energia necessária para que a

luciferase oxida a luciferina, com emissão de luminescência. A luz gerada é captada pela câmera CCD do equipamento de pirosequenciamento. Os nucleotídeos em excesso são degradados pela apirase, antes da adição do próximo nucleotídeo da sequência. A dispensação dos nucleotídeos segue uma ordem pré-determinada e ela ocorre de maneira alternada entre os poços da placa de reação, evitando que os sinais luminescentes emitidos por uma amostra interfiram no momento da captação dos sinais da amostra adjacente. O sequência final é fornecida na forma de um pirograma, no qual cada pico tem altura proporcional al número de vezes que o nucleotídeo se repete (Figura 4) (DIGGLE e CLARKE 2004).

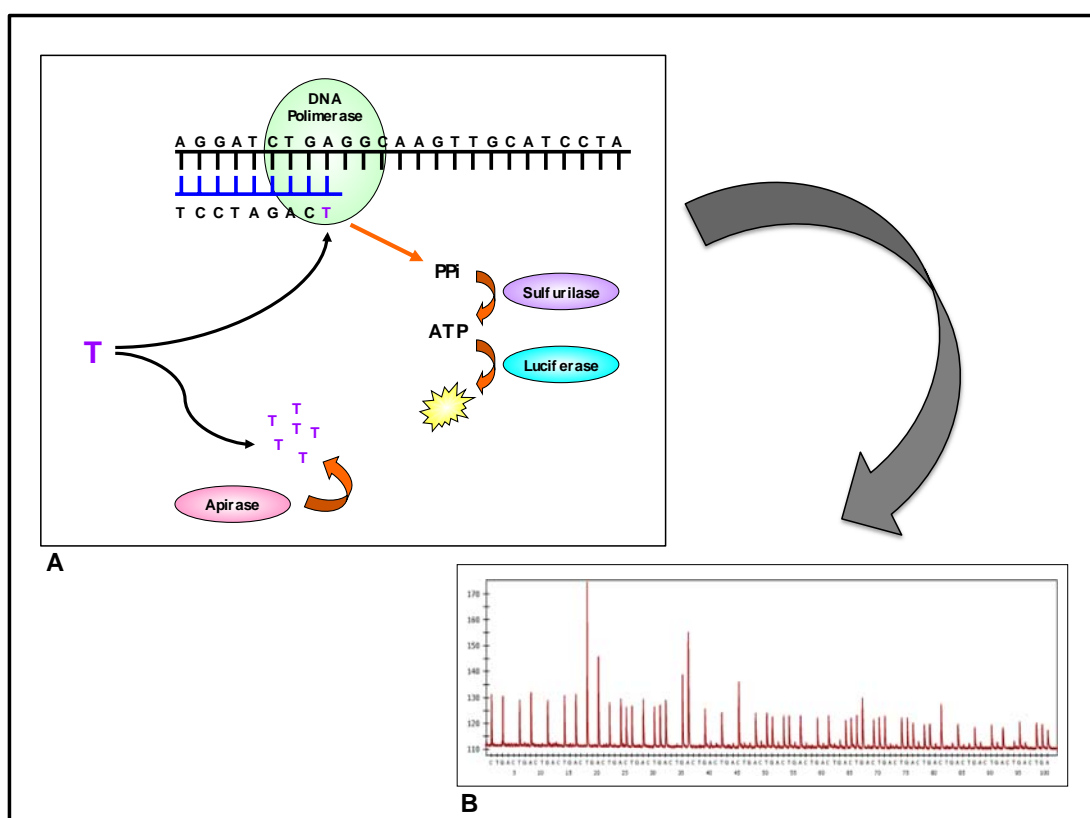


Figura 4 – Desenho esquemático da reação de pirosequenciamento. Na parte A, está esquematizada as reações enzimáticas envolvidas nas etapas de incorporação dos nucleotídeos, conversão do pirofosfato em luz e degradação de nucleotídeos excedentes. A parte B, representa o resultado final do sequenciamento fornecido na forma de um pirograma, no qual cada pico corresponde a um nucleotídeo e a altura é proporcional à repetição deste na sequência.

Diversas abordagens podem ser empregadas para a detecção da metilação aberrante dos genes supressores de tumor: reação em cadeia da polimerase específica para metilação (MSP – *methylation specific PCR*), sequenciamento pelo método de Sanger, restrição enzimática, MSP quantitativa. No entanto, a técnica de pirosequenciamento apresenta vantagens quando comparada às demais abordagens. A MSP é a técnica mais empregada para a análise de hipermetilação. É uma metodologia fácil, cujo resultado final é dado como a presença ou ausência de banda de amplificação no gel de eletroforese, não se tratando sendo portanto quantitativa. Além disso, o número e posição dos sítios CpG avaliados é limitado, pois os oligonucleotídeos empregados para a PCR são desenhados obrigatoriamente em ilhas de CpG (PASQUALI et al. 2007). O sequenciamento de DNA tratado com bissulfato de sódio através da técnica de Sanger permite uma análise bastante detalhada da metilação em diversos dinucleotídeos CpG, sem a limitação inerente à técnica anteriormente descrita. No entanto, é uma abordagem bastante laboriosa, demorada e dispendiosa, pois requer a clonagem das amostras a serem avaliadas e o sequenciamento de diversos clones (entre 10 e 15 colônias). Tal fato, dificulta seu emprego em estudos em larga escala que envolvam grande números de amostras e de genes a serem avaliados (TOST e GUT 2007). A análise de hipermetilação através do pirosequenciamento permite a avaliação dos diversos sítios CpG presentes no fragmento alvo sem se limitar àqueles presentes na sequência dos oligonucleotídeos, que nesse caso são desenhados em regiões sem os dinucleotídeos sujeitos a metilação. Trata-se também de uma técnica menos laboriosa, já que não requer clonagem e a amostra é sequenciada uma única vez. Outro fator que confere vantagem à técnica de pirosequenciamento é a possibilidade de inserir um controle

interno da reação, que nada mais é do que um controle para verificar a eficiência da conversão das citosinas não metiladas durante o tratamento com bissulfito de sódio. O controle interno consiste na avaliação de citosinas fora dos sítios CpG, que são inseridas na ordem de dispensação dos nucleotídeos logo após uma timina (sabidamente uma citosina antes da conversão). No pirograma, após o pico de timina espera-se encontrar uma linha plana, indicando a não incorporação da citosina e tratamento com bissulfito de sódio eficiente. O controle interno permite a exclusão de casos falso-positivo (PASQUALI et al. 2007; SHAW et al. 2008).

A técnica apresenta, no entanto, algumas desvantagens. A maior delas é o tamanho dos fragmentos que podem ser sequenciados. Enquanto que a técnica de Sanger permite a análise de CpGs em sequências de até 600 nucleotídeos, o pirosequenciamento se limita a fragmentos de no máximo 150 pares de base (TOST e GUT 2007).

1.5 O GENE *CDKN2A* E O CICLO CELULAR

O gene *CDKN2A* é um supressor tumoral, que apresenta-se mutado, deletado ou hipermetilado em uma grande variedade de neoplasias malignas. Codifica uma proteína (p16) cuja função é a regulação do ciclo celular através da inibição da hiperfosforilação de pRb, durante a fase G1 do ciclo celular (MEDEMA et al. 1995; MATSUDA 2008).

O ciclo celular é dividido em quatro fases: G1, S, G2 e M. As fases S e M são as etapas básicas da divisão celular, durante as quais ocorre a replicação do DNA e a formação das duas células-filhas (mitose), respectivamente. As fases G1 e G2 são

etapas conhecidas como os “pontos de checagem” (*checkpoint*) do ciclo celular. Nessas etapas são identificados e corrigidos possíveis erros ou danos ao DNA (CÁNEPA et al. 2007).

Durante a progressão do ciclo celular, as ciclinas do tipo D formam heterodímeros com as chamadas quinases dependentes de ciclinas (Cdks – *cyclin dependent kinases*), mais especificamente com as Cdk4 e Cdk6. Esse complexo é responsável pela hiperfosforilação da pRB e liberação dos fatores de transcrição da família E2F, levando à síntese de mRNA essenciais para o início da replicação do DNA celular, durante a fase S. Os fatores E2F garantem a manutenção de pRB em seu estado hiperfosforilado, através da indução da expressão da ciclina E que, ligada à Cdk2, mantém a pRb inativa e que por sua vez controla o ciclo celular inibindo a atividade das RNA polimerases I e III (FAHRAEUS et al. 1998).

Os complexos ciclina/cdk também são inativados por fosforilação pelas proteínas inibidoras de Cdks (CKIs). Essas proteínas são divididas em duas famílias: a família INK4, que se liga especificamente as Cdks 4 e 6; e a família Cip/Kip que inibem os complexos ciclina E/Cdk2, ciclina A/Cdk2 e ciclina B/Cdk1. A proteína codificada pelo gene *CDKN2A* é um membro da primeira família e se liga a Cdk4 ou Cdk6 competindo com as ciclinas D. A ligação de p16 às Cdks impede a hiperfosforilação de pRB e sem a liberação dos fatores E2F não há progressão do ciclo celular (Figura 5) (CÁNEPA et al. 2007).

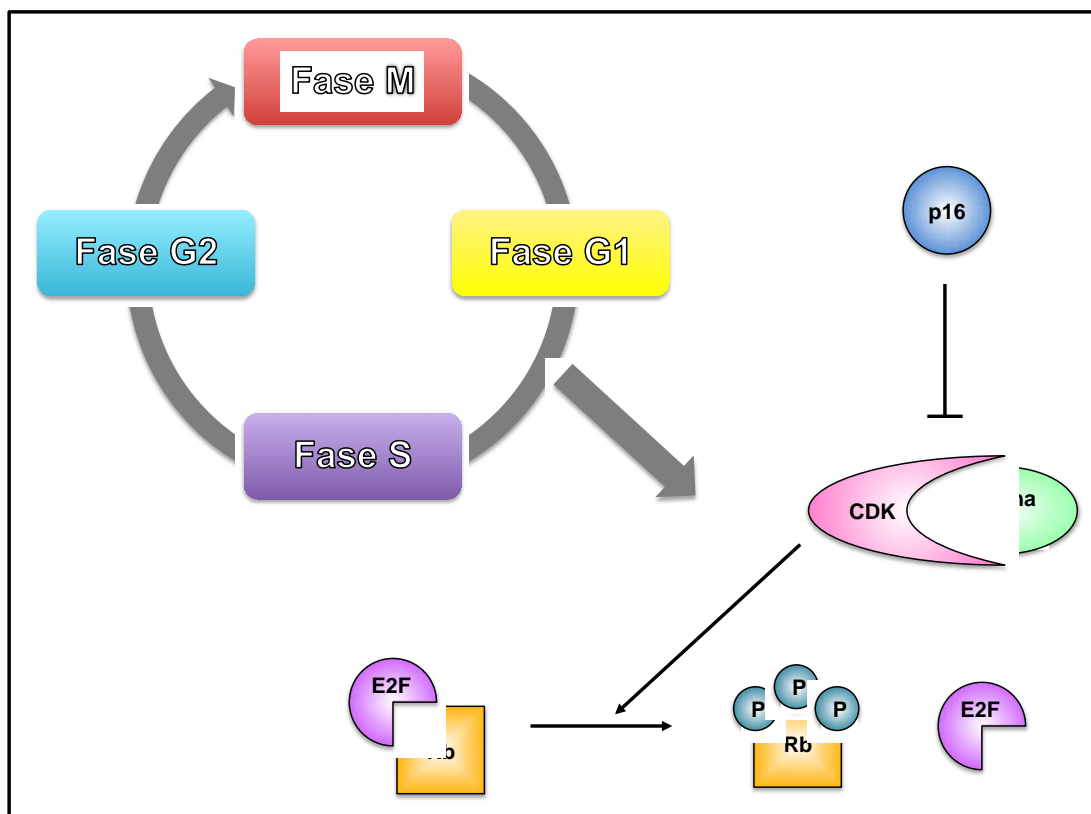


Figura 5 - Figura representativa do ciclo celular e o papel da proteína p16 durante a fase G1. A proteína p16 impede a formação do complexo ciclina D/CDK4 ou CDK6, inibindo dessa maneira a hiperfosforilação da proteína Rb e a liberação dos fatores de transcrição da família E2F. Sem a liberação dos fatores E2F não há transcrição de genes essenciais para a entrada da célula na fase S, ocorrendo a parada do ciclo celular.

O gene *CDKN2A* está localizado na região cromossômica 9p21. Esse locus apresenta-se deletado em diversos tipos tumorais. Além disso, a perda de p16 devido a mutações e deleções também é frequentemente relatada. Esse foi um dos primeiros genes cujo silenciamento foi associado à presença de metilação na região promotora (MERLO et al. 1995).

O silenciamento do gene *CDKN2A* devido à hipermetilação em seu promotor também está associado a alterações na conformação da cromatina. Isso se deve ao fato que a presença de citosinas metiladas na sequência do DNA ocorre em associação com a deacelilação das histonas, acarretando a condensação da cromatina

e impedindo a ligação dos fatores de transcrição aos seus sítios. Esse fenômeno foi descrito pela primeira vez em gliomas, quando COSTELLO et al. (1996) verificaram que mesmo na presença da hipermetilação parcial do gene *CDKN2A* ocorria redução nos níveis de mRNA e suspeitaram que outro mecanismo poderia estar envolvido na supressão da expressão. Abordagens para avaliar a estrutura da cromatina indicaram que na presença de hipermetilação, mesmo que parcial, a cromatina apresentava-se mais condensada.

A perda de expressão de *CDKN2A*, associada a hipermetilação, parece estar presente em praticamente todos os tipos tumorais, mas parece ser mais freqüente nos subtipos epidermóides (NUOVO et al. 1999). Além disso, é descrita como um evento precoce nos CEs das vias aerodigestivas superiores (AI et al. 2003). A avaliação da expressão do gene *CDKN2A* em amostras de CE de cabeça e pescoço mostra elevadas frequências de perda de expressão desse gene, em aproximadamente 59% a 83% dos casos (REED et al. 1996; MIRACCA et al. 1999).

1.6 O GENE *MGMT* E O REPARO A DANOS AO DNA

O gene *MGMT* (O^6 -metilguanina DNA metiltransferase) está localizado na região cromossômica 10q26 e codifica uma proteína de 207 aminoácidos, que atua no reparo a danos ao DNA (PEGG et al. 2007).

A proteína *MGMT* atua no processo de reparo a danos ao DNA removendo radicais alquila ou metil do oxigênio da posição 6 (O^6) de guaninas, restaurando a molécula de guanina sem causar quebra à fita de DNA, como observado no caso de outras vias de reparo, resultando na indução do processo de apoptose. A *MGMT*

participa do reparo ao DNA de uma maneira única, se comparada às demais proteínas de reparo. Ela atua sozinha, não em complexos ou com o auxílio de cofatores, como ocorre em outras vias de reparo. Após a remoção, os grupos alquila ou metil são transferidos para um resíduo de cisteína na sua própria estrutura, ou seja, a MGMT atua simultaneamente como transferase e acceptor de grupos alquila. Assim que a molécula de proteína se liga ao radical excisado, ela é ubiquitinada e degradada pelo proteasoma, sendo por essa razão considerada uma proteína suicida (ESTELLER 2000; ZUO et al. 2004; LIU e GERSON 2006). Outra característica do reparo mediado pela MGMT é que se trata de um processo estequiométrico, para cada radical alquila presente no DNA é necessária uma molécula de MGMT para sua remoção (Figura 6) (LIU e GERSON 2006).

A adição de radicais alquila ao O⁶ de guanina é uma importante fonte de mutações pois a O⁶-metil-guanina induz a DNA polimerase a cometer um erro no pareamento, pois a presença do radical metil altera as propriedades das pontes de hidrogênio e durante a replicação do DNA a O⁶-metilguanina parecia com timina e não com citosina, acarretando a troca de pares guanina-citosina por adenina-timina (Figura 6). Além disso, a O⁶-metil-guanina pode formar ligações cruzadas com citosinas da fita de DNA complementar, impedindo a replicação do DNA e acarretando a morte celular. Evitando a formação das ligações cruzadas entra as duas fitas, a proteína MGMT induz resistência às drogas alquilantes (TANO et al. 1990; ESTELLER e HERMAN 2004; LIU e GERSON 2006).

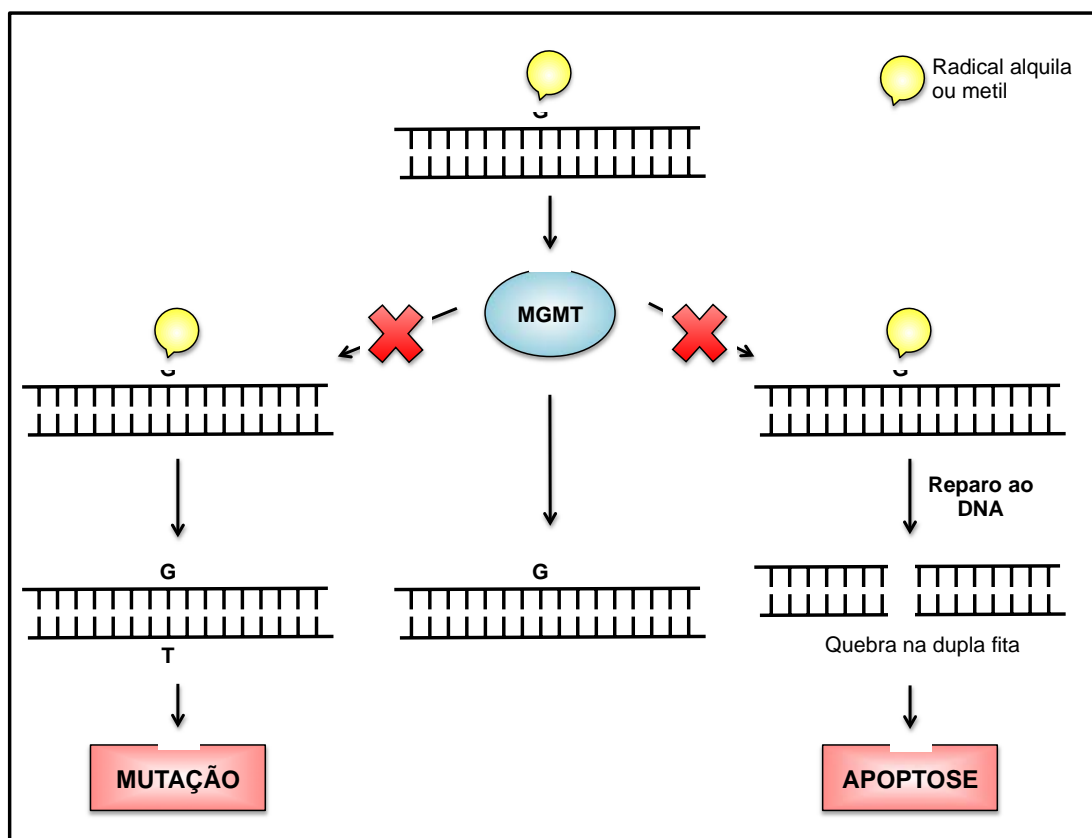


Figura 6 - Figura representativa do papel de proteína MGMT no reparo a danos ao DNA. A proteína MGMT remove radicais alquila/metil das guaninas na sequência do DNA. Na ausência da proteína MGMT ativa existem duas possibilidades: a guanina ligada a radicais alquila/metil tem preferência em parear-se com a timina, resultando na inserção de uma mutação. Caso a ausência de MGMT ative outra via de reparo, ocorrerá remoção da guanina alterada o que resulta em quebra da dupla-fita do DNA, levando a célula à apoptose.

Até o momento, o único mecanismo de inativação do gene *MGMT* em tumores é a hipermetilação (ZUO et al. 2004). Não existem relatos de deleções ou rearranjos que acarretem a perda de expressão desse gene (DANAM et al. 2005). ESTELLER et al. (1999) avaliaram o perfil de hipermetilação de diversos tipos tumorais. Nesse estudo foi possível verificar que o gene *MGMT* é mais frequentemente metilado em gliomas, linfomas, carcinomas de cólon, cabeça e pescoço e pulmão não-pequenas células. A hipermetilação, que está associada a redução nos níveis de mRNA, proteína e da atividade enzimática, pode acarretar

alteração no posicionamento dos nucleossomos em associação à hipoacetilação das histonas, impedindo a ligação dos fatores de transcrição (WATTS et al. 1997). Além disso, em linhagens celulares que expressam a proteína MGMT observou-se altos níveis das histonas H3 e H4 acetiladas, quando comparadas a linhagens que não expressam a proteína (DANAM et al. 2005).

A hipermetilação do gene *MGMT* já foi descrita em 23% a 52% dos CEs de cabeça e pescoço e a presença de metilação no promotor desse gene pôde ser correlacionada à sobrevida global e livre de doença (SANCHEZ-CESPEDES et al. 2000; ROSAS et al. 2001; MARUYA et al. 2004; ZUO et al. 2004; HA e CALIFANO 2006).

A hipermetilação na região promotora do gene *MGMT*, como dito anteriormente, pode ser uma importante ferramenta para delineamento do tratamento em diversos tumores. No entanto a quimiossensibilidade aos agentes alquilantes pode também estar associada a um pior prognóstico para os pacientes que não são submetidos ao tratamento, uma vez que a ausência da atividade da proteína MGMT no reparo a danos e conseqüente controle de mutações pode ter como resultado o acúmulo de mutações pontuais, que por sua vez podem levar a instabilidade genômica (DANAM et al. 2005). Uma mutação bastante frequente no gene *K-RAS* ocorre no códon 12 (GGT), levando à ativação da proteína codificada. Tumores de mama, que raramente apresentam mutações nesse gene, mostram baixo níveis de hipermetilação no promotor de *MGMT*. O quadro oposto é observado nas neoplasias colorretais. A hipermetilação é frequente assim como a mutação em *K-RAS*, que acarreta a troca de uma guanina por uma adenina no codon 12 (ESTELLER et al. 1999). Outro gene que parece apresentar frequências mais elevadas de mutações é o

gene *TP53*. A transição G:C para A:T é uma alteração que corresponde a metade das mutações missense nesse gene. A hipermetilação em *MGMT*, com consequente perda de sua expressão, reduz a remoção dos adutos que se ligam ao DNA e permite a manutenção da O⁶-metilguanina na sequência. Esta, por sua vez, será substituída por uma adenina no momento da replicação e uma mutação será inserida no gene *TP53*. A metilação aberrante em *MGMT* e a associação com maior frequência de mutações no gene *TP53* foi observada em gliomas e tumores de cólon, fígado e pulmão não-pequenas células (ESTELLER e HERMAN 2004).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o padrão de hipermetilação dos genes *CDKN2A* e *MGMT* em amostras de carcinoma epidermóide de pênis, visando verificar a utilidade do padrão de metilação dos promotores desses genes como marcadores moleculares de prognóstico para o carcinoma peniano.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a frequência de hipermetilação dos genes *CDKN2A*, *MGMT* em tumores primários de carcinoma epidermóide de pênis, provenientes de pacientes tratados no Hospital do Câncer A.C. Camargo;
- Determinar os níveis de expressão das proteínas p16 e *MGMT* nas amostras de carcinoma epidermóides de pênis e verificar sua associação com a presença de hipermetilação nos respectivos genes;
- Correlacionar os dados moleculares com dados anatomopatológicos e epidemiológicos coletados dos pacientes, visando estabelecer marcadores moleculares para as diferentes condições clínicas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES

Para a seleção dos paciente, foram avaliados retrospectivamente os prontuários dos pacientes com carcinoma de pênis tratados no Centro de Tratamento e Pesquisa – Hospital A.C. Camargo, pelo Departamento de Cirurgia Pélvica, no período de 1953 a 2004. Estes casos fazem parte do banco de dados do grupo de estudos em tumores de pênis desta mesma instituição. Os principais dados clínicos e anatomopatológicos já se encontram publicados (GUIMARÃES et al. 2009).

Durante a revisão dos prontuários no Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME), foram colhidas informações pessoais, clínicas e anatomopatológicas relevantes dos pacientes (Anexo 1).

Após a coleta dos dados dos prontuários, foram incluídos no estudo pacientes portadores de carcinoma epidermóide de pênis; submetidos a tratamento cirúrgico do tumor primário; submetidos ou não a linfadenectomia regional, uni ou bilateral, a qualquer momento do seguimento; e pacientes com seguimento adequado por pelo menos 5 anos. Foram excluídos aqueles que apresentavam ou desenvolveram segundo tumor primário; os submetidos a tratamento neo-adjuvante ou adjuvante; e pacientes com amostra incluída em parafina insuficiente para a confecção de cortes histológicos para confirmação diagnóstica e para utilização nas demais etapas deste estudo.

3.2 EXTRAÇÃO DO DNA DAS AMOSTRAS INCLUÍDAS EM PARAFINA

O DNA de 128 amostras de carcinoma epidermóide de pênis incluídas em parafina foi extraído através das etapas de digestão com proteinase K, purificação com fenol-clorofórmio e precipitação com etanol.

Inicialmente, foi realizada a microdissecção manual das amostras incluídas em parafina. As regiões tumorais foram delimitadas em lâminas coradas com hematoxilina-eosina e microdissecção foi realizada em 10 cortes de 5µm sem coloração através da raspagem dos cortes com lâmina de bisturi. O tecido raspado foi colocado em microtubos de 1,5mL.

As amostras foram desparafinizadas por incubação com xilol por duas horas a 48°C. A reidratação do tecido foi realizada através de lavagens sucessivas em etanol 100%, 70% e 50% seguidas de centrifugação. Para lise das membranas celulares e nucleares e degradação de proteínas, as amostras foram incubadas por 48 horas a 48°C em solução de SDS-proteinase K 1% (SDS 1%; 100mg de proteinase K; 10mM Tris-HCl pH9,0; 2,5mM EDTA pH8,0; 62,5mM NaCl). A cada 8 horas foram adicionados 20µL de proteinase K 20%. Em seguida, foi realizada extração do DNA através da adição de 1 volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugação para separação das porções aquosa e orgânica. A porção aquosa foi separada e submetida a precipitação com etanol. As amostras foram precipitadas em 2,5 volumes de etanol 100%, 650mM de acetato de amônio e 0,040mg de glicogênio por 12 horas a -20°C. Após centrifugação e descarte do sobrenadante, as amostras foram lavadas com etanol 70% e seguiu-se nova centrifugação. O etanol 70% foi

descartado e após secagem dos *pellets*, os mesmos foram ressuspensos em 50µL de água e as amostras armazenadas a -20°C.

O DNA obtido foi submetido à quantificação por espectrofotometria no aparelho *Nanodrop 1000* (Thermo Scientific). Em cada quantificação foram considerados os valores da concentração da amostra em ng/µL; a razão 260/280, que indica a quantidade de proteína presente na amostra, cujo valor ideal é de aproximadamente 1,8 a 2,0; e a razão 230/260, que aponta a presença de reagentes empregados durante a extração do DNA, cujo valor esperado deve ser igual ou maior que 2,0.

3.3 TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO

A análise da presença de hipermetilação através do sequenciamento, empregando a técnica de pirosequenciamento, exige uma etapa prévia, na qual as amostras são submetidas a um tratamento com bissulfito de sódio. Durante esse tratamento, as citosinas não metiladas são convertidas em uracilas por uma reação de deaminação e as 5-metil-citosinas (citosinas metiladas) são protegidas desse tratamento.

No tratamento com bissulfito de sódio, foi empregado o kit *EZ DNA Methylation KitTM* (Zymo). Foram tratados 2µg de DNA, que inicialmente foram denaturados na presença do tampão *M-Dilution Buffer*, por 15 minutos a 37°C. O DNA denaturado foi incubado com solução contendo bissulfito de sódio (*CT Conversion Reagent*) por 12 a 16 horas a 50°C. Em seguida, as amostras foram homogenizadas com tampão *M-Binding Buffer*, para sua ligação ao filtro das colunas

de lavagem, e submetidas a centrifugação. As amostras foram lavadas com *M-Wash Buffer* e desulfonadas (*M-Desulphonation Buffer*) por incubação de 15 minutos a temperatura ambiente por 15 minutos. Foram realizadas duas lavagens sucessivas com *M-Wash Buffer* e após a última centrifugação, as colunas foram transferidas para novos tubos de coleta de 1,5mL. Para eluição do DNA, foram adicionados 50µL de água ao filtro da coluna e as amostras foram centrifugadas. O DNA tratado com bissulfito de sódio foi armazenado a -80°C.

Após o tratamento com bissulfito de sódio, as amostras tiveram sua viabilidade verificada através da amplificação de um fragmento de 133 pares de base do gene β -ACTINA. Para esta reação, foram desenhados oligonucleotídeos considerando a sequência do DNA submetida ao tratamento com bissulfito de sódio. Dessa forma, a sequência do oligonucleotídeo senso é 5'-TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT – 3' e a sequência do antisense é 5'-AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA – 3'. As reações foram realizadas em um volume final de 25µL, contendo 1X tampão de reação; 1,5mM de $MgCl_2$; 0,2mM de cada dNTP; 200mM de cada oligonucleotídeo; 1 unidade de Platinum Taq Polymerase (Invitrogen); e 5µL de DNA. As amostras foram incubadas em termociclador com as seguintes temperaturas: 95°C por 5 minutos; 95°C por 1 minuto, 66°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, durante 35 ciclos; e 72°C por 5 minutos. O resultado da amplificação foi verificado em gel de agarose 1%.

3.4 AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES PROMOTORAS DOS GENES *CDKN2A* E *MGMT*

Todas as reações de PCR (Polymerase Chain Reaction – reação em cadeia da polimerase), foram realizadas para um volume final de 50µL, utilizando-se 10µL do DNA tratado com bissulfito de sódio em solução contendo 1X tampão de reação; 2mM de cloreto de magnésio; 200µM de cada dNTP; 200mM de cada oligonucleotídeo iniciador e 2.5 unidades da DNA polimerase *HotStarTaq* (QIAGEN). As reações foram incubadas em termociclador por 15 minutos a 95°C, 45 segundos a 95°C e 45 segundos a 55°C (*CDKN2A*) ou 53°C (*MGMT*) por 38 vezes. A amplificação do fragmento de interesse foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1%.

As condições ideais para a amplificação das regiões alvo foram alcançadas após a otimização de diversos parâmetros da PCR para amplificação das regiões promotoras dos genes *CDKN2A* e *MGMT* foi realizada através de alterações nas condições da reação (concentração de cloreto de magnésio, dos oligonucleotídeos e da *Taq* DNA polimerase; quantidade de DNA tratado com bissulfito de sódio; temperaturas e tempos de incubação). As reações foram consideradas ótimas quando a reação de pirosequenciamento resultou em sequências de boa qualidade. Para todas as etapas de otimização foi empregado DNA de linfócitos de sangue periférico, metilado *in vitro* e tratado com bissulfito de sódio.

Os oligonucleotídeos iniciadores empregados nas reações de amplificação são ensaios comercialmente disponíveis. Cada ensaio contém 1 oligonucleotídeo iniciador senso e um antissenso e 1 oligonucleotídeo iniciador para a reação de

pirossequenciamento. Tanto para o gene *CDKN2A* e para o gene *MGMT*, os iniciadores antissenso foram marcados com biotina. No caso do gene *CDKN2A*, o ensaio foi desenhado para a detecção dos níveis de metilação presentes e 7 dinucleotídeos CpG localizados no exon 1 entre os nucleotídeos 148 e 174 (Ensembl gene: ENSG00000147889) (Anexo 3). Para o gene *MGMT*, foram empregados oligonucleotídeos que permitem a avaliação de 5 dinucleotídeos CpG compreendidos entre os nucleotídeos 17 e 39 do exon 1 (Ensembl gene: OTTHUMT00000051009) (Anexo 4). Em ambos os ensaios o oligonucleotídeo antissenso é marcado com biotina, essencial para a etapa de seqüenciamento.

O DNA de linfócitos metilado *in vitro* e tratado com bissulfito de sódio foi empregado como controle positivo em todas as PCRs para os genes *CDKN2A* e *MGMT*. Alíquotas de 20mL de sangue periférico foram submetidas a centrifugação para separação do soro e da porção celular. À porção celular foi adicionada solução de Tris-EDTA pH8,0 1X (TE 1X – 10mM Tris-HCl pH8,0 e 1mM EDTA pH8,0), para lise das hemácias. Após sucessivas etapas de lavagem com TE 1X e centrifugação, foi obtido o *pellet* de linfócitos, a partir do qual foram obtidas as amostras de DNA. Para a extração do DNA foi empregado o protocolo de digestão com proteinase K, purificação com fenol-clorofórmio e precipitação com etanol, seguindo as mesmas etapas descritas anteriormente para as amostras incluídas em parafina excluindo-se a etapa de desparafinização com xilol. Em seguida, as amostras foram quantificadas por espectrofotometria no aparelho *Nanodrop 1000* e a viabilidade do DNA verificada através de PCR para o fragmento de 133 pares de base do gene *β -ACTINA*. A metilação *in vitro* do DNA de linfócitos foi realizada com o kit *CpG Methylase-SssI* (New England Biolabs), seguindo instruções do

fabricante. Um volume total de reação de 250µL, contendo 20µg de DNA; 0,032mM de S-adenosilmetionina (SAM – doador de radicais metil) e 25 unidades de metilase SssI, foi submetido a incubação por 4 horas a 37°C. Após esse período, adicionou-se 0,064mM de SAM e 12,5 unidades de metilase SssI e a reação foi incubada novamente por 4 horas a 37°C. Em seguida, as amostras foram submetidas a purificação com fenol-clorofórmio e precipitação com etanol. O DNA obtido foi estocado a -20°C. O DNA metilado in vitro foi tratado com o kit *EZ DNA Methylation Kit* (Zymo), como descrito anteriormente.

3.5 PIROSSEQUENCIAMENTO

Para a avaliação da frequência de metilação nas amostras de câncer de pênis, para os genes *CDKN2A* e *MGMT*, foi empregada a abordagem de pirossequenciamento no equipamento *PyroMark ID* (QIAgen) e as quantificações nos níveis de metilação de cada dinucleotídeo foram realizadas pelo software *Pyro Q-CpG* (QIAgen).

O pirossequenciamento é uma abordagem quantitativa que se baseia no monitoramento em tempo real da síntese do DNA. A sequência amplificada é submetida ao sequenciamento catalisado por 4 enzimas, cujo resultado final da reação é a emissão de luz caso ocorra a incorporação do nucleotídeo adicionado. A intensidade de luz é captada pelo equipamento, através de uma câmera CCD.

O software *Pyro Q-CpG* (QIAgen), a partir da altura dos picos de citosina (casos metilados) e de timina (casos não metilados) determina os níveis de metilação presentes no tumor para cada CpG avaliado. Além da quantificação o software

também insere na sequência a ser avaliada um controle interno. Trata-se de uma citosina localizada fora de sítio CpG que permite avaliar se o tratamento com bissulfito de sódio foi eficiente. No caso de conversão eficiente das citosinas não metiladas em uracilas, na sequência alvo o pico esperado é de uma timina. Caso o pico de citosina seja observado isso indica que o tratamento com bissulfito de sódio não foi eficiente e que a quantificação dos níveis de metilação pode sofrer interferência das citosinas não convertidas adequadamente, levando até mesmo a resultados falso-positivos

Para o sequenciamento das amostras é necessária uma etapa prévia para denaturação das fitas de DNA. A amostra amplificada é homogenizada a *beads* de sefarose (partículas esféricas de sefarose) para ligação aos fragmentos marcados com biotina. Em seguida, com o auxílio do equipamento *Vacuum Prep Workstation* (QIAGEN), as amostras que se ligaram às *beads* de sefarose são submetidas a lavagem em etanol 70%, tampão de denaturação (*Denaturation solution* – QIAGEN) e lavagem das amostras (*Wash Buffer* – QIAGEN). Em seguida, as amostras são incubadas com 0,5µM de oligonucleotídeos para sequenciamento, por 2 minutos a 80°C, para que ocorra o anelamento.

As enzimas da reação e os nucleotídeos livres para o sequenciamento são fornecidos pelo kit *Pyro Gold Reagents* (QIAGEN). Os reagentes são adicionados em um cartucho, com compartimentos específicos para cada reagente (mistura de enzimas, substrato, adenina, citosina, guanina e timina), que em seguida é colocado no equipamento *Pyro Mark ID* (QIAGEN) e que dispensa cada reagente no momento adequado da reação. Os volumes de cada reagente são calculados pelo software *Pyro Q-CpG* (QIAGEN).

A metilação foi considerada aberrante quando o nível de metilação foi maior do que o nível de corte, estabelecido aleatoriamente, de 15%. Abaixo desse valor os níveis detectados foram considerados artefatos da reação ou nível de metilação não significante. O nível (porcentagem) de hipermetilação de uma amostra foi determinada através da média dos sítios CpG avaliados.

3.6 CONFECÇÃO DO *TISSUE MICROARRAY* (TMA)

Os casos selecionados após revisão diagnóstica, foram utilizados na confecção de quatro blocos de TMA. Os blocos de TMA foram montados utilizando-se o dispositivo técnico *Tissue Microarrayer* (*Beecher Instruments*, Silver Springs – EUA).

Dois patologistas analisaram lâminas coradas com hematoxilina-eosina para seleção da área representativa do tumor. Em seguida, a área tumoral foi identificada no bloco de parafina doador, foi puncionada com agulha de 1mm e os cilindros foram transferidos para o bloco receptor. As amostras foram inseridas em duplicatas nos seus respectivos blocos. Em seguida, foi construído um mapa com a identificação detalhada de cada caso para posterior localização destes. Foram realizados cortes sequenciais de 4 μ m de espessura e colhidos em lâminas adesivas (*Instrumedics*, Hackensack NJ - EUA). Todos os cortes foram colhidos em uma única sessão e armazenados para uso posterior.

3.7 IMUNOISTOQUÍMICA

As reações de imunohistoquímica para cada anticorpo foram realizadas em duas lâminas de cada bloco de TMA, sendo que cada lâmina representava cortes com distância aproximada de 150µm (30 cortes), visando avaliar a expressão das proteínas p16 e MGMT em diferentes regiões do mesmo tumor. Como descrito anteriormente, em cada lâmina o mesmo tumor está representado em duplicata. Dessa forma, a análise de duas lâminas implicou a avaliação de cada tumor em quadruplicata.

Os cortes histológicos foram desparafinizados através de lavagens sucessivas em xilol, reidratados em etanol e lavados em água corrente. A recuperação antigênica em calor úmido foi realizada em panela de pressão com os cortes imersos em solução tampão de citrato de sódio 10mM pH6,0. Seguiu-se bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada 30 volumes e bloqueio de proteínas inespecíficas com *Protein Block Serum Free* (Dako).

Os anticorpos primários foram diluídos de acordo com otimização prévia. O anticorpo contra a proteína p16 (Santa Cruz) foi empregado na proporção 1:800 e o anticorpo anti-MGMT (Neomarkers) foi utilizado na proporção 1:200. A incubação com os anticorpos primários ocorreu por um período de duas horas em temperatura ambiente em câmara úmida.

A amplificação do sinal foi realizada através do sistema de polímero. As lâminas, após 3 lavagens em solução de PBS, foram incubadas por 30 minutos com *Post Primary Block* (Novocastra) e em seguida com polímero (*Polymer – Novocastra*) por mais 30 minutos. Os cortes foram corados com 3,3'

diaminobenzidina (DAB) e contracoradas com hematoxilina de Harris. Os cortes foram desidratados através de lavagens sucessivas em etanol e xilol, e a montagem das lâminas foi realizada no aparelho *Tissue-Tek* (Sakura).

A análise dos ensaios imunoistoquímicos para determinação dos níveis de expressão das duas proteínas foi realizada no equipamento *ScanScope XT* (Aperio). Nesse equipamento, as lâminas de imunoistoquímica dos TMAs foram digitalizadas. A quantificação dos níveis de expressão, baseadas na intensidade da marcação e na quantidade de células marcadas, foi realizada através do software *SpectrumTM Plus* (Aperio). O software permite a seleção da área tumoral de interesse e algoritmos padrão do próprio software fazem a quantificação da intensidade e da porcentagem de células, baseando-se no número de pixels e na densidade óptica da marcação. O software é capaz de diferenciar entre a marcação marrom (positiva) e a azul (negativa) da reação de imunoistoquímica.

A porcentagem (frequência) de células marcadas foi categorizada de acordo com o seguinte sistema de gradação:

- 0 - <1% de células positivas;
- 1 – 1% a 10% de células positivas;
- 2 – 11% a 50% de células positivas;
- 3 – 51% a 90% de células positivas;
- 4 - >90% de células positivas.

A intensidade da marcação é determinada pelo software e varia de 0 a 3, sendo que 0 corresponde a ausência de células positivas; 1 a marcação fraca; 2 a marcação moderada; e 3 a marcação forte.

Para as análises estatísticas, foi considerada a soma dos escores de porcentagem de células positivas e a intensidade da marcação. Foram considerados negativos aqueles casos com escore entre 0 e 1; positivos fraco casos com escore entre 2 e 4; e positivos aqueles cuja somatória foi maior que 4.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através do programa SPSS for Windows 15.0, SPSS Inc. A distribuição das variáveis clínicas, anatomopatológicas e referentes ao tratamento foram apresentadas na forma de tabelas de contingências.

As associações entre variáveis qualitativas, expressão das proteínas p16 e MGMT, status de hipermetilação dos genes *CDKN2A* e *MGMT*, e presença de metástase linfonodal foram feitas com o teste do chi-quadrado bicaudal. De acordo com os valores obtidos na tabelas 2x2, utilizou-se o valor do chi-quadrado bicaudal corrigido (Teste de Fisher).

A identificação dos fatores independentes relacionados com metástase linfonodal foi realizada pela regressão logística múltipla. As variáveis para o estudo múltiplo foram as que atingiram significância estatística na análise univariada ($p < 0,050$), bem como aquelas que atingiram valores de p até 0,20. O resultado final para os modelos multivariados, regressão logística e de Cox foi obtido pela estratégia *stepwise forward selection*, na qual, a partir da variável de maior significância na análise univariada, foram acrescentadas as outras variáveis, uma a uma, em ordem crescente.

A sobrevida global e câncer específica foram analisadas pelo estimador produto de limite de Kaplan e Meier, e a comparação entre as curvas através do teste de Log-rank. Na análise multivariada para sobrevida, usou-se o modelo de riscos proporcionais de Cox, calculando-se as razões de risco proporcional para óbito. As variáveis que atingiram significância estatística na análise univariada para sobrevida global e câncer específica foram selecionadas para análise multivariada, bem como aquelas que atingiram valores de p até 0,20.

A significância estatística foi determinada para um valor de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

4.1.1 Aspectos Epidemiológicos, Clínicos e Anatomopatológicos

Todos os dados referentes aos aspectos epidemiológicos e clínicos da amostra estão resumidos na Tabela 1.

A idade dos 351 pacientes variou de 21 a 87 anos, com média e mediana de 55 anos. Pacientes com idade superior a 60 anos representaram 61,0% (214 pacientes) da amostra. Apenas 14 (4%) pacientes tinham até 30 anos no momento do diagnóstico. Quanto a raça os pacientes se dividiram da seguinte maneira: 70,9% (270 pacientes) eram brancos e 23,1% (81 pacientes) eram não brancos (raças negra e amarela). Dentre os 216 pacientes que puderam relatar seus antecedentes venéreos, 97 (44,9%) pacientes referiram ter tido alguma doença venérea e 119 (55,1%) afirmaram nunca ter tido qualquer doença venérea. Apenas 18,0% (59) dos pacientes foram submetidos à postectomia e 82,0% (269) não a realizaram. A informação a respeito da realização de postectomia não foi transcrita para o prontuário em 23 (6,6%) dos casos.

Ao diagnóstico, 242 (68,9%) pacientes apresentaram o tumor de pênis intacto, 96 (27,4%) haviam sido submetidos à biópsia do tumor, 9 (2,6%) dos pacientes haviam sido amputados em outros serviços e um caso (0,3%) havia sido submetido ao tratamento completo (amputação e esvaziamento) em outro serviço, vindo somente para acompanhamento neste hospital. O sintoma mais frequente

relatado foi ferida ou lesão peniana (92,8%). Como sintoma isolado ocorreu em 173 (49,3%) pacientes. O tempo de evolução da doença, desde o seu aparecimento até o diagnóstico foi de no mínimo um mês e de no máximo 240 meses, com média de 17,76 meses e mediana de 8 meses. De acordo com o estadiamento clínico TNM (2002), 34 (9,7%) pacientes apresentavam tumores T1; 171 (48,7%) apresentavam tumores T2; 130 (37,0%) apresentavam tumores T3; e 16 (4,6%) apresentavam tumores T4. Em relação ao estadiamento N, foram observados 173 (49,3%) casos N0; 57 (16,2%) casos N1; 105 (29,9%) casos N2; 10 (2,8%) casos N3; e 6 (1,7%) casos Nx.

Os dados referentes aos aspectos anatomopatológicos foram resumidos e estão apresentados na Tabela 2.

No caso da variável grau histológico, não foi obtida informação para apenas 3 pacientes. Os pacientes se dividiram da seguinte maneira quanto ao grau de diferenciação: 91 (26,1%) pacientes apresentaram tumores grau I; 115 (33,1%) pacientes grau II; e 142 (40,8%) pacientes grau III. Invasão vascular foi observada em 84 (25,8%) casos e estava ausente em 241 (74,2%) dos casos. Houve invasão dos corpos cavernosos em 172 (63,9%) casos e não ocorreu invasão em 97 (36,1%) dos casos. A invasão do corpo esponjoso ocorreu em 253 (90,4%) casos. Em 27 (9,6%) casos não ocorreu invasão. Em 94 (39,3%) casos ocorreu invasão uretral, não observada em 145 (60,7%) casos.

Tabela 1 – Frequência das variáveis clínicas e demográficas dos 351 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Número de pacientes	Porcentagem
Idade		
Até 60 anos	137	39,0
> 60 anos	214	61,0
Raça		
Branca	270	70,9
Não branca	81	23,1
Tempo de evolução		
Até 6 meses	155	45,5
> 6 meses	186	54,5
Antecedentes venéreos		
Não	119	55,1
Sim	97	44,9
Postectomia		
Não	269	82,0
Sim	59	18,0
Infecção pelo HPV		
negativa	61	43,9
positiva	78	56,1
Estadiamento cT*		
T1	34	9,7
T2	171	48,7
T3	130	37,0
T4	16	4,6
Estadiamento cN*		
N0	173	49,3
N1	57	16,2
N2	105	29,9
N3	10	2,8
Nx	6	1,7
Intenção da linfadenectomia		
profilática	40	25,3
necessidade	118	74,7

* Estadiamento TNM (UICC-2002 – CID-10 C60)

Tabela 2 – Frequência das variáveis anatomopatológicas nos 351 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Número de pacientes	Porcentagem
Mestástase linfonodal*		
ausente	76	48,1
presente	82	51,9
Estadiamento pN		
N0	269	76,6
N+	82	23,4
Espessura do tumor		
≤ 5,0mm	91	28,6
> 5,0mm	228	71,4
Grau de diferenciação		
I	91	26,1
II	115	33,1
III	142	40,8
Invasão vascular		
Presente	84	25,8
Ausente	241	74,2
Infiltração de corpos cavernosos		
Presente	172	63,9
Ausente	97	36,1
Invasão do corpo esponjoso		
Presente	253	90,4
Ausente	27	9,6
Infiltração da uretra		
Presente	94	39,3
Ausente	145	60,7

* Somente pacientes que realizaram linfadenectomia.

4.1.2 Aspectos Cirúrgicos e Seguimento Clínico

O tipo de cirurgia predominante foi a amputação parcial, realizada em 202 (57,5%) pacientes. A amputação total ocorreu em 126 (35,9%) casos e a ressecção local em apenas 23 casos (6,6%).

As complicações mais freqüentes decorrentes da amputação foram estenose, em 50 (14,2%) casos; deiscência, em 9 (2,6%) casos; infecção, em 3 (0,9%) casos; e hemorragia, em 2 (0,6%) casos.

Dos 351 pacientes, 158 (45%) foram submetidos a linfadenectomia, sendo 55 (15,7%) casos de linfadenectomia inguinal e 103 (29,3%) casos de linfadenectomia

filio-inguinal. Os 193 (55%) pacientes que não submetidos a linfadenectomia foram acompanhados por um período igual ou superior a 5 anos. Foram dissecados no total 4.577 linfonodos, com uma média de 28,9 linfonodos por pacientes, variando de 2 a 87 linfonodos. Dos 158 pacientes linfadenectomizados, 82 (51,9%) apresentaram linfonodos com acometimento neoplásico. Houve um total de 314 linfonodos acometidos pelo tumor, com variação de 1 a 25, representando 6,9% do total de linfonodos avaliados. Em relação à lateralidade dos linfonodos acometidos, 42 (12%) pacientes apresentaram comprometimento unilateral, enquanto que 38 (10,8%) dos pacientes apresentaram comprometimento bilateral.

O tempo de seguimento dos pacientes variou de 0,1 a 452,8 meses, com média de 100 meses e mediana de 71,4 meses.

Em 79 (22,5%) pacientes houve recorrência tumoral. Destes, 59 (16,8%) apresentaram recorrência locorregional; 12 (3,4%), à distância; e 8 (2,3%), locorregional e à distância. Houve 16 (4,6%) casos sem informação.

Ao final do seguimento, 130 (37%) pacientes estavam vivos sem doença, 22 (6,3%) pacientes estavam vivos com doença, 59 (16,8%) pacientes faleceram em decorrência do câncer ou de complicações do tratamento (incluindo óbitos até 30 dias após a cirurgia), 113 (32,2%) pacientes faleceram por outras causas e 27 (7,7%) pacientes foram perdidos de vista.

4.1.3 Variáveis Clínicas e Anatomopatológicas Associadas à Metástase Linfonodal

Na amostra selecionada para o presente estudo a ocorrência de metástase linfonodal está associada a tumores com baixo grau de diferenciação ($p < 0,001$); o

estadio N clínico positivo ($p < 0,001$), tumores em estadio T avançado ($T > 1$) ($p = 0,010$); com invasão de corpos cavernosos ($p < 0,001$); presença de infiltração de uretra ($p < 0,001$); com invasão vascular ($p < 0,001$); com invasão perineural ($p < 0,001$). A presença de invasão do corpo esponjoso não apresentou associação significativamente estatística ($p = 0,053$) com a presença de comprometimento linfonodal, no entanto houve uma maior frequência de metástase linfonodal em pacientes com invasão dessa estrutura peniana. Todas as variáveis clínicas e anatomopatológicas avaliadas quanto a sua associação com o comprometimento linfonodal nos pacientes com câncer de pênis estão representadas na Tabela 3.

As variáveis que atingiram significância estatística na análise univariada e aquelas que atingiram valores de p até 0,20 foram submetidas à análise multivariada para determinação dos fatores de risco independentes para a ocorrência de metástases linfonodais.

No modelo multivariado, as variáveis independentes associadas com maior risco de ocorrência de comprometimento linfonodal foram o baixo grau histológico (RR=2,913; IC 95% [4,116-82,443]), o estadio N clínico positivo (RR=2,167; IC 95% [4,082-18,660]) e a presença de invasão perineural (RR=1,926; IC 95% [3,553-13,250]).

Tabela 3 – Análise univariada para determinar a associação entre as variáveis clínicas e anatomopatológicas dos pacientes com câncer de pênis e o comprometimento linfonodal.

Variáveis	Comprometimento linfonodal		Valor de p
	negativo	positivo	
Tempo de evolução			0,701
≤ 6 meses	117 (75,5%)	38 (24,5%)	
> 6 meses	144 (77,4%)	42 (22,6%)	
Grau de diferenciação			<0,001
bem diferenciado	89 (97,8%)	2 (2,2%)	
pouco diferenciado	177 (66,5%)	80 (33,5%)	
Postectomia			0,613
não	204 (75,8%)	65 (24,2%)	
sim	47 (79,7%)	12 (20,3%)	
Estadiamento cT*			0,010
T1	32 (94,1%)	65 (24,2%)	
T2-T4	237 (74,8%)	80 (25,2%)	
Estadiamento cN*			<0,001
N0	162 (93,6%)	11 (6,4%)	
N+	102 (59,3%)	70 (40,7%)	
Antecedentes venéreos			0,523
sem antecedentes	88 (73,9%)	31 (26,1%)	
com antecedentes	76 (78,4%)	21 (21,6%)	
Intenção do esvaziamento			<0,001
princípio	33 (82,5%)	7 (17,5%)	
necessidade	43 (36,4%)	75 (63,6%)	
Espessura do tumor			0,110
≤ 5mm	75 (82,4%)	16 (17,6%)	
> 5mm	167 (73,2%)	61 (26,8%)	
Invasão de corpo esponjoso			0,053
ausente	25 (92,6%)	2 (7,4%)	
presente	189 (74,7%)	64 (25,3%)	
Invasão de corpos cavernosos			<0,001
ausente	83 (85,6%)	14 (14,4%)	
presente	113 (65,7%)	59 (34,3%)	
Infiltração de uretra			<0,001
ausente	121 (83,4%)	24 (16,6%)	
presente	59 (62,8%)	35 (37,2%)	
Invasão vascular			<0,001
ausente	197 (81,7%)	44 (18,3%)	
presente	48 (57,1%)	36 (42,9%)	
Invasão perineural			<0,001
ausente	202 (88,6%)	26 (11,4%)	
presente	44 (44,9%)	54 (55,1%)	

* Estadiamento TNM (UICC-2002 – CID10 C60)

4.1.4 Variáveis Clínicas e Anatomopatológicas Associadas à Sobrevida dos Pacientes com Câncer de Pênis

A taxa de sobrevida câncer específica da população foi de 82,4% e 81,4%, em 5 e 10 anos respectivamente (Figura 7).

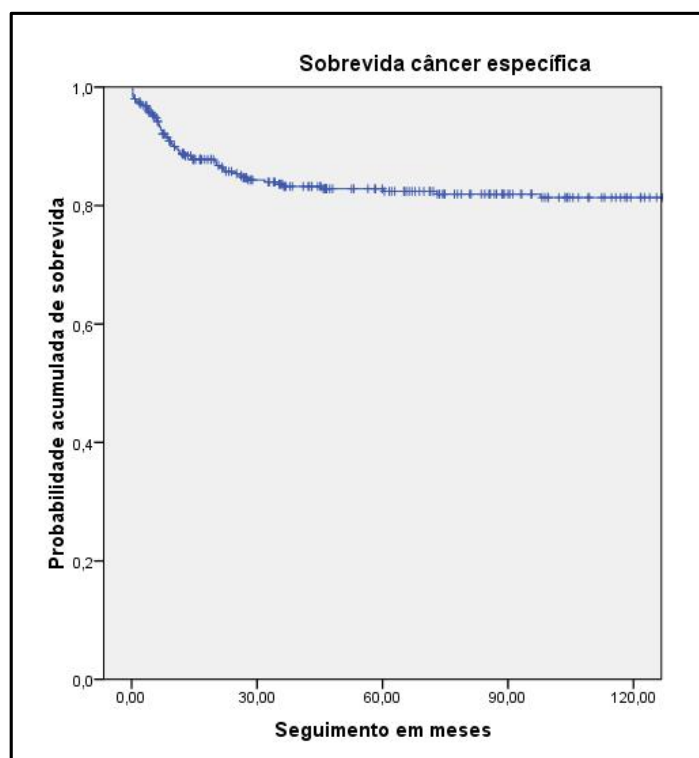


Figura 7 – Curva da probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica dos pacientes com carcinoma epidermóide de pênis.

Dentre as variáveis clínicas e anatomopatológicas avaliadas, aquelas que influenciaram significativamente a sobrevida câncer específica, em 5 anos, foram o estadiamento N ($p < 0,001$); comprometimento linfonodal ($p < 0,001$); grau de diferenciação ($p < 0,001$); invasão de corpos cavernosos (0,039); invasão vascular ($p = 0,003$); invasão perineural ($p < 0,001$) e recidiva ($p < 0,001$) (Figuras 8 a 14) (Tabela 4). Na análise multivariada, o estadiamento N clínico positivo (RR=2,335; IC 95% [1,240-4,393]), o baixo grau de diferenciação (RR=2,912; IC 95% [1,140-7,442]) e a presença de invasão perineural (RR=2,908; IC 95% [1,626-5,199]) se mostraram fatores independentes de maior risco para morte em decorrência da doença.

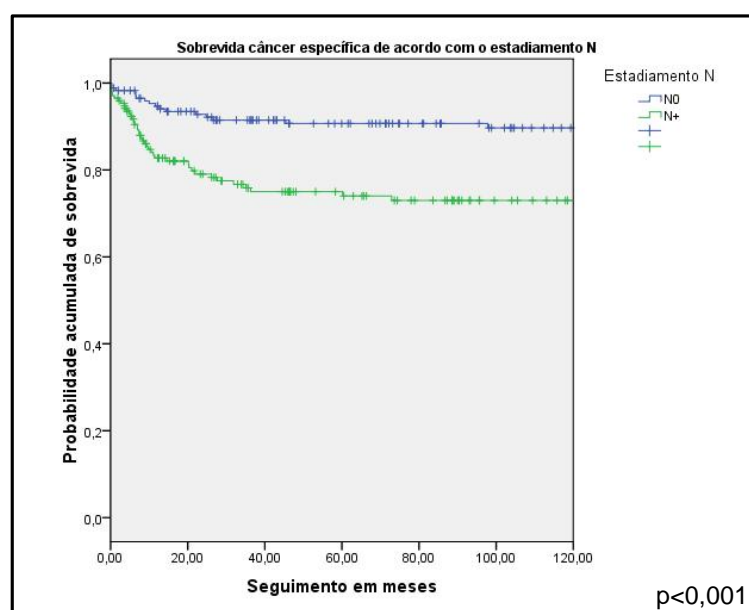


Figura 8 – Curva da probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica dos pacientes com carcinoma epidermóide de pênis, de acordo com o estadiamento N clínico.

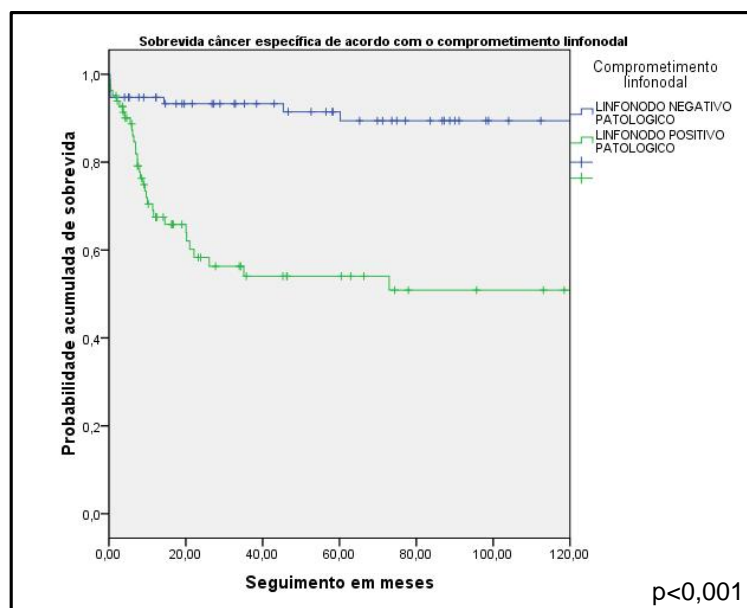


Figura 9 – Curva da probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica dos pacientes com carcinoma epidermóide de pênis, de acordo com o comprometimento linfonodal ao exame patológico.

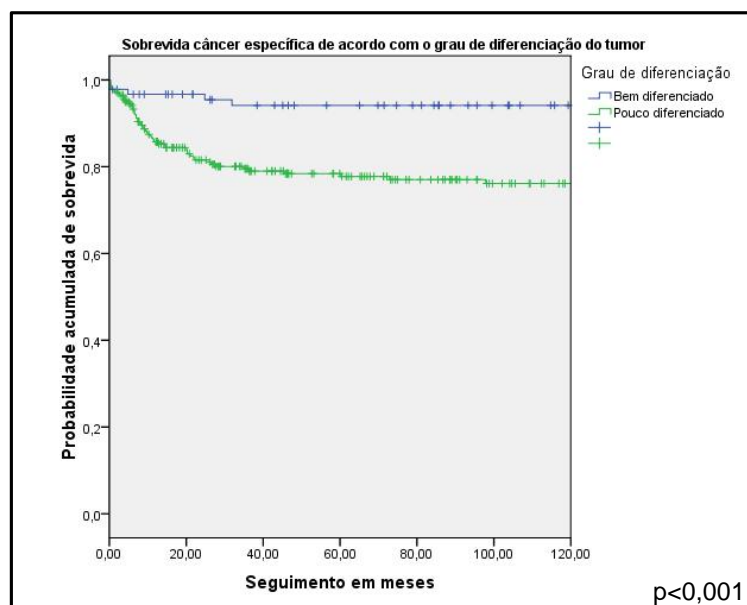


Figura 10 – Curva da probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica dos pacientes com carcinoma epidermóide de pênis, de acordo com o grau de diferenciação do tumor.

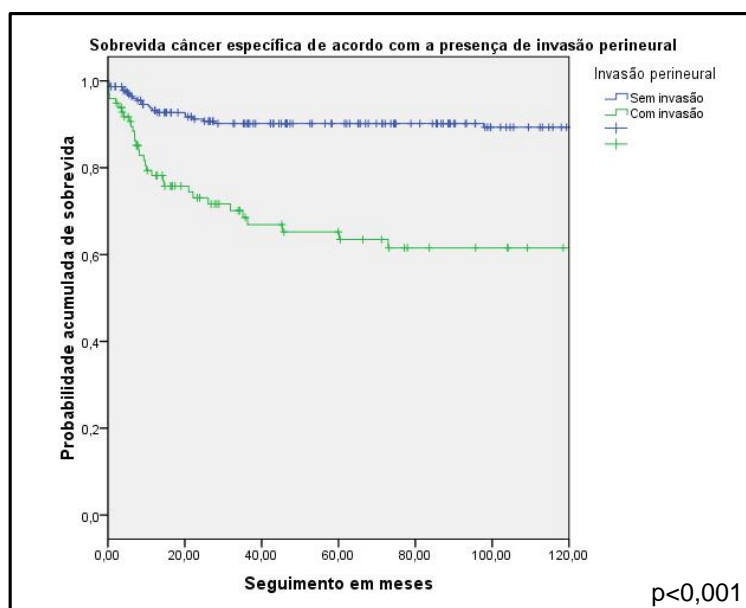


Figura 11 – Curva da probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica dos pacientes com carcinoma epidermóide de pênis, de acordo com a presença de invasão perineural.

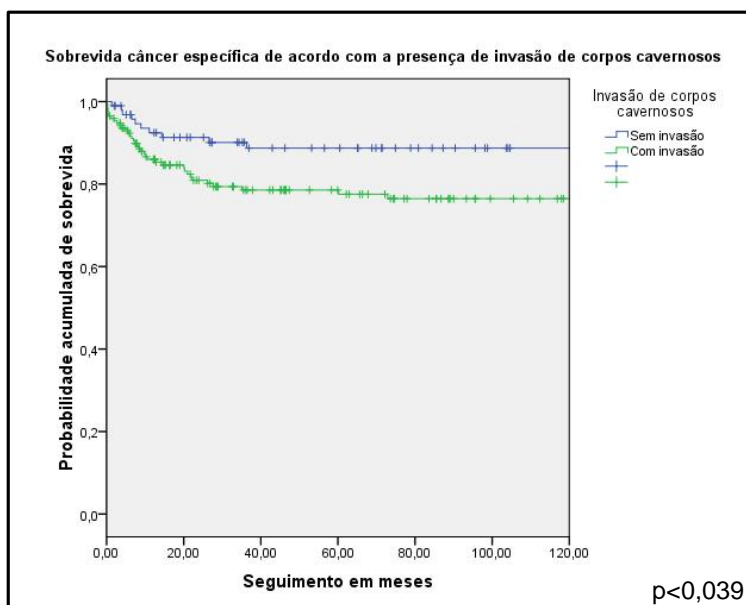


Figura 12 – Curva da probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica dos pacientes com carcinoma epidermóide de pênis, de acordo com a invasão dos corpos cavernosos.

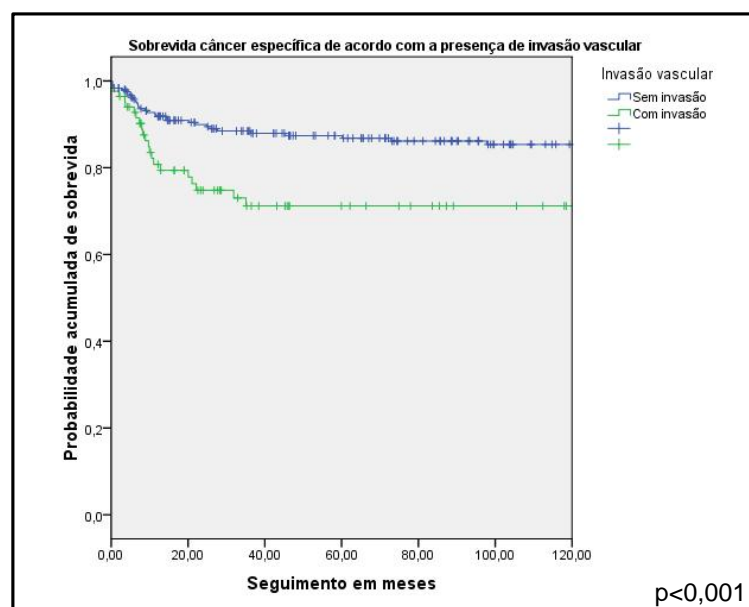


Figura 13 – Curva da probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica dos pacientes com carcinoma epidermóide de pênis, de acordo com a presença de invasão vascular.

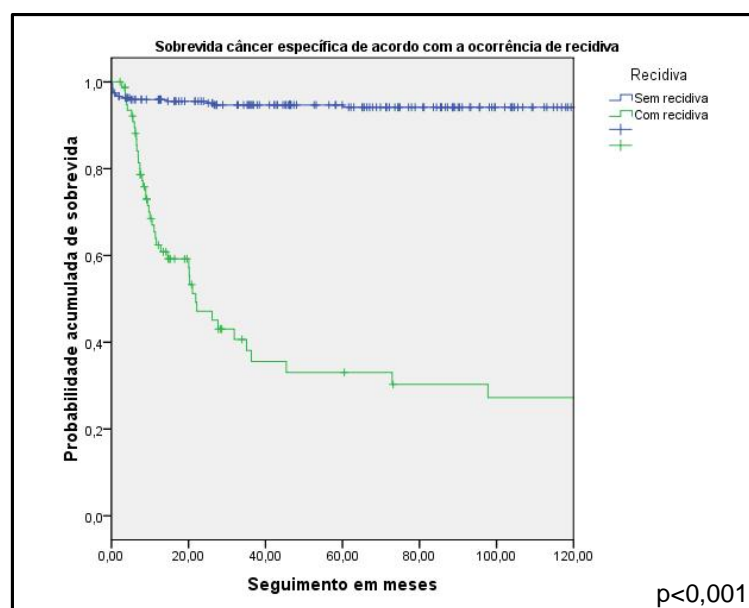


Figura 14 – Curva da probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica dos pacientes com carcinoma epidermóide de pênis, de acordo com a ocorrência de recidiva tumoral.

Tabela 4 – Probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica em 5 anos dos pacientes com carcinoma epidermóide de pênis de acordo com as variáveis epidemiológicas, clínicas e anatomopatológicas.

Variável	Sobrevida em 5 anos		Valor de p
	Frequência	Porcentagem	
Idade			0,562
≤ 60 anos	186	82,7	
> 60 anos	106	84,8	
Raça			0,236
branco	228	84,4	
não branco	64	79,0	
Antecedentes venéreos			0,647
sem antecedentes	102	85,7	
com antecedentes	85	87,6	
Infecção pelo HPV			0,234
negativa	46	75,4	
positiva	67	91,5	
Postectomia			0,092
não	220	81,8	
sim	54	91,5	
Evolução da doença			0,641
≤ 6 meses	128	82,6	
> 6 meses	157	84,4	
Estadiamento cT*			0,085
T1	32	94,1	
T2 – T4	260	82,0	
Estadiamento cN*			<0,001
N0	156	90,2	
N+	132	76,7	
Metástase linfonodal**			<0,001
ausente	69	90,8	
presente	50	61,0	
Grau de diferenciação			<0,001
bem diferenciado	86	94,5	
pouco diferenciado	203	79,0	
Invasão do corpo esponjoso			0,529
ausente	24	88,9	
presente	212	83,8	
Invasão de corpos cavernosos			0,039
ausente	86	88,7	
presente	137	79,7	

Cont/ Tabela 4

Variável	Sobrevida em 5 anos		Valor de p
	Frequência	Porcentagem	
Infiltração de uretra			0,135
ausente	125	86,2	
presente	75	79,8	
Invasão vascular			0,003
ausente	209	86,7	
presente	75	79,8	
Invasão perineural			<0,001
ausente	209	89,9	
presente	63	75,0	
Invasão de órgãos adjacentes			0,646
ausente	270	82,8	
presente	4	80,0	
Recidiva			<0,001
sem recidiva	256	94,1	
com recidiva	36	45,6	

* Estadiamento TNM (UICC-2002 – CID10 C60)

** Somente pacientes submetidos à linfadenectomia.

4.2 AVALIAÇÃO DA HIPERMETILAÇÃO NAS REGIÕES PROMOTORAS DOS GENES *CDKN2A* E *MGMT*

A extração do DNA das amostras de câncer de pênis incluídas em parafina foi realizada com sucesso em todas as 128 amostras. A quantificação por espectrofotometria indicou quantidades totais do ácido nucléico variando entre 2µg e 80µg. Os parâmetros indicadores de contaminação por proteínas ou por resquícios dos reagentes empregados durante a extração do DNA (razões 260/280 e 230/260, respectivamente) apresentaram resultados satisfatórios (Anexo 2).

Em seguida, todas as amostras foram submetidas ao tratamento com bissulfito de sódio e a viabilidade das amostras para utilização nas etapas de amplificação, através de PCR, e pirosequenciamento foram verificadas por PCR para o gene

constitutivo β -ACTINA, cujos oligonucleotídeos foram desenhados considerando a sequência do DNA convertida pelo tratamento. Todas as amostras apresentaram viabilidade para as subsequentes etapas da análise da hipermetilação nos genes alvo do estudo (Figura 15).

O DNA tratado com bissulfito de sódio foi empregado em PCRs para a amplificação das regiões promotoras de interesse para avaliação do perfil de hipermetilação. Foi possível amplificar a sequência alvo do gene *CDKN2A* em todas as 128 amostras. As PCRs para o gene *MGMT* não amplificaram as regiões alvo de 6 amostras e, dessa forma, os níveis de metilação foram avaliados em 122 amostras. Todas as reações de amplificação foram verificadas, quanto a presença do fragmento alvo, em gel de agarose 1% (Figuras 16 e 17).

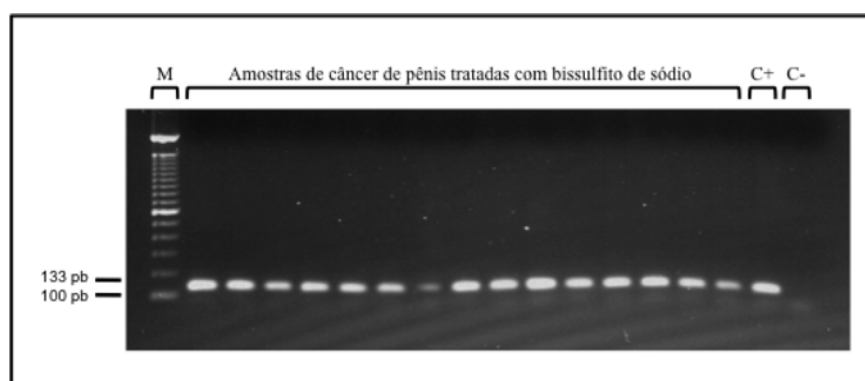


Figura 15 – Foto representativa de gel eletroforese da PCR do gene β -ACTINA, realizada com amostras submetidas ao tratamento com bissulfito de sódio. A presença da banda de 133 pares de base indica que a amostra é viável para ser utilizada nas abordagens para análise de hipermetilação. M: marcador de peso molecular 100 pares de base; C+: controle positivo (DNA de linfócitos metilado *in vitro*); C-: controle negativo.

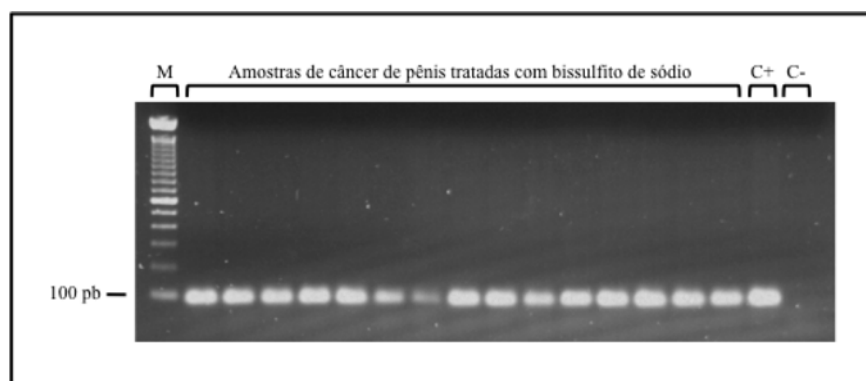


Figura 16 – Foto representativa de gel de eletroforese da PCR para amplificação da região promotora do gene *CDKN2A*. A presença de banda intensa de aproximadamente 100 pares de base indica a amplificação do produto alvo e amostra adequada para seqüenciamento, através da abordagem de piroseqüenciamento. M: marcador de peso molecular 100 pares de base; C+: controle positivo (DNA linfócitos metilado *in vitro*); C-: controle negativo.

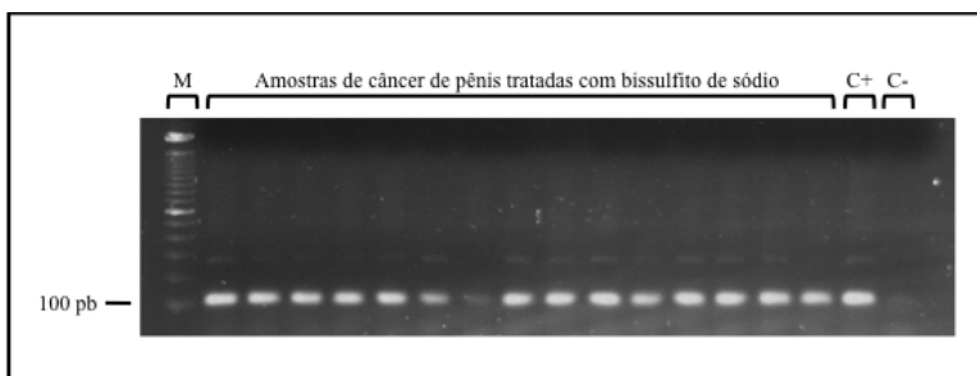


Figura 17 – Foto representativa de gel de eletroforese da PCR para amplificação da região promotora do gene *MGMT*. A presença de banda intensa de aproximadamente 100 pares de base indica a amplificação do produto alvo e amostra adequada para seqüenciamento, através da abordagem de piroseqüenciamento. M: marcador de peso molecular 100 pares de base; C+: controle positivo (DNA linfócitos metilado *in vitro*); C-: controle negativo.

O pirossequenciamento das amostras permitiu a avaliação de 7 sítios CpG no promotor do gene *CDKN2A* e de 5 sítios do promotor gênico de *MGMT* (Figuras 18 e 19). A hipermetilação no promotor do gene *CDKN2A* foi avaliada em todas as 128 amostras. Não foi observada presença de metilação aberrante em nenhuma das amostras selecionadas. Os níveis de metilação entre as amostras variaram de 0% a 15% (Anexo 3), valores abaixo do nível mínimo de metilação estabelecido para que uma amostra fosse considerada hipermetilada. Considerando esse valor de corte, o gene *MGMT* apresentou hipermetilação em 57,4% (70/122) dos casos de câncer pênis, com níveis de metilação variando de 16% a 86% (Anexo 4).

A análise estatística univariada para verificar possíveis associações entre a hipermetilação em promotores gênicos e as variáveis clínicas e anatomopatológicas foi realizada somente para o gene *MGMT*, uma vez que nenhuma amostra apresentou-se hipermetilada no caso do gene *CDKN2A*. O teste do Qui-quadrado, ou teste exato de Fisher quando foi necessário, não indicou qualquer associação da metilação aberrante no promotor do gene *MGMT* com variáveis relevantes para o prognóstico dos pacientes. A única associação observada foi entre a presença de hipermetilação e o relato de antecedentes venéreos ($p=0,012$) (Tabela 5). Não houve associação significativa entre o status de hipermetilação do gene *MGMT* e a sobrevida câncer específica dos pacientes com câncer de pênis ($p=0,115$) (Tabela 6).

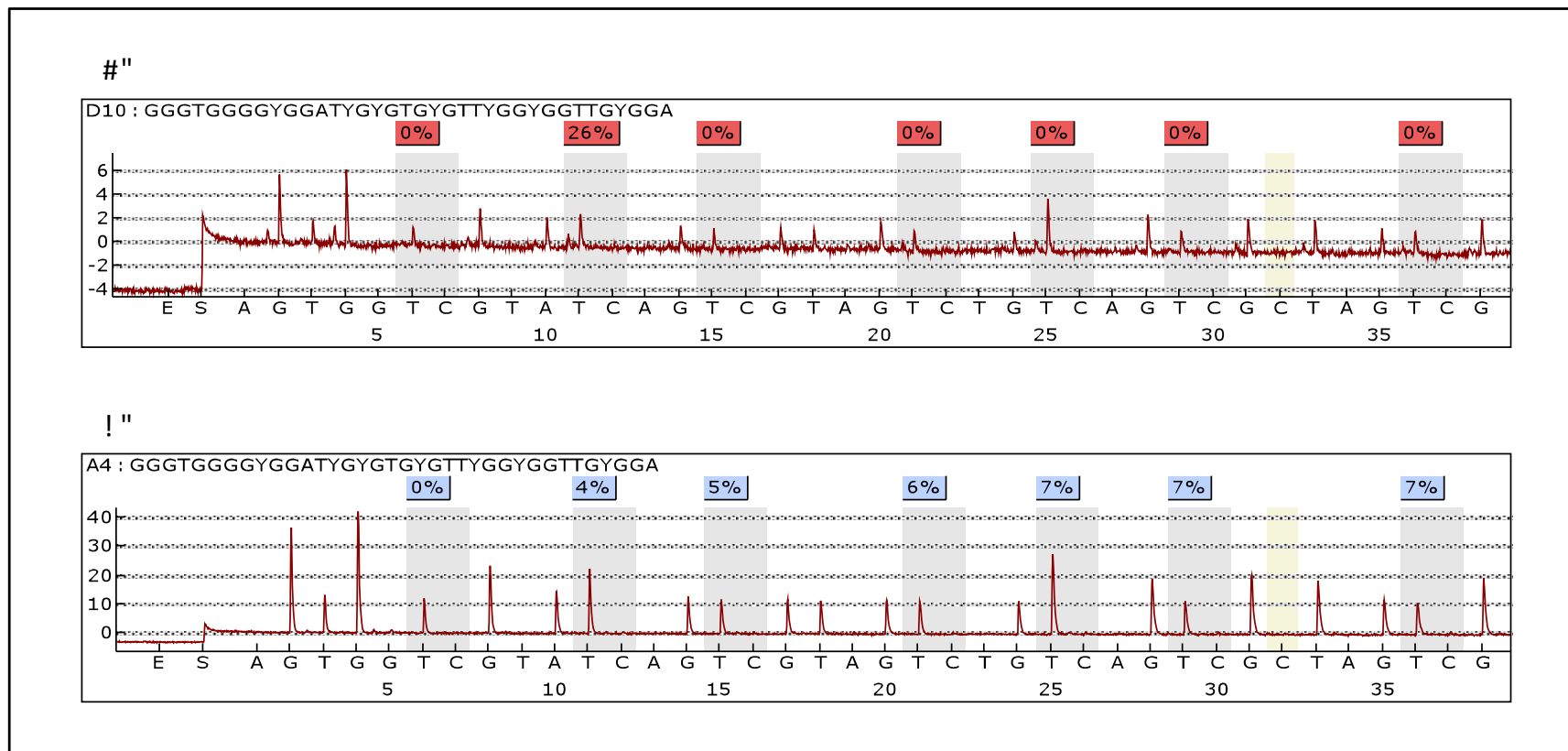


Figura 18 – Pirogramas representativos do sequenciamento da região promotora alvo do gene *CDKN2A*. Nos pirogramas fornecidos pelo software *Pyro Q-CpG* (QIAGEN), cada dinucleotídeo CpG avaliado (marcados em cinza) são avaliados considerando a situação não-metilada (T) e metilada (C), permitindo a determinação dos níveis de metilação (quadrados acima da marcação cinza) de cada sítio. A- pirograma de baixa qualidade que não permite a avaliação confiável dos níveis de metilação. B – pirograma de boa qualidade, cujas quantificações são confiáveis.

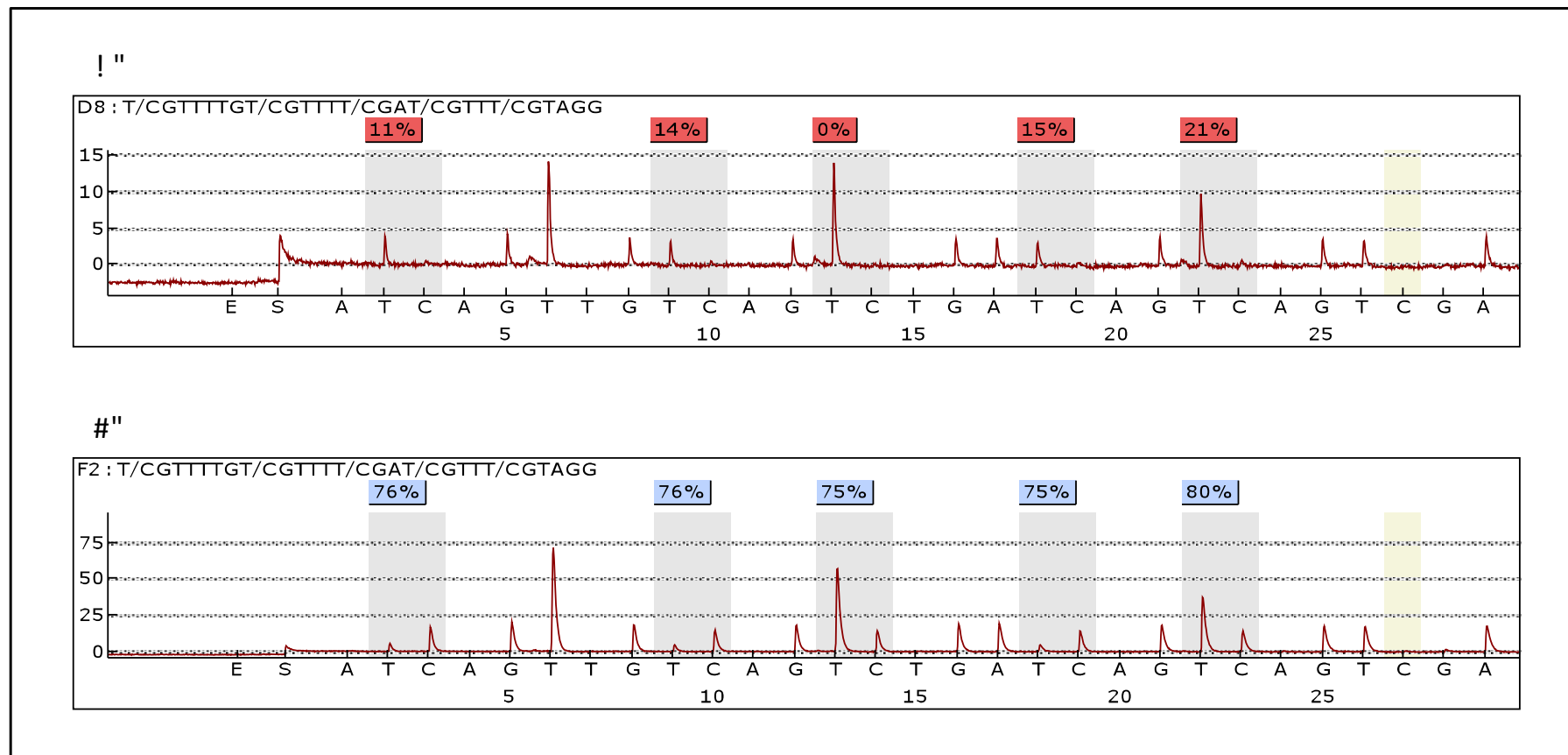


Figura 19 – Pirogramas representativos do sequenciamento da região promotora alvo do gene *MGMT*. A- pirograma de baixa qualidade que não permite a avaliação confiável dos níveis de metilação. B – pirograma de boa qualidade, cujas quantificações são confiáveis.

Tabela 5 – Fatores clínicos e anatomopatológicos de acordo com o status de metilação do gene *MGMT*.

Variáveis	Metilação de <i>MGMT</i>		Valor de p
	não metilado	metilado	
Grau histológico			0,638
baixo	10 (47,6%)	11 (52,4%)	
alto	42 (43,0%)	58 (58,0%)	
Estadiamento cT*			1,000
T1	6 (40,0%)	9 (60,0%)	
T2-T4	46 (43,0%)	61 (57,0%)	
Estadiamento cN*			0,906
N0	29 (45,3%)	35 (54,7%)	
N1	9 (37,5%)	15 (62,5%)	
N2	13 (41,9%)	18 (58,1%)	
desconhecido	1 (33,3%)	2 (66,7%)	
Metástase linfonodal**			0,582
N0	29 (45,3%)	35 (54,7%)	
N+	22 (40,0%)	33 (60,0%)	
Antecedentes venéreos			0,012
sem antecedentes	23 (50,0%)	23 (50,0%)	
com antecedentes	8 (22,2%)	28 (77,8%)	
Espessura do tumor			0,339
≤ 5mm	12 (54,5%)	10 (45,5%)	
> 5mm	38 (40,9%)	55 (59,1%)	
Invasão de corpo esponjoso			0,720
ausente	4 (50,0%)	4 (50,0%)	
presente	41 (41,8%)	57 (58,2%)	
Invasão de corpo cavernoso			0,668
ausente	16 (50,0%)	16 (50,0%)	
presente	30 (43,5%)	39 (56,5%)	
Infiltração de uretra			0,514
ausente	24 (44,4%)	30 (55,6%)	
presente	13 (36,1%)	23 (63,9%)	
Invasão vascular			0,557
ausente	36 (45,6%)	43 (54,4%)	
presente	15 (39,5%)	23 (63,9%)	
Invasão perineural			0,539
ausente	35 (41,7%)	49 (58,3%)	
presente	16 (48,5%)	17 (51,5%)	
Comprometimento linfonodal			1,000
negativo	41 (42,7%)	55 (57,3%)	
positivo	11 (42,3%)	15 (57,7%)	

* Estadiamento TNM (UICC-2002 – CID10 C60)

** Somente pacientes submetidos à linfadenectomia.

Tabela 6 – Probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica em 5 anos dos pacientes com carcinoma epidermóide de pênis de acordo com o status de metilação do gene *MGMT*.

Variável	Sobrevida em 5 anos		Valor de p
	Frequência	Porcentagem	
Hipermetilação do gene <i>MGMT</i>			0,115
não metilado	42	80,8	
metilado	64	91,4	

4.3 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS p16 E MGMT

A expressão da proteína p16 foi avaliada em 322 das 351 amostras de câncer de pênis e a expressão de *MGMT* em 285 amostras. A exclusão de amostras das análises ocorreu devido a ausência de células tumorais nas amostras incluídas no TMA ou a perda da amostra durante a confecção do corte histológico.

Após o estabelecimento dos escores de marcação os casos foram classificados em dois grupos. Tanto a proteína p16 quanto a *MGMT* apresentam localização nuclear (Figuras 20 e 21). Dessa forma, as análises para quantificação dos ensaios imunoistoquímicos foram sempre realizadas utilizando o algoritmo do software *SpectrumTM Plus* (Aperio) específico para marcação nuclear. Utilizando esse algoritmo, mesmo na presença de marcação citoplasmática inespecífica, foram determinados somente os níveis de expressão nucleares das duas proteínas. O primeiro grupo englobou amostras com expressão proteica negativa ou fraca e foram consideradas como amostras com redução nos níveis de expressão. No segundo grupo, considerado com expressão

normal ou aumentada das proteínas, foram incluídas as amostras com nível de expressão moderado ou forte. A perda de expressão da proteína p16 foi observada em apenas 33,2% das amostras de carcinoma epidermóide de pênis. A redução da expressão da proteína MGMT ocorreu em 87,4% dos casos (Tabela 7).

Tabela 7 - Distribuição das amostras de carcinoma epidermóide de pênis de acordo com o nível de expressão das proteínas p16 e MGMT.

Proteína	Expressão proteica	
	Negativa / Fraca	Moderada / Forte
p16	107 (33,2%)	215 (66,8%)
MGMT	249 (87,4%)	36 (10,9%)

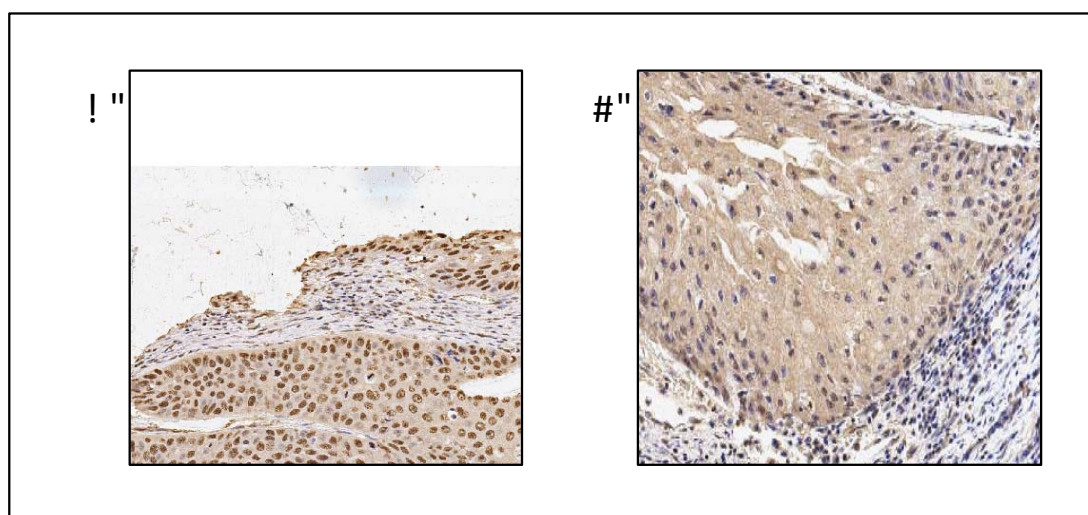


Figura 20 – Figura representativa da reação de imunoistoquímica contra a proteína p16. A, células de carcinoma epidermóide de pênis com expressão positiva para a proteína p16 (marcação nuclear). B, carcinoma epidermóide de pênis sem expressão de p16.

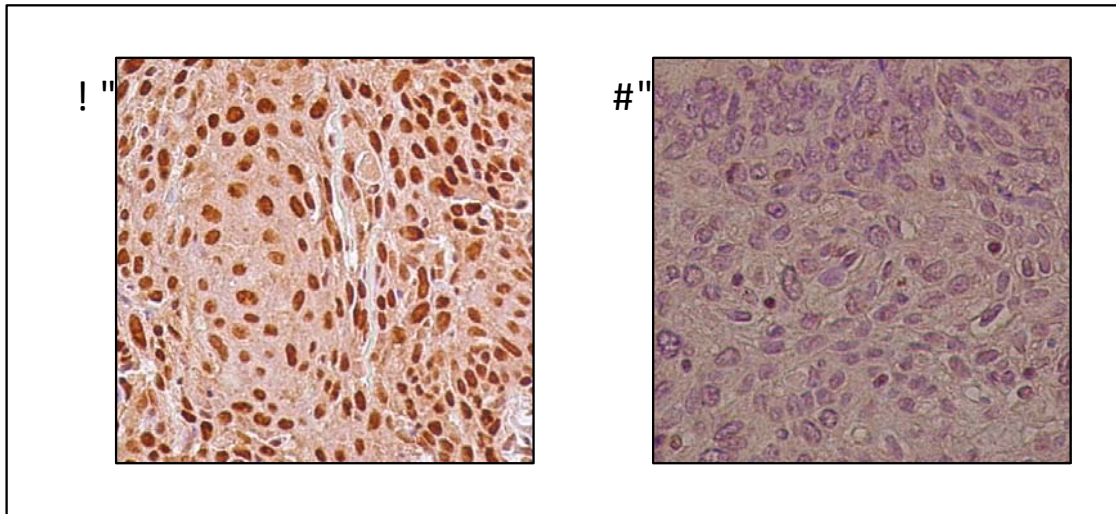


Figura 21 – Figura representativa da reação de imunohistoquímica contra a proteína MGMT. A, células de carcinoma epidermóide de pênis com expressão positiva para a proteína MGMT (marcação nuclear). B, carcinoma epidermóide de pênis sem expressão de MGMT.

Na análise estatística univariada, o padrão de expressão da proteína p16 não apresentou associação com nenhuma das variáveis clínicas e anatomopatológicas avaliadas (Tabela 8). Foi observada associação entre a redução dos níveis de expressão da proteína MGMT e a presença de comprometimento linfonodal, ao exame clínico ($p=0,010$), e a espessura do tumor maior do que 5mm ($p=0,036$) (Tabela 9). A análise da sobrevida câncer específica em cinco anos também não apresentou associação com o padrão de expressão das proteínas p16 e MGMT ($p=0,582$ e $p=0,298$; respectivamente) (Tabela 10).

Tabela 8 – Fatores clínicos e anatomopatológicos de acordo com a expressão da proteína p16 nos pacientes com câncer de pênis.

Variáveis	Expressão de p16		Valor de p
	negativa/fraca	moderada/forte	
Grau de diferenciação			0,175
bem diferenciado	22 (26,5%)	61 (73,5%)	
pouco diferenciado	83 (35,2%)	153 (64,8%)	
Estadiamento cT*			1,000
T1	11 (33,3%)	22 (66,7%)	
T2-T4	96 (33,2%)	193 (66,8%)	
Estadiamento cN*			0,552
N0	52 (31,9%)	111 (68,1%)	
N+	54 (35,3%)	99 (64,7%)	
Antecedentes venéreos			0,533
sem antecedentes	36 (32,7%)	74 (67,3%)	
com antecedentes	24 (27,9%)	62 (72,1%)	
Espessura do tumor			0,782
≤ 5mm	28 (33,7%)	55 (66,3%)	
> 5mm	67 (31,8%)	144 (68,2%)	
Invasão de corpo esponjoso			0,386
ausente	11 (42,3%)	15 (57,7%)	
presente	77 (33,2%)	155 (66,8%)	
Invasão de corpo cavernoso			0,888
ausente	30 (33,3%)	60 (66,7%)	
presente	50 (32,3%)	105 (67,7%)	
Infiltração de uretra			0,776
ausente	47 (34,8%)	88 (65,2%)	
presente	32 (36,8%)	55 (63,2%)	
Invasão vascular			0,204
ausente	66 (29,9%)	155 (70,1%)	
presente	30 (38,5%)	48 (61,5%)	
Invasão perineural			0,589
ausente	65 (30,8%)	146 (69,2%)	
presente	31 (34,4%)	59 (65,6%)	
Comprometimento linfonodal			0,481
negativo	80 (32,1%)	169 (67,9%)	
positivo	27 (37,0%)	46 (63,0%)	

* Estadiamento TNM (UICC-2002 – CID10 C60)

Tabela 9 – Fatores clínicos e anatomopatológicos de acordo com a expressão da proteína MGMT em pacientes com câncer de pênis.

Variáveis	Expressão de MGMT		Valor de p
	negativa/fraca	moderada/forte	
Grau de diferenciação			0,538
bem diferenciado	62 (89,9%)	7 (10,1%)	
pouco diferenciado	185 (86,4%)	29 (13,6%)	
Estadiamento cT*			0,358
T1	22 (81,5%)	5 (18,5%)	
T2-T4	227 (88,0%)	31 (12,0%)	
Estadiamento cN*			0,010
N0	113 (82,5%)	24 (17,5%)	
N+	132 (93,0%)	10 (7,0%)	
Antecedentes venéreos			0,337
sem antecedentes	93 (91,2%)	9 (8,8%)	
com antecedentes	65 (85,5%)	11 (14,5%)	
Espessura do tumor			0,036
≤ 5mm	61 (81,3%)	14 (18,7%)	
> 5mm	169 (90,9%)	17 (9,1%)	
Invasão de corpo esponjoso			0,206
ausente	18 (78,3%)	5 (21,7%)	
presente	183 (87,6%)	26 (12,4%)	
Invasão de corpo cavernoso			0,141
ausente	62 (81,6%)	14 (18,4%)	
presente	128 (89,5%)	15 (10,5%)	
Infiltração de uretra			0,655
ausente	102 (87,2%)	15 (12,8%)	
presente	71 (89,9%)	8 (10,1%)	
Invasão vascular			1,000
ausente	177 (88,1%)	24 (11,9%)	
presente	62 (88,6%)	8 (11,4%)	
Invasão perineural			0,840
ausente	164 (87,7%)	23 (12,3%)	
presente	74 (89,2%)	9 (10,8%)	
Comprometimento linfonodal			0,838
negativo	187 (87,0%)	28 (13,0%)	
positivo	62 (88,6%)	8 (11,4%)	
Metilação de MGMT			1,000
não metilado	43 (87,8%)	6 (12,2%)	
metilado	54 (88,5%)	7 (11,5%)	

* Estadiamento TNM (UICC-2002 – CID10 C60)

** Somente pacientes submetidos à linfadenectomia.

Tabela 10 – Probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica em 5 anos dos pacientes com carcinoma epidermóide de pênis de acordo com o padrão de expressão das proteínas p16 e MGMT.

Variável	Sobrevida em 5 anos		Valor de p
	Frequência	Porcentagem	
Expressão da proteína p16			0,582
negativa/fraca	87	81,3	
moderada/forte	181	84,2	
Expressão da proteína MGMT			0,298
negativa/fraca	206	82,7	
moderada/forte	32	88,9	

Uma vez que a presença de hipermetilação nas regiões promotoras de genes supressores de tumor acarreta o silenciamento gênico através da repressão da transcrição, foi avaliado efeito da presença de metilação aberrante no gene *MGMT* na expressão da proteína por ele codificada. No entanto, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre a presença da hipermetilação e a perda de expressão da proteína ($p=1,000$) (Tabela 11).

Tabela 11 – Expressão da proteína MGMT de acordo com a hipermetilação do gene *MGMT*.

Expressão da proteína MGMT	Metilação de <i>MGMT</i>		Valor de p
	não metilado	metilado	
negativa/fraca	43 (44,3%)	54 (55,7%)	1,000
moderada/forte	6 (46,2%)	7 (53,8%)	

5 DISCUSSÃO

O CE de pênis é uma neoplasia rara nos Estados Unidos e nos países europeus. Em determinados países da América do Sul, África e Ásia as taxas de incidência são maiores e provavelmente isso se deve à baixa condição sócio-econômica da população, que resulta em hábitos de higiene inadequados, um dos principais fatores de risco associado ao desenvolvimento dos tumores de pênis. Além disso, fatores como o número elevado de parceiros sexuais, que aumenta a exposição a infecções pelo HPV (presente em aproximadamente 50% dos casos), a ocorrência de fimose e a consumo de tabaco também conferem maior risco para os carcinomas de pênis. A proteção dessa neoplasia maligna pode ser alcançada, além de bons hábitos de higiene, com a circuncisão ao nascimento. Em Israel, cuja população judia masculina é submetida a esse procedimento, as taxas de tumores malignos em pênis é praticamente nula (MINHAS et al. 2010; POW-SANG et al. 2010). Estudos indicam que o fator protetor da postectomia reduz de acordo com o aumento da idade em que foi realizada. A determinação do prognóstico de pacientes com CE de pênis, atualmente, baseia-se na avaliação de variáveis clínicas e anatomopatológicas dos pacientes no momento do diagnóstico e após a ressecção da lesão maligna. Um dos principais fatores prognósticos no momento do diagnóstico é a presença de linfonodomegalia ao exame clínico (FICARRA et al. 2010).

A presença de comprometimento linfonodal está associada com a redução da sobrevida. Pacientes com linfonodos palpáveis no momento do diagnóstico apresentam

probabilidade acumulada de sobrevida livre de doença em torno de 38% a 52%, bem menor do que a observada em pacientes negativos (70% a 93%). Apesar da importância dessa variável clínica para o estabelecimento do prognóstico, a avaliação clínica da linfonodomegalia apresenta baixa acurácia. Apenas metade dos pacientes com linfonodos positivos ao exame clínico apresentam metástases ao exame patológico (falsos-positivo). A taxa de falsos-negativo também é considerável, em média 20% dos pacientes clinicamente negativos apresentam micrometástases se submetidos a linfadenectomia. Esse processo é considerado até o momento o mais preciso na determinação da presença de metástases linfonodais. Porém, devido às frequentes morbidades associadas ao procedimento, diversos pacientes não se beneficiariam desse tratamento. A busca de marcadores moleculares que pudessem prever quais pacientes apresentam maior risco para o de disseminação linfática do CE de pênis poderia auxiliar no delineamento da conduta terapêutica mais adequada para cada caso (LOPES et al. 1996; FICARRA et al. 2002).

No presente estudo, foram avaliadas variáveis clínicas e anatomopatológicas que poderiam estar associadas com a ocorrência de metástases linfonodais e com o prognóstico de 351 pacientes com diagnósticos de CE de pênis. Todos os pacientes selecionados tinham seguimento de pelo menos 5 anos.

O comprometimento linfonodal foi observado com maior frequência em pacientes com tumores pouco diferenciados ($p < 0,001$) e em estágio avançado (T2, T3 ou T4) ($p = 0,010$); que apresentavam linfonodos palpáveis ($p < 0,001$); com invasão de corpos cavernosos ($p < 0,001$), de uretra ($p < 0,001$), vascular ($p < 0,001$) e perineural ($p < 0,001$). Pacientes que apresentavam invasão do corpo esponjoso também

desenvolveram com maior frequência metástases em linfonodos, no entanto a diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,053$). Porém, somente o grau de diferenciação do tumor, o estadio N clínico e a invasão perineural se mostraram fatores independentes de risco para o desenvolvimento de metástases linfonodais.

A probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica em cinco anos (82,4%) foi influenciada negativamente pelo estadio N clínico e patológico positivos ($p<0,001$), pelo baixo grau de diferenciação do tumor ($p<0,001$), pela invasão dos corpos cavernosos ($p=0,039$), pela presença de invasão vascular ($p=0,003$) e perineural ($p<0,001$) e pela ocorrência de recidivas tumorais ($p<0,001$). No entanto, somente o estadio N clínico, o grau de diferenciação e a invasão perineural se mostraram fatores independentes de risco aumentado para morte devido ao câncer.

Diversos estudos com o objetivo de determinar fatores prognósticos para os CEs de pênis observaram que as mesmas variáveis podem influenciar a ocorrência e metástases linfonodais e a sobrevida dos pacientes. GUIMARÃES et al. (2007), verificaram que fatores como o estadio N clínico, a presença de invasão vascular e a invasão de corpos cavernosos estão associados significativamente com o comprometimento linfonodal. Na análise multivariada, a invasão vascular e o estadio N clínico se mostraram variáveis independentes de risco para o comprometimento linfonodal. A sobrevida câncer específica dos pacientes em cinco anos foi de 74,2%, sendo que pacientes com estadio N clínico e patológico positivos, invasão vascular, infiltração de uretra e de corpos cavernosos tiveram redução na sobrevida. No entanto, somente a infiltração de uretra e a presença de metástase linfonodal se mostraram fatores de risco independentes para morte devido à doença.

Em um estudo que avaliou os níveis de expressão da p53 em câncer de pênis e que indicou a sua imunorreatividade como fator de risco independente para o desenvolvimento de metástase em linfonodos, os autores ainda verificaram a influência de variáveis clínicas e anatomopatológicas. Assim como no atual estudo, pacientes com estadio N clínico positivo, tumor com espessura maior que 5mm e com invasão vascular apresentaram comprometimento linfonodal com maior frequência, sendo que a última mostrou-se fator de risco independente (LOPES et al. 2002). O mesmo autor havia identificado que os mesmos fatores estavam associados com o desenvolvimento de metástase linfonodal em um estudo anterior (LOPES et al. 1996).

O estadio avançado, o baixo grau de diferenciação, a presença de invasão vascular, perineural e de corpos cavernosos, também foram observados por ORNELLAS et al. (2008) como fatores associados ao comprometimento linfonodal em 196 pacientes com CE de pênis. No entanto, somente a invasão vascular se mostrou um fator independente associado a maior risco para acometimento dos linfonodos por células tumorais. A probabilidade acumulada de sobrevida foi menor para os pacientes sem invasão vascular.

No estudo de VELAZQUEZ et al. (2008), além do baixo grau de diferenciação do tumor, a invasão perineural foi importante quando foram avaliados os fatores de risco para metástases linfonodais.

FICARRA et al. (2005) descreveram resultados bastante semelhantes aos encontrados pelo presente estudo. Após avaliar dados epidemiológicos, clínicos e anatomopatológicos de 175 pacientes, foi verificada associação entre o status linfonodal e a espessura do tumor; o grau de diferenciação da lesão; a presença de invasão vascular,

de corpos cavernosos, do corpo esponjoso e da uretra; e o estadiamento T. Dentre estes fatores, o estadiamento T, a invasão vascular e o grau de diferenciação se mostraram fatores independentes para maior risco de desenvolver metástases linfonodais.

Parece consenso que fatores como estadiamento do tumor, baixo grau de diferenciação e invasão de estruturas penianas e da rede vascular estão associadas com o comprometimento dos linfonodos em pacientes com CE de pênis. No entanto, os diversos estudos que buscam fatores para predição do prognóstico em pacientes com esse tipo de neoplasia não foram capazes de fornecer um ou um conjunto de fatores clínicos e das características tumorais que possam predizer com acurácia qual será a evolução da doença. Durante as análises estatísticas univariadas, vários fatores aparecem associados a pacientes com linfonodos positivos. Porém, poucos deles se mostram independentes para predição de risco nas análises multivariadas. Provavelmente, uma única variável não é suficiente para a determinação do prognóstico de pacientes com câncer de pênis e sim um conjunto de características clínicas e patológicas que permita separar tumores sem capacidade de metástase daqueles mais agressivos. Foi com esse intuito que FICARRA et al. (2006) criaram um nomograma para determinar a probabilidade de cada paciente apresentar comprometimento de linfonodos. O nomograma leva em consideração fatores como espessura do tumor, padrão de crescimento e invasão vascular e de estruturas adjacentes. Os mesmos fatores foram levados em consideração para o desenho de um nomograma para predição da sobrevida câncer específica em 5 anos (KATTAN et al. 2006). Os nomogramas fornecem predições bastante realistas, porém ainda não precisas o suficiente para serem aplicados no delineamento do tratamento dos pacientes. Pacientes com linfonodos palpáveis ao

exame clínico são submetidos à linfadenectomia e aqueles negativos são apenas acompanhados até que o procedimento se faça necessário.

Dessa forma, ainda é necessária a identificação de marcadores moleculares de prognóstico para evitar que pacientes falso-positivos sofram com as morbidades decorrentes da retirada das cadeias linfonodais e para que pacientes clinicamente negativos, mas que apresentem micrometástases, possam receber tratamento adequado e acompanhado de melhora na sobrevida. Dentre os 351 pacientes deste estudo, 158 foram submetidos à linfadenectomia como medida profilática ou devido à detecção de linfonodos palpáveis. No primeiro grupo, o procedimento se mostrou desnecessário em 82,5% dos casos, já que nenhum linfonodo foi positivo ao exame patológico. No segundo grupo, praticamente um terço dos pacientes não apresentou comprometimento linfonodal e a linfonomegalia provavelmente foi causada por outros motivos. Fica claro, assim a necessidade de estudos para a elucidação dos mecanismos moleculares que estão desregulados no CE de pênis e que possam influenciar diretamente na determinação do prognóstico e delineamento do tratamento.

Pouco se sabe a respeito dos fatores moleculares envolvidos na tumorigênese das neoplasias penianas. Trata-se de um tumor raro em países desenvolvidos e por isso é negligenciada quanto aos estudos a respeito de sua biologia molecular. Dentre os poucos estudos envolvendo a identificação de marcadores moleculares, a maioria avalia alterações nos níveis de expressão de proteínas através de ensaios imunistoquímicos. Poucos estudos empregam abordagens de biologia molecular na busca de mutações, deleções, padrão de expressão e hipermetilação e RNAs não codificantes que possam estar associadas com o prognóstico dos pacientes. Nesse contexto, o presente estudo

visou avaliar o padrão de hipermetilação nos promotores de dois genes, sabidamente envolvidos na progressão tumoral de diversos tipos de câncer, na tentativa de contribuir para o maior conhecimento da biologia dos CEs de pênis.

A hipermetilação ou metilação aberrante do DNA é o evento epigenético mais amplamente estudado nas neoplasias malignas. Possui um papel importante na tumorigênese pois está associado com o silenciamento de diversos genes supressores de tumor e de genes inibidores da expressão de oncogenes, levando à alterações no controle da proliferação celular, do reparo a danos ao DNA e da apoptose. A hipermetilação também está associada à instabilidade genômica e maior frequência de mutações, uma vez que pode levar ao silenciamento de genes que atuam nas vias de reparo ao DNA. Outros eventos epigenéticos também são observados com bastante frequência nas neoplasias malignas. Pode-se observar em diversos tumores uma hipometilação global do genoma, acarretando instabilidade genômica principalmente devido à ativação de elementos repetitivos e móveis (transposons), além da expressão de genes normalmente silenciados e que conferem à células maior capacidade de proliferação e proteção contra mecanismos apoptóticos (BERDASCO e ESTELLER 2010; TABY e ISSA 2010).

Inicialmente, acreditava-se que a transformação de células normais em células neoplásicas dependia exclusivamente do acúmulo de alterações genéticas adquiridas e que conferiam às células vantagens proliferativas e de sobrevivência. No entanto, já se sabe que as alterações epigenéticas têm a mesma importância que mutações e deleções durante a progressão tumoral. A hipermetilação de promotores gênicos é a alteração inicial que silencia um dos alelos de genes supressores de tumor em cânceres esporádicos. Nesses casos, a inativação do segundo alelo também pode ocorrer devido à

metilação aberrante de seu promotor. Tumores hereditários podem ter sua origem devido a mutações ou deleções como a primeira alteração, seguida de inativação da segunda cópia do gene por hipermetilação. Por essa razão, a metilação de promotores gênicos é considerada um dos eventos da hipótese de Knudson (BAYLIN 2005; BERDASCO e ESTELLER 2010). Por essa razão, o estudo do perfil de hipermetilação de diferentes tipos tumorais tem sido foco de inúmeros estudos nas últimas duas décadas, na tentativa de estabelecer quais genes estão envolvidos no processo de tumorigênese.

A identificação do padrão de hipermetilação tem algumas vantagens quando comparada à busca de alterações genéticas nos tumores. A metilação é um processo estável, tanto quimicamente quanto biologicamente, permitindo a utilização de amostras incluídas em parafina (material abundante nos diversos centros oncológicos), amostras de plasma e outros fluidos corporais. Além disso, trata-se da busca de um sinal positivo, oposto ao esperado em um estudo para identificar a perda de heterozigose, por exemplo. Neste último caso o resultado final esperado pode ser mal interpretado devido à contaminação com células normais do tecido adjacente. Outra vantagem diz respeito ao imenso número de alterações genéticas que podem ocorrer na sequência de um único gene e que devem ser avaliadas para a determinação do perfil de determinado tipo tumoral. A hipermetilação apresenta um único padrão para cada gene avaliado, tornando menos laborioso o estudo de diversos genes, uma vez que uma única reação é suficiente para identificar os sítios CpG metilados. Mutações ou deleções não são específicas num mesmo tipo tumoral e demandam a busca desses eventos ao longo de toda a sequência. A busca de marcadores epigenéticos também apresenta uma vantagem com relação aos estudos que visam estabelecer perfis de expressão tumoral, pois nesses casos o material

empregado é o RNA, molécula bastante instável quimicamente para obtenção a partir de fluidos corporais ou de amostras incluídas em parafina (ZHU e YAO 2007; TABY e ISSA 2010).

Outro fator que tem tornado as alterações epigenéticas alvo crescente de estudos é a sua reversibilidade. Tanto a hipermetilação quanto os eventos que alteram a conformação da cromatina (ex.: deacetilação de histonas) podem ser revertidos com o uso de agentes desmetilantes e inibidores das histonas deacetilases (HDAC), respectivamente. A utilização de “terapias epigenéticas” busca reverter o quadro aberrante e restituir um quadro epigenético normal. Resultados bastante promissores já foram descritos com relação ao tratamento da síndrome mielodisplásica com os agentes desmetilantes 5-aza-citidina e 5-aza-deoxicitidina. Outras neoplasias hematológicas também apresentaram boa resposta quando tratadas com as mesmas drogas. No entanto, ainda é necessária a especificação da dose correta, uma vez que diversos efeitos citotóxicos estão associados à administração desses agentes (SHARMA et al. 2010; TABY e ISSA 2010).

Diversas abordagens podem ser empregadas na avaliação do padrão de hipermetilação. Nesse estudo a presença de metilação aberrante foi determinada através do sequenciamento de regiões específicas nos promotores gênicos através da técnica de pirosequenciamento. Trata-se de uma técnica quantitativa e bastante sensível para determinação dos níveis de hipermetilação. Quando comparada a outras abordagens clássicas empregadas na avaliação da metilação de promotores gênicos o pirosequenciamento apresenta algumas vantagens, sendo que dentre elas as principais são a possibilidade de inserir um controle interno para verificação da eficiência do

tratamento com bissulfito de sódio, oligonucleotídeos desenhados para anelamento em regiões livres de dinucleotídeos CpG e por se tratar de uma técnica que permite a análise de amostras em larga escala. A possibilidade de inserir um controle interno durante o sequenciamento permite identificar as amostras cuja conversão das citosinas não metiladas não foi eficiente, tal passo só se faz possível na técnica de pirosequenciamento. O controle interno reduz o número de falso-positivos entre os casos avaliados, aumentando a especificidade do teste. A sensibilidade, por sua vez, é maior do que em outras abordagens pois os oligonucleotídeos são desenhados em regiões livres de dinucleotídeos CpG. Dessa maneira, todos os fragmentos de DNA eficientemente convertidos durante o tratamento com bissulfito de sódio são amplificados e sequenciados, permitindo melhor avaliação dos sítios CpG escolhidos. Finalmente, a análise em larga escala é possível através dessa abordagem, uma vez que não requer clonagem e sequenciamento de dezenas de clones para estimativa aproximada dos níveis de hipermetilação, etapas necessárias quando empregado o sequenciamento através do método de Sanger (PASQUALI et al. 2007; TOST e GUT 2007).

Nesse estudo, as amostras foram sequenciadas uma única vez, ou seja, não foram realizadas replicatas. A opção pela realização de uma única reação de sequenciamento foi acompanhada da determinação de uma linha de corte de 15% para que a metilação fosse considerada relevante. A determinação do nível de corte foi aleatória e visou eliminar os casos cuja luminescência basal e artefatos da técnica pudessem interferir na interpretação dos resultados. Além disso, COLELLA et al. (2003) demonstraram que existe alta concordância entre as replicatas.

Outro fator que levou à realização de uma única reação de sequenciamento para cada caso foi a utilização de amostras de DNA extraídas de tecido fixado e incluído em parafina. Por se tratar de material escasso, bastante degradado pelo processo de fixação em formalina e contaminado com diversas substâncias que inibem a PCR (ZSIKLA et al. 2004), o sucesso das reações de amplificação e sequenciamento só é atingido com a utilização de grandes quantidades de amostra. A extração de DNA de qualidade a partir de material embebido em parafina é bastante laboriosa, envolvendo etapas de desparafinização, digestão de membranas e proteínas com proteinase K e purificação do material com fenol-clorofórmio e precipitação com etanol.

Devido à fixação do tecido em formalina, antes da inclusão na parafina, ocorre degradação de ácidos nucleicos pois o formaldeído presente no fixador é convertido em ácido fórmico, levando à hidrólise das moléculas de DNA e RNA (SATO et al. 2001; ZSIKLA et al. 2004). Outro efeito negativo da fixação é a indução da formação de ligações cruzadas entre o DNA e proteínas presentes na amostra, impedindo a degradação proteica eficiente pela proteinase K empregada durante o processo de obtenção do DNA (GILLESPIE et al. 2002; WU et al. 2002). No entanto, a formalina é um dos fixadores mais empregados nos laboratórios de patologia para fixação dos tecidos, principalmente devido ao fácil manuseio, baixa toxicidade, baixo custo, manutenção da morfologia celular e estrutura tecidual e por possibilitar o emprego de ensaios imunistoquímicos (ZSIKLA et al. 2004). Alguns fatores podem diminuir os danos causados aos ácidos nucleicos durante o processo de fixação. A utilização de formalina tamponada a 10% e a redução no tempo de fixação permitem a obtenção de DNA de melhor qualidade e viável para a amplificação de fragmentos mais longos.

Quanto maior o tempo que a amostra permanece no fixador menor é o tamanho dos fragmentos que podem ser amplificados por PCR (GREER et al. 1991; LEGRAND et al. 2002). Geralmente, a amplificação de fragmentos menores, em torno de 200 a 250 pares de base, apresenta maiores taxas de sucesso quando comparada à amplificação de fragmentos com mais de 500 pares de base (GREER et al. 1991).

O tempo de conservação das amostras é bastante controverso quanto ao seu efeito sobre a degradação do DNA. É consenso que mesmo após a fixação e inclusão em parafina o RNA sofre degradação, que é proporcional ao tempo em que a amostra encontra-se fixada. No entanto, estudos relatam resultados discrepantes quanto à degradação do DNA. Alguns grupos descrevem a impossibilidade de amplificar amostras com mais de 15 anos de conservação, enquanto outros conseguem com sucesso a amplificação de amostras embebidas em parafina pelo mesmo período (LEGRAND et al. 2002; WU et al. 2002).

Neste estudo, a extração do DNA de tumores fixados e incluídos em parafina foi realizada através das etapas de desparafinização com xilol, digestão com proteinase K e purificação com fenol-clorofórmio. As amostras selecionadas para a avaliação do padrão de hipermetilação incluíram amostras de pacientes tratados entre os anos de 1953 e 2004. Além disso, amostras fixadas em formalina não tamponada e outras fixadas em formalina tamponada a 10% faziam parte da casuística. Das 128 amostras selecionadas, foi possível obter amostras de DNA de todas, as quais foram submetidas a amplificação e sequenciamento com sucesso. Todas as PCRs para amplificação dos fragmentos alvo foram realizadas com quantidades previamente otimizadas para obtenção de sequências de qualidade para quantificação dos níveis de hipermetilação. O sucesso na utilização de

amostras tão antigas e fixadas em formalina não tamponada posse ser explicada pelo tamanho dos fragmentos amplificados e sequenciados. Todos os fragmentos alvo para as PCRs apresentavam aproximadamente 100 pares de base. Sabe-se que o sucesso da amplificação do DNA de tecidos incluídos em parafina depende do tamanho do fragmento alvo. AN e FLEMING (1991) verificaram que a amplificação é possível em 100% dos casos quando o tamanho do fragmento é de até 200 pares de base. Além disso, o tempo de digestão com proteinase K também pode ter contribuído para a obtenção de DNA de melhor qualidade. Possivelmente, a exposição do tecido por tempo prolongado à enzima permitiu a degradação das proteínas bem como a desestruturação das ligações cruzadas destas com o DNA. Com isso foi possível prosseguir com as análises moleculares para determinação do perfil de hipermetilação dos CEs de pênis.

Apesar dos inúmeros estudos para identificação de genes alvo da hipermetilação e de seu claro papel na inativação de genes que regulam mecanismos importantes para a manutenção da normalidade celular, até o momento não está esclarecido qual a razão pela qual alguns genes são alvos de metilação aberrante em certos tipos tumorais, enquanto outros, algumas vezes envolvidos nos mesmos mecanismos, permanecem livres de eventos epigenéticos. Sabe-se que cada tipo tumoral apresenta um perfil de hipermetilação específico, como uma assinatura epigenética, possibilitando sua identificação através da análise do status de metilação de grupos de genes previamente determinados. Porém o que determina qual gene é alvo das enzimas DNA metiltransferases ainda não foi estabelecido (ESTELLER et al. 2001; FEINBERG et al. 2006; BERDASCO e ESTELLER 2010).

Ainda não existe nenhum perfil de hipermetilação estabelecido para os CEs de pênis. Pouquíssimos estudos avaliaram o perfil de metilação para essa neoplasia, e na maioria dos casos o número de amostras avaliadas era bastante reduzido, variando de 3 a 53 amostras. Até o momento foram avaliados 9 genes quanto ao seu status de metilação: *CDKN2A*, *DAPK*, *FHIT*, *MGMT*, *P14^{ARF}*, *RAR β* , *RASSF1A*, *RUNX3* e *TSP-1* (FERREUX et al. 2003; SOUFIR et al. 2007; GUERRERO et al. 2008; YANAGAWA et al. 2008; POETSCH et al. 2011). A associação da hipermetilação com fatores clínicos e anatomopatológicos de prognóstico foi observada somente para os genes, *CDKN2A*, *TSP-1* e *RASSF1A*.

No presente estudo foram avaliados os perfis de hipermetilação dos promotores dos genes *CDKN2A* e *MGMT*. Esses dois genes foram selecionados pois já foram amplamente avaliados em diversos tipos tumorais e a presença de radicais metil nos sítios CpG de seus promotores está associada ao silenciamento de ambos os genes. Além disso, diversos estudos correlacionaram a hipermetilação desses genes com fatores de mau prognóstico para os pacientes.

A hipermetilação dos genes *CDKN2A* e *MGMT* já foi descrita nos tumores colorretais, gliomas, câncer de pulmão, CE de cabeça e pescoço, mieloma múltiplo, hepatocarcinomas, dentre outros tipos tumorais. A frequência de detecção de metilação aberrante no promotor dos dois genes é bastante variável, em torno de 5% a 60% para ambos os genes. O papel da sua perda de expressão através desse processo epigenético também é bastante controverso, sendo que alguns estudos indicam que a metilação está associada a pior prognóstico podendo acarretar até redução da sobrevida e outros não

verificaram qualquer influência no prognóstico dos pacientes (SAFAR et al. 2005; CAO et al. 2009; TETIKKURT et al. 2010; SHIMA et al. 2011).

No presente estudo, 128 amostras foram avaliadas quanto ao seu padrão de hipermetilação para os genes *CDKN2A* e *MGMT*. Não foi observada hipermetilação do gene *CDKN2A* em nenhuma das amostras, e o gene *MGMT* apresentou hipermetilação em 52,4% das amostras.

O papel prognóstico da hipermetilação do gene *CDKN2A* no câncer de pênis já foi avaliado e sua frequência variou de 0% a 38%, sem qualquer associação com a evolução da doença ou com a sobrevida dos pacientes (FERREUX et al. 2003; SOUFIR et al. 2007; GUERRERO et al. 2008; YANAGAWA et al. 2008). Em um estudo recente, POETSCH et al. (2011) avaliaram o padrão de hipermetilação desse mesmo gene em 52 amostras de CEs de pênis, das quais 22 (42%) apresentaram-se hipermetiladas. Nesses pacientes a ocorrência de metástases linfonodais foi mais frequente quando comparados aos pacientes sem alterações epigenéticas no promotor do gene *CDKN2A*. Os autores observaram que a presença de radicais metil no promotor gênico estava associada com a redução da expressão da proteína p16 nos ensaios imunohistoquímicos.

A ausência de hipermetilação no gene *CDKN2A*, nas amostras deste estudo, levanta duas hipóteses. A primeira é a de que a metilação aberrante desse gene não é essencial durante a tumorigênese dos carcinomas de pênis. No entanto, os estudos citados anteriormente detectaram a presença da metilação aberrante e em um deles o silenciamento através da hipermetilação esteve associada a um fator de mau prognóstico. A segunda hipótese, mais provável, baseia-se no fato que a hipermetilação ocorre em sítios CpG específicos. No presente estudo, foram avaliados somente 7 sítios CpG e que

podem não estar metilados nos tumores de pênis. Caso a metilação aberrante não ocorra nos sítios considerados críticos, a presença de radicais metil em dinucleotídeos CpG não é capaz de inibir a transcrição. A avaliação de outros dinucleotídeos da região promotora poderia esclarecer o papel da hipermetilação do gene *CDKN2A* na progressão dessas neoplasias malignas, bem como a região alvo desse evento nos carcinomas de pênis (IVANOVA et al. 2007).

A frequência de metilação observada para o gene *MGMT* está de acordo com aquelas descritas em vários estudos com outros tipos tumorais. Até o momento, um único estudo avaliou a hipermetilação desse gene em CE de pênis. Os autores encontraram hipermetilação em 20% das amostras (n=25) sem associação com fatores clínicos ou anatomopatológicos dos tumores (YANAGAWA et al. 2008). Da mesma maneira, a hipermetilação de *MGMT* também não esteve associada com o prognóstico dos pacientes deste estudo. A sobrevida câncer específica também não foi influenciada pela alteração epigenética.

Não foi verificada associação entre a hipermetilação do gene *MGMT* e a perda de expressão da proteína. A hipermetilação e a perda de expressão foram observadas em 49,1% das amostras avaliadas. A maioria das amostras deste estudo apresentaram perda de expressão da proteína *MGMT*. Dentre estes casos apenas 55,7% encontravam-se metiladas, sugerindo que outros mecanismos, além da metilação aberrante, levam à inativação dessa via de reparo. Além disso, a presença da metilação nas amostras com expressão proteica positiva, indica que a hipermetilação por si só não é suficiente para levar ao silenciamento gênico. Outros mecanismos epigenéticos, principalmente associados à alteração da conformação da cromatina, também devam ocorrer

concomitantemente para que haja supressão da expressão gênica. Nos casos em que se observa a hipermetilação com níveis normais de expressão, seria interessante verificar os níveis de expressão das histonas deacetilases, já que seu aumento de expressão inibe a acetilação das histonas impedindo a condensação da cromatina.

A avaliação imunistoquímica dos níveis da proteína p16 indicou que apenas um terço dos casos deste estudo apresentam perda de expressão. A proteína p16, em células normais, atua no controle do ciclo celular impedindo a formação do complexo ciclina D/Cdk4 e Cdk6, inibindo dessa maneira a hiperfosforilação de pRB e a progressão do ciclo celular. A inativação do gene *CDKN2A*, por eventos genéticos ou epigenéticos, leva à proliferação celular descontrolada (MOHSENY et al. 2010). Nesse estudo, a perda da proteína p16 em 33,2% dos casos, sugere que na maior parte dos CEs de pênis avaliados outro mecanismo é responsável pela perda do controle da proliferação celular ou que outros componentes da mesma via estão alterados.

Diversos estudos já descreveram o aumento de expressão da proteína p16 em diferentes tipos tumorais. Nos tumores cervicais, cuja incidência da infecção pelo HPV é de quase 100%, observa-se aumento de expressão da proteína p16. Esse fato se explica pelo papel da oncoproteína viral E7 que induz a degradação de pRb pelo proteasoma. O aumento de p16 nesses casos ocorre devido à ausência da proteína pRb que regula sua transcrição através de um mecanismo de *feedback*. No entanto, devido à ausência de pRb funcional a proteína p16 não é capaz de induzir a parada do ciclo celular em G1 (IVANOVA et al. 2007). Sabe-se que em aproximadamente 30% das amostras de CE de pênis ocorre infecção por HPVs de alto risco, principalmente do tipo 16. Nesses casos, espera-se que a expressão da proteína p16 esteja aumentada.

POETSCH et al. (2011), avaliaram o papel da hipermetilação e da perda de heterozigose (LOH – *loss of heterozygosity*) no silenciamento do gene *CDKN2A* nos tumores de pênis e a expressão da proteína p16 e sua associação com a infecção pelo HPV e a expressão da proteína p53. Os autores observaram hipermetilação do gene *CDKN2A* em 42% dos casos e LOH em 62%. Houve associação significativa entre a ocorrência desses dois eventos e a perda de expressão da proteína, sendo que todos os casos negativos para p16 apresentaram metilação no promotor ou LOH. A perda de expressão da proteína p16 ocorreu em 75% dos casos hipermetilados. Em 35,8% das amostra foi detectada infecção pelo HPV. Dentre as 17 amostras infectadas pelo HPV16, dez apresentaram aumento de expressão da proteína p16. Em 56% dos casos com expressão positiva ou aumentada da proteína não foi detectado DNA do vírus. Dessa forma os autores sugerem que a hipermetilação é um evento importante no silenciamento gênico de *CDKN2A* e que o aumento de expressão de p16 não está obrigatoriamente associado à infecção pelo HPV, sendo que nos casos com ganho de expressão outro mecanismo deve estar envolvido.

Em outro estudo recente, CUBILLA et al. (2011) investigaram a associação entre a infecção pelo HPV e a expressão da proteína p16. Foram avaliadas 202 amostras de câncer de pênis, das quais 31% apresentaram infecção pelo HPV e 26% tinham expressão positiva de p16, sendo que houve associação significativa entre os dois achados. Os autores também observaram que os níveis de expressão de p16 estavam associados com os subtipos histológicos de CE de pênis, cuja expressão positiva foi mais frequente nos subtipos basalóide e condilomatoso. A expressão de p16 foi considerada um marcador para a infecção pelo HPV, uma vez que em 80% das casos observou-se

concordância entre a perda ou ganho de expressão proteica e a ausência ou presença da infecção, respectivamente. Nos casos discordantes, foram levantadas duas hipóteses. A presença do HPV em amostras com perda de expressão de p16, sugere a ocorrência de infecção transiente nas quais o mecanismo de silenciamento do gene *CDKN2A* é consequência de eventos epigenéticos ou LOH. Já nos casos negativos para infecção pelo HPV e positivos para a proteína p16, a tumorigênese seria independente da via induzida pelo vírus e alterações em outros componentes da via de pRb estariam envolvidas.

STANKIEWICZ et al. (2011) também avaliaram a infecção pelo HPV e a expressão de p16, bem como de p53, pRb e p21 (inibidor de Cdks da família Cip), em CE de pênis. A presença do vírus foi detectada em 56% dos casos, com prevalência do subtipo 16. Os níveis de expressão de pRb estavam elevados em 58% dos casos. As proteínas p16 e p21 foram detectadas em 47% e 62% dos tumores, respectivamente, com associação positiva entre os níveis de expressão. A perda de expressão dessas duas proteínas foi associada com o ganho de pRb. A proteína p53 foi detectada em 79% dos casos, sem nenhuma associação com a expressão das demais proteínas ou com características patológicas dos tumores. Devido à associação inversa entre a expressão de pRb e p16, os autores sugerem que nos casos HPV positivos há regulação negativa da via pRb/p16, levando ao acúmulo de p16 que é incapaz de bloquear a progressão do ciclo celular, devido a ausência de pRb.

No nosso estudo, 66,8% dos casos de CE de pênis apresentaram expressão positiva da proteína p16. O aumento de expressão de p16 já foi verificado também em outros tipos tumorais: cavidade oral, carcinomas uroteliais, neuroblastomas, câncer de

próstata, tumores gastrointestinais e osteosarcomas. Diversos fatores podem estar envolvidos na positividade ou ganho de expressão dessa proteína. A perda de expressão de pRb é uma delas, já que, como dito anteriormente, esta última participa do controle da transcrição do gene *CDKN2A*. Além disso, poliploidia do cromossomo 9 ou amplificação da região 9p21 também podem ocorrer e elevar os níveis da proteína. Também não pode ser descartada o aumento de p16 como resposta à proliferação acelerada, o que poderia resultar em síntese da proteína com meia-vida mais longa (NAKAZAWA et al. 2009). No entanto, níveis elevados de p16 não implica obrigatoriamente que a via Rb esteja induzindo a parada do ciclo celular. Mutações no gene *CDKN2A* podem levar à síntese de uma proteína não funcional, incapaz de impedir a formação dos complexos ciclina D/Cdk e consequente hiperfosforilação de pRb (CHIN et al. 1998; OMURA-MINAMISAWA et al. 2001). Dessa forma, a detecção de níveis aumentados da proteína p16 deve ser avaliada em conjunto com possíveis alterações genéticas e citogenéticas do gene e da região cromossômica em que este se localiza.

Além disso, a presença da proteína p16 dentro de um contexto que sugere a perda do controle da via pRb sugere que outros componentes da via podem estar alterados. O aumento de expressão de ciclinas D e das Cdk4 e 6 podem levar à hiperfosforilação de pRb mesmo na presença de níveis normais da proteína inibitória de Cdks. Diversos estudos já relataram a amplificação da *CICLINA D1* e da *CDK4* e mutações no gene codificador de *CDK4* (CHIN et al. 1998).

O aumento de expressão da proteína p16, portanto, deve ser seguida da avaliação de outros componentes da via de pRb. Mas outros componentes das vias de controle do ciclo celular que regulam a atividade dos complexos ciclina D/Cdk também devem ser

avaliados. A via de pRb está intimamente associada à expressão de p53. Um dos alvos transcricionais dos fatores da família E2F é o gene $P14^{ARF}$. Esse gene também está localizado em 9p21, assim como $CDKN2A$. Trata-se de um locus com uma característica peculiar, a de codificar dois genes formados por três exons, cujo primeiro é único para cada gene e que compartilham o segundo e o terceiro exon. As sequências dos dois produtos gênicos são distintos, apesar dos dois exons comuns, pois devido ao primeiro exon ser particular de cada gene isso gera janelas de leituras distintas dos exons subsequentes, levando à codificação de proteínas diferentes e com funções específicas distintas (ROBERTSON e JONES 1999). A função da proteína p14 é inibir a atividade MDM2 que induz a degradação de p53 pelo proteasoma. O gene p53, por sua vez, estimula a atividade de p21 que, assim como p16, atua inibindo a atividade dos complexos ciclina D/Cdk (JAYASURYA et al. 2005). Dessa maneira, a expressão de p16 resultaria em redução da expressão de p14 e de p53, culminando na redução dos níveis de p21. Possivelmente, em diversos tipos tumorais somente a atividade inibitória de p16 sobre os complexos ciclina D/Cdk seja insuficiente para bloquear o ciclo celular e impedir o crescimento do tumor.

Para que se possa estabelecer o significado do padrão de expressão da proteína p16 nos CEs de pênis deste estudo ainda se faz necessária a avaliação de outros componentes do controle do ciclo celular, visando determinar o padrão de alterações nesses tumores e a via mais importante na progressão dessas neoplasias.

O presente estudo corroborou estudos anteriores, demonstrando que fatores clínicos e anatomopatológicos são importantes para o estabelecimento do prognóstico dos pacientes com CE de pênis. Também foi demonstrado que a hipermetilação é um

evento presente nos tumores de pênis, apesar de não ter sido associada com fatores clínicos de prognóstico. Possivelmente, a avaliação da hipermetilação em um número maior de genes leve à determinação de um painel de genes alvo desse evento nos carcinomas de pênis e que possa ser empregado como marcador molecular nessas neoplasias. Além disso, esse estudo sugere que a via pRb apresentar alterações em componentes *downstream* a p16.

No entanto, devido à escassez de estudos a respeito das características moleculares desse tipo de neoplasia, poucas conclusões podem ser feitas a partir dos atuais resultados. A maior parte das informações é obtida a partir de resultados e associações observadas em outros tipos tumorais. Por essa razão, faz-se necessário o aumento de esforço em busca das alterações moleculares envolvidas na progressão dos CEs de pênis, visando o melhor entendimento da doença e o estabelecimento de abordagens terapêuticas adequadas.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos com as análises dos fatores clínicos e anatomopatológicos, de hipermetilação e de expressão protéica podemos concluir que:

1. As variáveis clínicas e anatomopatológicas associadas ao comprometimento linfonodal foram: baixo grau de diferenciação, estadio T avançado, linfonodos palpáveis ao diagnóstico, invasão de corpos cavernosos, infiltração de uretra, invasão vascular e invasão perineural. No entanto, somente o grau de diferenciação, o estadiamento N clínico e a invasão perineural permaneceram como fatores independentes de risco após as análises multivariadas. Os fatores associados à redução da probabilidade acumulada de sobrevida foram: estadio N clínico e patológico positivos, baixo grau de diferenciação do tumor, invasão de corpos cavernosos, de invasão vascular, invasão perineural e recidiva. Na análise multivariada, o estadio N clínico positivo, o baixo grau de diferenciação e a presença de invasão perineural se mostraram fatores independentes de maior risco para morte em decorrência da doença.
2. A hipermetilação do gene *CDKN2A* não foi observada em nenhum dos casos e a hipermetilação no promotor do gene *MGMT* foi observada em 57,4%, sem qualquer associação com os fatores clínicos e anatomopatológicos. Não houve

correlação entre a hipermetilação do promotor do gene *MGMT* e a perda de expressão da proteína.

3. A avaliação dos níveis de expressão protéicos de p16 indicou expressão positiva (moderada ou forte) em 66,8% dos casos. Ocorreu perda de expressão da proteína *MGMT* em 87,4% dos CECs de pênis houve perda de expressão. Essa perda de expressão da proteína *MGMT* foi observada com maior frequência em pacientes cujos tumores apresentaram espessura maior do que 5mm.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ai L, Stephenson KK, Ling W, et al. The p16 (CDKN2a/INK4a) tumor-suppressor gene in head and neck squamous cell carcinoma: a promoter methylation and protein expression study in 100 cases. **Mod Pathol** 2003; 16:944-50.

An SF, Fleming KA. Removal of inhibitor(s) of the polymerase chain reaction from formalin fixed, paraffin wax embedded tissues. **J Clin Pathol** 1991; 44:924-7.

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

Barnholtz-Sloan JS, Maldonado JL, Pow-sang J, Giuliano AR. Incidence trends in primary malignant penile cancer. **Urol Oncol** 2007; 25:361-7.

Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. **Hum Mol Genet** 2001; 10:687-92.

Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? **Nat Rev Cancer** 2006; 6:107-16.

Baylin SB. DNA methylation and gene silencing in cancer. **Nat Clin Pract Oncol** 2005; 2 Suppl 1:S4-11.

Berdasco M, Esteller M. Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. **Dev Cell** 2010; 19:698-711.

Bezerra AL, Lopes A, Landman G, Alencar GN, Torloni H, Villa LL. Clinicopathologic features and human papillomavirus dna prevalence of warty and squamous cell carcinoma of the penis. **Am J Surg Pathol** 2001a; 25:673-8.

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** 2001b; 91:2315-21.

Bhagat SK, Gopalakrishnan G, Kekre NS, et al. Factors predicting inguinal node metastasis in squamous cell cancer of penis. **World J Urol** 2010; 28:93-8.

Bird AP. DNA methylation versus gene expression. **J Embryol Exp Morphol** 1984; 83 Suppl:31-40.

Bleeker MC, Heideman DA, Snijders PJ, Horenblas S, Dillner J, Meijer CJ. Penile cancer: epidemiology, pathogenesis and prevention. **World J Urol** 2009; 27:141-50.

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

Cao VT, Jung TY, Jung S, et al. The correlation and prognostic significance of MGMT promoter methylation and MGMT protein in glioblastomas. **Neurosurgery** 2009; 65:866-75; discussion 875.

Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N, et al. Male circumcision, penile human papillomavirus infection, and cervical cancer in female partners. **N Engl J Med** 2002; 346:1105-12.

Chan KW, Lam KY, Chan AC, Lau P, Srivastava G. Prevalence of human papillomavirus types 16 and 18 in penile carcinoma: a study of 41 cases using PCR. **J Clin Pathol** 1994; 47:823-6.

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):S7-14.

Chin L, Pomerantz J, DePinho RA. The INK4a/ARF tumor suppressor: one gene--two products--two pathways. **Trends Biochem Sci** 1998; 23:291-6.

Colella S, Shen L, Baggerly KA, Issa JP, Krahe R. Sensitive and quantitative universal Pyrosequencing methylation analysis of CpG sites. **Biotechniques** 2003; 35:146-50.

Costello JF, Berger MS, Huang HS, Cavenee WK. Silencing of p16/CDKN2 expression in human gliomas by methylation and chromatin condensation. **Cancer Res** 1996; 56:2405-10.

Costello JF, Plass C. Methylation matters. **J Med Genet** 2001; 38:285-303.

Cubilla AL, Lloveras B, Alejo M, et al. Value of p16(INK) (a) in the pathology of invasive penile squamous cell carcinomas: A report of 202 cases. **Am J Surg Pathol** 2011; 35:253-61.

Cánepa ET, Scassa ME, Ceruti JM, et al. INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. **IUBMB Life** 2007; 59:419-26.

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

Danam RP, Howell SR, Brent TP, Harris LC. Epigenetic regulation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene expression by histone acetylation and methyl-CpG binding proteins. **Mol Cancer Ther** 2005; 4:61-9.

Diggle MA, Clarke SC. Pyrosequencing: sequence typing at the speed of light. **Mol Biotechnol** 2004; 28:129-37.

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

Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature** 2004; 429:457-63.

Esteller M, Herman JG. Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O6-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer. **Oncogene** 2004; 23:1-8.

Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. **Cancer Res** 2001; 61:3225-9.

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

Esteller M. Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes. **Eur J Cancer** 2000; 36:2294-300.

Favorito LA, Nardi AC, Ronalsa M, Zequi SC, Sampaio FJ, Glina S. Epidemiologic study on penile cancer in Brazil. **Int Braz J Urol** 2008; 34:587-91; discussion 591-3.

Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. **Nat Rev Genet** 2006; 7:21-33.

Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. **Nat Rev Cancer** 2004; 4:143-53.

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

Ficarra V, Akduman B, Bouchot O, Palou J, Tobias-Machado M. Prognostic factors in penile cancer. **Urology** 2010; 76(2 Suppl 1):S66-73.

Ficarra V, Martignoni G, Maffei N, et al. Predictive pathological factors of lymph nodes involvement in the squamous cell carcinoma of the penis. **Int Urol Nephrol** 2002; 34:245-50.

Ficarra V, Zattoni F, Artibani W, et al. Nomogram predictive of pathological inguinal lymph node involvement in patients with squamous cell carcinoma of the penis. **J Urol** 2006; 175:1700-4; discussion 1704-5.

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

Fraley EE, Zhang G, Manivel C, Niehans GA. The role of ilioinguinal lymphadenectomy and significance of histological differentiation in treatment of carcinoma of the penis. **J Urol** 1989; 142:1478-82.

Fahraeus R, Laín S, Ball KL, Lane DP. Characterization of the cyclin-dependent kinase inhibitory domain of the INK4 family as a model for a synthetic tumour suppressor molecule. **Oncogene** 1998; 16:587-96.

Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. **J Mol Biol** 1987; 196:261-82.

Gillespie JW, Best CJ, Bichsel VE, et al. Evaluation of non-formalin tissue fixation for molecular profiling studies. **Am J Pathol** 2002; 160:449-57.

Greer CE, Lund JK, Manos MM. PCR amplification from paraffin-embedded tissues: recommendations on fixatives for long-term storage and prospective studies. **PCR Methods Appl** 1991; 1:46-50.

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

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

Guimarães GC, Cunha IW, Soares FA, et al. Penile squamous cell carcinoma clinicopathological features, nodal metastasis and outcome in 333 cases. **J Urol** 2009; 182:528-34; discussion 534.

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

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

Ha PK, Califano JA. Promoter methylation and inactivation of tumour-suppressor genes in oral squamous-cell carcinoma. **Lancet Oncol** 2006; 7:77-82.

Hegarty PK, Kayes O, Freeman A, Christopher N, Ralph DJ, Minhas S. A prospective study of 100 cases of penile cancer managed according to European Association of Urology guidelines. **BJU Int** 2006; 98:526-31.

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

Horenblas S, van Tinteren H, Delemarre JF, Moonen LM, Lustig V, van Waardenburg EW. Squamous cell carcinoma of the penis. III. Treatment of regional lymph nodes. **J Urol** 1993; 149:492-7.

Horenblas S. Lymphadenectomy for squamous cell carcinoma of the penis. Part 1: diagnosis of lymph node metastasis. **BJU Int** 2001; 88:467-72.

Issa JP. CpG island methylator phenotype in cancer. **Nat Rev Cancer** 2004; 4:988-93.

Ivanova TA, Golovina DA, Zavalishina LE, et al. Up-regulation of expression and lack of 5' CpG island hypermethylation of p16 INK4a in HPV-positive cervical carcinomas. **BMC Cancer** 2007; 7:47.

Jayasurya R, Sathyan KM, Lakshminarayanan K, et al. Phenotypic alterations in Rb pathway have more prognostic influence than p53 pathway proteins in oral carcinoma. **Mod Pathol** 2005; 18:1056-66.

Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. **Nat Genet** 1999; 21:163.

Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nat Rev Genet** 2002; 3:415-28.

Kamat MR, Kulkarni JN, Tongaonkar HB. Carcinoma of the penis: the Indian experience. **J Surg Oncol** 1993; 52:50-5.

Kattan MW, Ficarra V, Artibani W, et al. Nomogram predictive of cancer specific survival in patients undergoing partial or total amputation for squamous cell carcinoma of the penis. **J Urol** 2006; 175:2103-8; discussion 2108.

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

Krustrup D, Jensen HL, van den Brule AJ, Frisch M. Histological characteristics of human papilloma-virus-positive and -negative invasive and in situ squamous cell tumours of the penis. **Int J Exp Pathol** 2009; 90:182-9.

Kulkarni JN, Kamat MR. Prophylactic bilateral groin node dissection versus prophylactic radiotherapy and surveillance in patients with N0 and N1-2A carcinoma of the penis. **Eur Urol** 1994; 26:123-8.

Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. **Nat Rev Cancer** 2003; 3:253-66.

Legrand B, Mazancourt P, Durigon M, Khalifat V, Crainic K. DNA genotyping of unbuffered formalin fixed paraffin embedded tissues. **Forensic Sci Int** 2002; 125:205-11.

Liu L, Gerson SL. Targeted modulation of MGMT: clinical implications. **Clin Cancer Res** 2006; 12:328-31.

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

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

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

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

Maruya S, Issa JP, Weber RS, et al. Differential methylation status of tumor-associated genes in head and neck squamous carcinoma: incidence and potential implications. **Clin Cancer Res** 2004; 10:3825-30.

Matsuda Y. Molecular mechanism underlying the functional loss of cyclindependent kinase inhibitors p16 and p27 in hepatocellular carcinoma. **World J Gastroenterol** 2008; 14:1734-40.

Medema RH, Herrera RE, Lam F, Weinberg RA. Growth suppression by p16ink4 requires functional retinoblastoma protein. **Proc Natl Acad Sci USA** 1995; 92:6289-93.

Merlo A, Herman JG, Mao L, et al. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. **Nat Med** 1995; 1:686-92.

Minhas S, Manseck A, Watya S, Hegarty PK. Penile cancer--prevention and premalignant conditions. **Urology** 2010; 76(2 Suppl 1):S24-35.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa /2010 Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2009.

Miracca EC, Kowalski LP, Nagai MA. High prevalence of p16 genetic alterations in head and neck tumours. **Br J Cancer** 1999; 81:677-83.

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

Mohseny AB, Tieken C, van der Velden PA, et al. Small deletions but not methylation underlie CDKN2A/p16 loss of expression in conventional osteosarcoma. **Genes Chromosomes Cancer** 2010; 49:1095-103.

Nakazawa K, Murata S, Yuminamochi T, et al. p16(INK4a) expression analysis as an ancillary tool for cytologic diagnosis of urothelial carcinoma. **Am J Clin Pathol** 2009; 132:776-84.

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

Nuovo GJ, Plaia TW, Belinsky SA, Baylin SB, Herman JG. In situ detection of the hypermethylation-induced inactivation of the p16 gene as an early event in oncogenesis. **Proc Natl Acad Sci USA** 1999; 96:12754-9.

Omura-Minamisawa M, Diccianni MB, Chang RC, et al. p16/p14(ARF) cell cycle regulatory pathways in primary neuroblastoma: p16 expression is associated with advanced stage disease. **Clin Cancer Res** 2001; 7:3481-90.

Ornellas AA, Nóbrega BL, Wei Kin Chin E, Wisnescky A, da Silva PC, de Santos Schwindt AB. Prognostic factors in invasive squamous cell carcinoma of the penis: analysis of 196 patients treated at the Brazilian National Cancer Institute. **J Urol** 2008; 180:1354-9.

Pasquali L, Bedeir A, Ringquist S, Styche A, Bhargava R, Trucco G. Quantification of CpG island methylation in progressive breast lesions from normal to invasive carcinoma. **Cancer Lett** 2007; 257:136-44.

Pegg AE, Fang Q, Loktionova NA. Human variants of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. **DNA Repair (Amst)** 2007; 6:1071-8.

Plass C. Cancer epigenomics. **Hum Mol Genet** 2002; 11:2479-88.

Poetsch M, Hemmerich M, Kakies C, et al. Alterations in the tumor suppressor gene p16(INK4A) are associated with aggressive behavior of penile carcinomas. **Virchows Arch** 2011; 458:221-9.

Pow-Sang MR, Ferreira U, Pow-Sang JM, Nardi AC, Destefano V. Epidemiology and natural history of penile cancer. **Urology** 2010; 76(2 Suppl 1):S2-6.

Prowse DM, Ktori EN, Chandrasekaran D, Prapa A, Baithun S. Human papillomavirus-associated increase in p16INK4A expression in penile lichen sclerosus and squamous cell carcinoma. **Br J Dermatol** 2008; 158:261-5.

Reed AL, Califano J, Cairns P, et al. High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Res** 1996; 56:3630-3.

Rippentrop JM, Joslyn SA, Konety BR. Squamous cell carcinoma of the penis: evaluation of data from the surveillance, epidemiology, and end results program. **Cancer** 2004; 101:1357-63.

Robertson KD. DNA methylation and human disease. **Nat Rev Genet** 2005; 6:597-610.

Robertson KD, Jones PA. DNA methylation: past, present and future directions. **Carcinogenesis** 2000; 21:461-7.

Robertson KD, Jones PA. Tissue-specific alternative splicing in the human INK4a/ARF cell cycle regulatory locus. **Oncogene** 1999; 18:3810-20.

Rosas SL, Koch W, da Costa Carvalho MG, et al. Promoter hypermethylation patterns of p16, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase, and death-associated protein kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients. **Cancer Res** 2001; 61:939-42.

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

[SEER] Surveillance Research Program of the National Cancer Institute. **Cancer statistics review** 1975-2007. Available from: <URL:http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007/index.html> [2011 mar 12]

Safar AM, Spencer H 3rd, Su X, et al. Methylation profiling of archived non-small cell lung cancer: a promising prognostic system. **Clin Cancer Res** 2005; 11:4400-5.

Salvioni R, Necchi A, Piva L, Colecchia M, Nicolai N. Penile cancer. **Urol Oncol** 2009; 27:677-85.

Sanchez-Cespedes M, Esteller M, Wu L, et al. Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. **Cancer Res** 2000; 60:892-5.

Sato Y, Sugie R, Tsuchiya B, Kameya T, Natori M, Mukai K. Comparison of the DNA extraction methods for polymerase chain reaction amplification from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. **Diagn Mol Pathol** 2001; 10:265-71.

Scheiner MA, Campos MM, Ornellas AA, Chin EW, Ornellas MH, Andrada-Serpa MJ. Human papillomavirus and penile cancers in Rio de Janeiro, Brazil: HPV typing and clinical features. **Int Braz J Urol** 2008; 34:467-74; discussion 475-6.

Schoen EJ, Oehrli M, Colby C, Machin G. The highly protective effect of newborn circumcision against invasive penile cancer. **Pediatrics** 2000; 105:E36.

Sharma A, Heuck CJ, Fazzari MJ, et al. DNA methylation alterations in multiple myeloma as a model for epigenetic changes in cancer. **Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med** 2010; 2:654-69.

Shaw RJ, Hall GL, Lowe D, et al. The role of pyrosequencing in head and neck cancer epigenetics: correlation of quantitative methylation data with gene expression. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 2008; 134:251-6.

Shima K, Morikawa T, Baba Y, et al. MGMT promoter methylation, loss of expression

and prognosis in 855 colorectal cancers. **Cancer Causes Control** 2011; 22:301-9.

Sidransky D. Emerging molecular markers of cancer. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:210-9.

Slaton JW, Morgenstern N, Levy DA, et al. Tumor stage, vascular invasion and the percentage of poorly differentiated cancer: independent prognosticators for inguinal lymph node metastasis in penile squamous cancer. **J Urol** 2001; 165:1138-42.

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

Soufir N, Queille S, Liboutet M, et al. Inactivation of the CDKN2A and the p53 tumour suppressor genes in external genital carcinomas and their precursors. **Br J Dermatol** 2007; 156:448-53.

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

Syed S, Eng TY, Thomas CR, Thompson IM, Weiss GR. Current issues in the management of advanced squamous cell carcinoma of the penis. **Urol Oncol** 2003; 21:431-8.

Taby R, Issa JP. Cancer epigenetics. **CA Cancer J Clin** 2010; 60:376-92.

Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Mar 19;99(6):3740-5.

Tano K, Shiota S, Collier J, Foote RS, Mitra S. Isolation and structural characterization

of a cDNA clone encoding the human DNA repair protein for O6-alkylguanine. **Proc Natl Acad Sci USA** 1990; 87:686-90.

Tetikkurt US, Ozaydin IY, Ceylan S, Gurbuz Y, Erdogan N, Oz F. Predicting malignant potential of gastrointestinal stromal tumors: Role of p16 and E2F1 expression. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2010; 18:338-43.

Tost J, Gut IG. DNA methylation analysis by pyrosequencing. **Nat Protoc** 2007; 2:2265-75.

Tycko B. Epigenetic gene silencing in cancer. **J Clin Invest** 2000; 105:401-7.

Ushijima T. Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells. **Nat Rev Cancer** 2005; 5:223-31.

Velazquez EF, Ayala G, Liu H, 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; 32:974-9.

Villavicencio H, Rubio-Briones J, Regalado R, Chéchile G, Algaba F, Palou J. Grade, local stage and growth pattern as prognostic factors in carcinoma of the penis. **Eur Urol** 1997; 32:442-7.

Watts GS, Pieper RO, Costello JF, Peng YM, Dalton WS, Futscher BW. Methylation of discrete regions of the O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) CpG island is associated with heterochromatinization of the MGMT transcription start site and silencing of the gene. **Mol Cell Biol** 1997; 17:5612-9.

Worm J, Guldborg P. DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anticancer therapy. **J Oral Pathol Med** 2002; 31:443-9.

Wu L, Patten N, Yamashiro CT, Chui B. Extraction and amplification of DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2002; 10:269-74.

Yanagawa N, Osakabe M, Hayashi M, Tamura G, Motoyama T. Frequent epigenetic silencing of the FHIT gene in penile squamous cell carcinomas. **Virchows Arch** 2008; 452:377-82.

Zhu J, Yao X. Use of DNA methylation for cancer detection and molecular classification. **J Biochem Mol Biol** 2007; 40:135-41.

Zhu Y, Zhou XY, Yao XD, Dai B, Ye DW. The prognostic significance of p53, Ki-67, epithelial cadherin and matrix metalloproteinase-9 in penile squamous cell carcinoma treated with surgery. **BJU Int** 2007; 100:204-8.

Zsikla V, Baumann M, Cathomas G. Effect of buffered formalin on amplification of DNA from paraffin wax embedded small biopsies using real-time PCR. **J Clin Pathol** 2004; 57:654-6.

Zuo C, Ai L, Ratliff P, et al. O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene: epigenetic silencing and prognostic value in head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2004; 13:967-75.

Anexo 1 – Ficha de Levantamento de Dados

Projeto: Avaliação do perfil de hipermetilação dos genes *CDKN2A* e *MGMT* em cancer de pênis.

Aluna: Luciane Tsukamoto Kagohara

Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Soares

Co-orientadores: Dr. Ademar Lopes e Dra. Renata de Almeida Coudry

1. Número no estudo |__|__|__|__|
2. RG |__|__|__|__|__|__|__|__|__|
3. Data da admissão __/__/__
4. Idade na admissão (anos) |__|__|
5. Estado civil |__|
(1) solteiro (2) casado (3) separado (4) outros (9) ignorado
6. Raça |__|
(1) branca (2) amarela (3) negra (9) ignorado
7. Sinais ou sintomas |__|
(1) ferida (2) dor (3) inflamação (4) disúria (5) prurido (6) outros
(9) ignorado
8. Tempo de evolução (meses) |__|__|__|
9. Antecedentes venéreos |__|
(0) não (1) sim
10. Postectomia |__|
(0) não (1) não relacionada (2) relacionada (9) ignorado
11. Situação à primeira consulta |__|
(1) biopsiado (2) amputado (3) esvaziado (4) intacto (9) ignorado
12. Estadiamento cT |__|
(1) T1 (2) T2 (3) T3 (4) T4 (9) Tx
13. Estadiamento cN |__|

- (0) N0 (1) N1 (2) N2 (3) N3 (4) N4 (9) Nx
14. Estadiamento cM |_|
(0) M0 (1) M1 (9) Mx
15. Data da amputação/ressecção ___/___/___
16. Cirurgia |_|
(0) não (1) amputação parcial (2) amputação total (3) exereses
(4) postectomia
17. Tipo de esvaziamento ganglionar |_|
(0) não (1) inguinal (2) inguino-íliaco (9) ignorado
18. Intenção do esvaziamento |_|
(1) princípio (2) necessidade (9) ignorado
19. Data do esvaziamento ___/___/___
20. Complicações relacionadas a amputação |_|
(0) não (1) infecção (2) deiscência (3) estenose (4) hemorragia
(9) ignorado
21. Complicações relacionadas ao esvaziamento |_|
(0) não (1) infecção (2) deiscência (3) hematoma (4) necrose
(5) linfedema (6) ruptura de vasos (9) ignorado
22. Número do AP |_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|
23. Grau de diferenciação |_|
(1) bem diferenciado (2) moderadamente diferenciado (3) pouco diferenciado
(4) não classificado (9) ignorado
24. Espessura do tumor |_|
(1) até 1mm (2) de 1 a 5mm (3) maior que 5mm (9) ignorado
25. Permeação linfática |_|
(0) ausente (1) presente (9) ignorado
26. Embolização venosa |_|
(0) ausente (1) presente (9) ignorado
27. Infiltração de corpos cavernosos |_|
(0) ausente (1) presente (9) ignorado

28. Infiltração de uretra |__|
(0) ausente (1) presente (9) ignorado
29. Infiltração de órgãos adjacentes |__|
(0) ausente (1) presente (9) ignorado
30. Alteração sugestiva de HPV (coilocotose) |__|
(0) ausente (1) presente (9) ignorado
31. Total de linfonodos examinados |__|__|__|
32. Total de linfonodos positivos |__|__|__|
33. Lateralidade dos linfonodos positivos |__|
(1) unilateral (2) bilateral (9) ignorado
34. Cadeia linfonodal positiva |__|
(1) inguinal (2) inguinal+ilíaco (3) ilíaco (9) ignorado
35. Data da recidiva __/__/__
36. Local da recidiva |__|
(0) sem recidiva (1) coto (2) regional (3) pulmões (4) ossos
(5) fígado (6) outros (9) ignorado
37. Tratamento da recidiva |__|
(0) sem recidiva (1) RHD (2) local (3) regional (4) Rxt (5) Qt
(6) outro (9) ignorado
38. Data do último seguimento __/__/__
39. Situação no seguimento |__|
(1) vivo sem doença (2) vivo com doença (3) óbito por câncer
(4) óbito por outra causa (5) perdido de vista

Anexo 2 – Tabela com os dados da quantificação por espectrofotometria das amostras de DNA de carcinoma epidermóides de pênis incluídas em parafina.

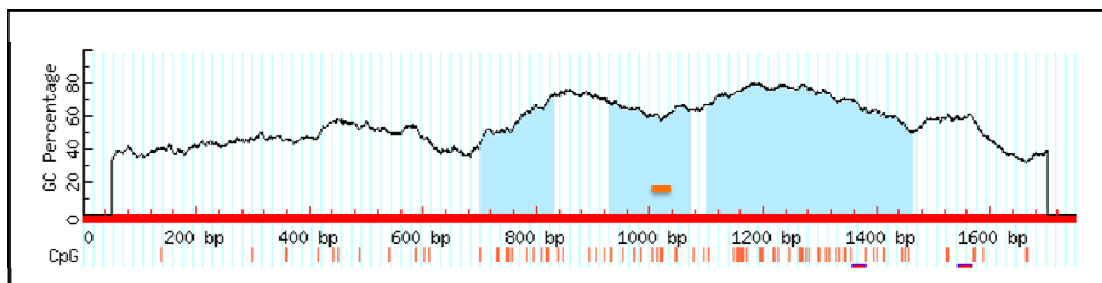
Amostra	Concentração da amostra (ng/uL)	Quantidade final de DNA (ug)	Razão A260/280	Razão A260/230
1	456,0	22,8	1,99	2,17
2	673,0	33,65	1,96	2,15
3	527,0	26,35	1,87	2,11
4	1046,0	52,3	1,97	2,23
5	1663,0	83,15	1,99	2,20
6	615,0	30,75	1,97	2,25
7	448,0	22,4	2,02	2,18
8	249,0	12,45	1,99	2,18
9	705,0	35,25	1,95	2,17
10	310,0	15,5	1,99	2,08
11	238,0	11,9	1,98	2,10
12	192,0	9,6	1,97	2,21
13	259,0	12,95	1,98	2,18
14	203,0	10,15	1,73	1,59
15	861,0	43,05	1,84	2,06
16	1131,0	56,55	1,83	2,02
17	255,0	12,75	1,82	2,17
18	143,0	7,15	1,81	2,13
19	368,0	18,4	2,02	2,19
20	94,0	4,7	1,96	2,17
21	283,0	14,15	1,87	2,20
22	279,0	13,95	1,81	2,14
23	574,0	28,7	1,84	2,17
24	165,0	8,25	1,88	2,18
25	1090,0	54,5	1,81	2,08
26	344,0	17,2	1,82	2,12
27	1088,0	54,4	2,71	4,41
28	357,0	17,85	1,96	2,26
29	160,0	8	1,67	1,76
30	426,0	21,3	1,72	2,16
31	483,0	24,15	1,87	2,19
32	999,0	49,95	1,86	2,03
33	279,0	13,95	1,73	2,05
34	706,0	35,3	1,61	2,02
35	348,0	17,4	1,81	2,12
36	261,0	13,05	1,78	2,08
37	444,0	22,2	1,81	2,12
38	295,0	14,75	1,87	2,03
39	124,0	6,2	1,71	2,05

Amostra	Concentração da amostra (ng/uL)	Quantidade final de DNA (ug)	Razão A260/280	Razão A260/230
40	327,0	16,35	1,90	2,16
41	334,0	16,7	1,85	2,09
42	275,0	13,75	1,88	2,23
43	138,0	6,9	1,80	2,17
44	535,0	26,75	1,86	2,14
45	168,0	8,4	1,76	2,02
46	362,0	18,1	1,89	2,06
47	500,0	25	1,77	2,11
48	327,0	16,35	1,76	2,04
49	657,0	32,85	1,74	2,14
50	256,0	12,8	1,83	2,16
51	166,0	8,3	1,80	2,15
52	491,0	24,55	1,77	2,16
53	376,0	18,8	1,86	2,18
54	438,0	21,9	1,96	2,12
55	447,0	22,35	1,98	2,15
56	46,0	2,3	1,51	2,03
57	500,0	25	2,00	2,16
58	322,0	16,1	1,95	2,17
59	241,0	12,05	1,74	2,17
60	62,0	3,1	1,59	2,21
61	243,0	12,15	1,79	2,20
62	148,0	7,4	1,80	2,14
63	426,0	21,3	1,82	2,12
64	271,0	13,55	1,84	2,17
65	279,0	13,95	1,85	2,15
66	436,0	21,8	1,83	2,08
67	563,0	28,15	1,84	2,15
68	562,0	28,1	1,83	2,02
69	838,0	41,9	1,97	2,03
70	143,0	7,15	1,83	2,01
71	57,0	2,85	1,74	2,00
72	481,0	24,05	1,87	2,13
73	208,0	10,4	1,82	2,12
74	436,0	21,8	1,97	2,18
75	325,0	16,25	1,91	2,09
76	104,0	5,2	1,61	2,03
77	377,0	18,85	1,83	2,11
78	20,0	1	1,28	1,10
79	141,0	7,05	1,68	1,83
80	153,0	7,65	1,71	1,89

Amostra	Concentração da amostra (ng/uL)	Quantidade final de DNA (ug)	Razão A260/280	Razão A260/230
81	136,0	6,8	1,65	1,80
82	321,0	16,05	1,81	2,07
83	306,0	15,3	1,76	1,92
84	127,0	6,35	1,56	1,70
85	505,0	25,25	1,79	2,05
86	204,0	10,2	1,64	1,83
87	618,0	30,9	1,71	1,90
88	387,0	19,35	1,81	1,97
89	163,0	8,15	1,80	2,07
90	126,0	6,3	1,65	2,06
91	492,0	24,6	1,76	2,08
92	453,0	22,65	1,75	2,03
93	699,0	34,95	1,69	1,96
94	795,0	39,75	1,76	1,90
95	11,0	0,55	1,50	1,75
96	180,0	9	1,71	2,08
97	292,0	14,6	1,64	2,00
98	127,0	6,35	1,75	1,91
99	81,0	4,05	1,70	2,00
100	448,0	22,4	1,69	2,03
101	407,0	20,35	1,83	1,89
102	778,0	38,9	1,79	1,98
103	316,0	15,8	1,79	2,05
104	633,0	31,65	1,91	2,09
105	495,0	24,75	1,77	2,05
106	612,0	30,6	1,75	2,12
107	401,0	20,05	1,74	1,96
108	493,0	24,65	1,82	2,05
109	1747,0	87,35	1,76	2,06
110	967,0	48,35	1,81	1,99
111	749,0	37,45	1,80	2,00
112	1437,0	71,85	1,70	2,10
113	333,0	16,65	1,90	2,04
114	631,0	31,55	1,80	2,05
115	1278,0	63,9	1,70	2,04
116	393,0	19,65	1,90	2,10
117	302,0	15,1	1,89	2,05
118	329,0	16,45	1,68	2,02
119	800,0	40	1,73	1,96
120	280,0	14	1,85	1,98
121	836,0	41,8	1,85	1,96

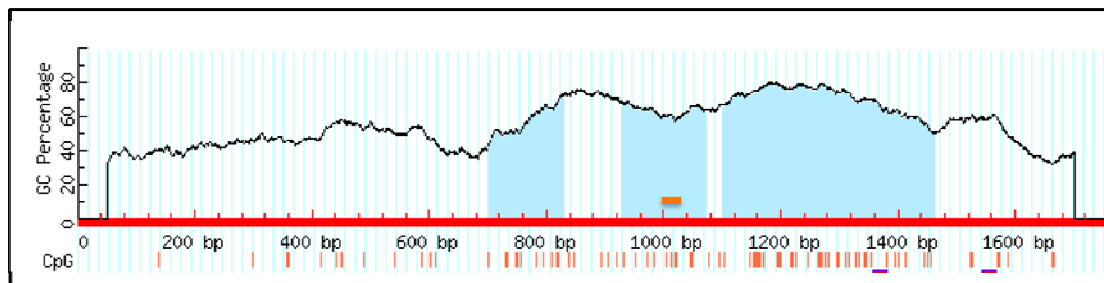
Amostra	Concentração da amostra (ng/uL)	Quantidade final de DNA (ug)	Razão A260/280	Razão A260/230
122	793,0	39,65	1,88	1,90
123	438,0	21,9	1,77	2,05
124	852,0	42,6	1,76	2,14
125	572,0	28,6	1,73	2,15
126	425,0	21,25	1,77	2,10
127	629,0	31,45	1,66	2,15
128	520,0	26	1,78	2,18

Anexo 3 – Figura representativa da localização do fragmento sequenciado para a determinação do padrão de hipermetilação do gene *CDKN2A*.



Representação da região promotora do gene *CDKN2A*. A região representada corresponde às regiões 5' não traduzida, exon 1 e início do intron 1. As regiões marcadas em azul correspondem às ilhas CpGs presentes no promotor do gene. O fragmento sequenciado para determinação do padrão de hipermetilação localiza-se entre os nucleotídeos 1147 e 1174 da figura (barra laranja). Os números representados abaixo da linha vermelha correspondem ao número de nucleotídeos presentes na região avaliada e não à sua posição na sequência do gene.

Anexo 4 – Figura representativa da localização do fragmento sequenciado para a determinação do padrão de hipermetilação do gene *MGMT*.



Representação da região promotora do gene *MGMT*. A região representada corresponde às regiões 5' não traduzida, exon 1 e início do intron 1. As regiões marcadas em azul correspondem às ilhas CpGs presentes no promotor do gene. O fragmento sequenciado para determinação do padrão de hipermetilação localiza-se entre os nucleotídeos 1017 e 1039 da figura (barra laranja). Os números representados abaixo da linha vermelha correspondem ao número de nucleotídeos presentes na região avaliada e não à sua posição na sequência do gene.

Amostra	Nível de hipermetilação								Status
	CpG1 (%)	CpG2 (%)	CpG3 (%)	CpG4 (%)	CpG5 (%)	CpG6 (%)	CpG7 (%)	CpG final (%)	
PN40	11	11	9	8	7	7	8	8,71	U
PN41	4	0	3	0	4	4	4	2,71	U
PN42	0	3	3	4	4	4	0	2,57	U
PN43	4	4	3	4	4	0	6	3,57	U
PN44	0	5	3	5	6	0	0	2,71	U
PN45	0	5	0	4	0	0	6	2,14	U
PN46	0	6	0	0	7	0	0	1,86	U
PN47	5	0	0	0	0	0	0	0,71	U
PN48	5	5	0	0	0	0	0	1,43	U
PN49	0	4	0	0	0	0	0	0,57	U
PN50	0	4	0	0	0	0	4	1,14	U
PN51	4	3	0	3	0	3	4	2,43	U
PN52	4	0	0	0	4	4	0	1,71	U
PN53	4	4	0	3	0	0	0	1,57	U
PN54	0	0	0	0	0	0	0	0,00	U
PN55	6	0	0	4	0	0	0	1,43	U
PN56	16	18	15	14	15	13	14	15,00	M
PN57	4	4	0	0	0	5	0	1,86	U
PN59	0	0	4	4	6	4	0	2,57	U
PN60	0	6	0	4	4	5	4	3,29	U
PN61	0	0	0	0	0	0	0	0,00	U
PN63	5	6	0	4	0	0	0	2,14	U
PN64	4	5	4	0	6	4	4	3,86	U
PN66	5	4	0	4	4	0	0	2,43	U
PN67	0	0	0	4	4	0	0	1,14	U
PN68	4	5	0	4	5	0	0	2,57	U
PN69	4	0	0	4	6	0	3	2,43	U
PN70	0	4	0	0	0	0	0	0,57	U

Amostra	Nível de hipermetilação								Status
	CpG1 (%)	CpG2 (%)	CpG3 (%)	CpG4 (%)	CpG5 (%)	CpG6 (%)	CpG7 (%)	CpG final (%)	
PN71	0	0	0	0	4	4	4	1,71	U
PN72	3	4	0	4	5	4	0	2,86	U
PN75	4	0	0	4	6	4	0	2,57	U
PN76	0	0	0	0	0	0	0	0,00	U
PN77	0	4	4	4	6	3	4	3,57	U
PN78	14	11	7	11	9	13	12	11,00	U
PN82	0	0	0	0	0	0	3	0,43	U
PN83	5	0	0	0	0	3	0	1,14	U
PN84	0	0	0	0	0	3	0	0,43	U
PN85	5	4	0	4	0	3	0	2,29	U
PN86	0	0	0	0	4	0	3	1,00	U
PN87	0	4	0	4	0	0	0	1,14	U
PN88	0	4	4	0	4	0	0	1,71	U
PN89	4	0	0	0	0	0	0	0,57	U
PN90	0	0	0	0	0	0	0	0,00	U
PN91	6	5	0	6	5	4	0	3,71	U
PN92	0	0	0	0	6	0	5	1,57	U
PN93	4	5	0	0	6	4	0	2,71	U
PN94	0	5	0	0	0	0	0	0,71	U
PN95	5	0	0	5	5	0	4	2,71	U
PN96	0	0	0	3	0	0	0	0,43	U
PN97	4	4	0	0	5	0	0	1,86	U
PN99	4	4	0	4	6	4	0	3,14	U
PN100	4	5	0	0	0	0	0	1,29	U
PN101	4	4	0	4	0	0	0	1,71	U
PN103	0	5	4	3	4	4	4	3,43	U
PN104	3	4	0	0	6	3	0	2,29	U
PN105	6	4	5	5	6	4	0	4,29	U

Amostra	Nível de hipermetilação								Status
	CpG1 (%)	CpG2 (%)	CpG3 (%)	CpG4 (%)	CpG5 (%)	CpG6 (%)	CpG7 (%)	CpG final (%)	
PN106	5	6	5	4	0	4	6	4,29	U
PN107	3	4	0	0	5	0	0	1,71	U
PN108	6	0	5	4	5	0	0	2,86	U
PN109	5	5	0	5	5	0	0	2,86	U
PN110	0	7	0	0	0	4	6	2,43	U
PN111	6	0	0	0	0	0	0	0,86	U
PN112	0	0	5	0	0	0	5	1,43	U
PN113	0	6	0	0	4	0	0	1,43	U
PN114	0	8	0	0	6	5	6	3,57	U
PN115	5	7	4	6	0	5	5	4,57	U
PN116	6	7	4	7	5	5	5	5,57	U
PN117	7	0	0	6	6	0	0	2,71	U
PN118	0	5	0	0	4	0	0	1,29	U
PN119	5	5	0	0	5	0	7	3,14	U
PN120	0	7	0	5	6	0	7	3,57	U
PN121	5	5	0	0	0	5	0	2,14	U
PN128	0	4	0	0	6	0	0	1,43	U
PN129	6	5	0	0	5	4	4	3,43	U
PN130	0	7	0	4	6	0	0	2,43	U
PN131	6	5	5	0	5	5	6	4,57	U
PN133	0	5	0	0	0	0	5	1,43	U
PN134	0	6	0	0	0	6	7	2,71	U
PN135	5	5	0	4	4	0	0	2,57	U
PN136	0	4	0	6	4	4	0	2,57	U
PN137	7	6	4	5	4	0	0	3,71	U
PN138	0	0	0	4	4	0		1,33	U
PN139	0	5	0	4	0	0	5	2,00	U
PN140	0	5	0	5	5	0	5	2,86	U

Amostra	Nível de hipermetilação								Status
	CpG1 (%)	CpG2 (%)	CpG3 (%)	CpG4 (%)	CpG5 (%)	CpG6 (%)	CpG7 (%)	CpG final (%)	
PN142	0	0	0	4	0	0	5	1,29	U
PN143	0	7	0	0	6	0	0	1,86	U
PN144	0	0	0	4	0	5	4	1,86	U
PN145	0	0	0	5	0	0	0	0,71	U
PN146	5	0	0	4	0	4	0	1,86	U
PN147	0	0	0	0	0	0	0	0,00	U
PN148	6	6	0	4	6	3	5	4,29	U
PN149	5	7	0	5	6	0	0	3,29	U
PN150	0	0	0	0	0	4	0	0,57	U
PN153	4	0	0	0	5	0	0	1,29	U
PN154	0	6	0	0	5	0	0	1,57	U
PN155	5	6	0	5	0	5	4	3,57	U
PN156	0	5	0	0	0	0	0	0,71	U
PN157	6	5	6	0	5	4	0	3,71	U
PN158	0	5	0	0	0	0	0	0,71	U
PN161	0	4	4	0	0	4	0	1,71	U
PN163	5	0	5	0	0	6	0	2,29	U
PN165	4	6	0	0	6	4	0	2,86	U

Anexo 6 – Níveis de hipermetilação de cada sítio CpG avaliado para o gene *MGMT*, nível de hipermetilação da amostra e classificação de cada caso de acordo com o status de metilação. U – amostra não metilada; M – amostra metilada.

Amostra	Nível de hipermetilação						Status
	CpG1 (%)	CpG2 (%)	CpG3 (%)	CpG4 (%)	CpG5 (%)	CpG final (%)	
PN12	19,00	24,00	28,00	26,00	32,00	25,80	M
PN13	13,00	17,00	19,00	20,00	23,00	18,40	M
PN14	17,00	20,00	32,00	23,00	26,00	23,60	M
PN15	23,00	22,00	22,00	25,00	26,00	23,60	M
PN16	16,00	16,00	19,00	17,00	19,00	17,40	M
PN17	35,00	37,00	38,00	35,00	34,00	35,80	M
PN18	34,00	38,00	37,00	34,00	37,00	36,00	M
PN19	15,00	16,00	16,00	16,00	21,00	16,80	M
PN20	20,00	26,00	26,00	27,00	38,00	27,40	M
PN21	19,00	19,00	26,00	23,00	32,00	23,80	M
PN22	10,00	11,00	17,00	12,00	15,00	13,00	U
PN23	29,00	32,00	35,00	33,00	36,00	33,00	M
PN24	15,00	19,00	22,00	17,00	26,00	19,80	M
PN25	18,00	24,00	25,00	23,00	17,00	21,40	M
PN26	14,00	17,00	18,00	17,00	16,00	16,40	M
PN27	6,00	9,00	8,00	10,00	14,00	9,40	U
PN28	5,00	12,00	14,00	12,00	26,00	13,80	U
PN29	20,00	23,00	22,00	23,00	20,00	21,60	M
PN30	20,00	18,00	22,00	18,00	16,00	18,80	M
PN31	21,00	24,00	23,00	22,00	20,00	22,00	M
PN32	9,00	12,00	16,00	11,00	15,00	12,60	U
PN35	23,00	21,00	21,00	22,00	20,00	21,40	M
PN36	12,00	15,00	14,00	11,00	14,00	13,20	U
PN37	17,00	22,00	21,00	21,00	33,00	22,80	M
PN38	28,00	33,00	32,00	29,00	27,00	29,80	M

Amostra	Nível de hipermetilação						Status
	CpG1 (%)	CpG2 (%)	CpG3 (%)	CpG4 (%)	CpG5 (%)	CpG final (%)	
PN39	24,00	30,00	29,00	29,00	32,00	28,80	M
PN40	6,00	9,00	8,00	9,00	21,00	10,60	U
PN41	10,00	12,00	12,00	14,00	9,00	11,40	U
PN42	5,00	8,00	9,00	7,00	9,00	7,60	U
PN43	11,00	13,00	15,00	13,00	14,00	13,20	U
PN44	10,00	14,00	17,00	13,00	17,00	14,20	U
PN45	20,00	21,00	24,00	20,00	17,00	20,40	M
PN47	28,00	31,00	30,00	30,00	30,00	29,80	M
PN48	24,00	22,00	23,00	21,00	23,00	22,60	M
PN49	17,00	21,00	24,00	26,00	21,00	21,80	M
PN50	25,00	25,00	25,00	26,00	24,00	25,00	M
PN51	36,00	34,00	37,00	34,00	34,00	35,00	M
PN52	14,00	15,00	20,00	15,00	11,00	15,00	U
PN53	29,00	30,00	26,00	27,00	31,00	28,60	M
PN54	21,00	21,00	22,00	25,00	22,00	22,20	M
PN56	6,00	14,00	20,00	16,00	26,00	16,40	M
PN57	11,00	11,00	12,00	11,00	22,00	13,40	U
PN59	20,00	30,00	32,00	26,00	37,00	29,00	M
PN60	12,00	15,00	17,00	14,00	22,00	16,00	M
PN61	19,00	21,00	22,00	21,00	19,00	20,40	M
PN62	14,00	11,00	12,00	14,00	13,00	12,80	U
PN63	14,00	11,00	12,00	14,00	13,00	12,80	U
PN64	14,00	17,00	19,00	17,00	16,00	16,60	M
PN65	7,00	7,00	12,00	13,00	10,00	9,80	U
PN66	76,00	76,00	75,00	75,00	80,00	76,40	M
PN67	22,00	27,00	27,00	26,00	31,00	26,60	M
PN68	21,00	20,00	19,00	22,00	19,00	20,20	M
PN69	18,00	21,00	24,00	21,00	17,00	20,20	M

Amostra	Nível de hipermetilação						Status
	CpG1 (%)	CpG2 (%)	CpG3 (%)	CpG4 (%)	CpG5 (%)	CpG final (%)	
PN70	24,00	28,00	28,00	27,00	26,00	26,60	M
PN71	3,00	6,00	9,00	6,00	11,00	7,00	U
PN72	10,00	11,00	13,00	13,00	17,00	12,80	U
PN75	26,00	29,00	35,00	29,00	32,00	30,20	M
PN76	23,00	22,00	26,00	23,00	30,00	24,80	M
PN77	6,00	7,00	14,00	9,00	14,00	10,00	U
PN78	15,00	22,00	15,00	17,00	23,00	18,40	M
PN80	12,00	11,00	10,00	9,00	16,00	11,60	U
PN82	16,00	17,00	19,00	18,00	16,00	17,20	M
PN83	21,00	24,00	20,00	21,00	20,00	21,20	M
PN84	27,00	28,00	34,00	32,00	30,00	30,20	M
PN85	13,00	13,00	12,00	12,00	14,00	12,80	U
PN86	25,00	27,00	29,00	26,00	24,00	26,20	M
PN87	21,00	22,00	21,00	22,00	17,00	20,60	M
PN88	15,00	10,00	15,00	9,00	13,00	12,40	U
PN89	12,00	14,00	10,00	0,00	14,00	10,00	U
PN90	10,00	8,00	10,00	10,00	9,00	9,40	U
PN91	11,00	11,00	7,00	9,00	11,00	9,80	U
PN92	10,00	14,00	15,00	16,00	15,00	14,00	U
PN93	9,00	11,00	14,00	12,00	12,00	11,60	U
PN94	25,00	27,00	27,00	22,00	25,00	25,20	M
PN95	16,00	22,00	23,00	24,00	24,00	21,80	M
PN96	17,00	19,00	18,00	13,00	16,00	16,60	M
PN97	21,00	24,00	24,00	26,00	25,00	24,00	M
PN99	15,00	16,00	13,00	13,00	13,00	14,00	U
PN100	8,00	13,00	13,00	17,00	11,00	12,40	U
PN101	15,00	18,00	14,00	14,00	16,00	15,40	M
PN103	23,00	26,00	26,00	23,00	25,00	24,60	M

Amostra	Nível de hipermetilação						Status
	CpG1 (%)	CpG2 (%)	CpG3 (%)	CpG4 (%)	CpG5 (%)	CpG final (%)	
PN104	12,00	14,00	9,00	9,00	13,00	11,40	U
PN105	27,00	27,00	24,00	24,00	27,00	25,80	M
PN106	14,00	14,00	13,00	12,00	13,00	13,20	U
PN107	13,00	13,00	11,00	9,00	11,00	11,40	U
PN108	6,00	6,00	8,00	8,00	7,00	7,00	U
PN109	4,00	6,00	5,00	3,00	5,00	4,60	U
PN111	10,00	14,00	15,00	11,00	10,00	12,00	U
PN112	14,00	15,00	15,00	13,00	15,00	14,40	U
PN113	17,00	24,00	21,00	16,00	16,00	18,80	M
PN114	18,00	20,00	19,00	21,00	18,00	19,20	M
PN115	16,00	17,00	26,00	17,00	17,00	18,60	M
PN116	5,00	7,00	8,00	5,00	12,00	7,40	U
PN118	15,00	17,00	18,00	16,00	18,00	16,80	M
PN119	16,00	18,00	16,00	20,00	16,00	17,20	M
PN120	4,00	7,00	5,00	4,00	7,00	5,40	U
PN121	15,00	15,00	19,00	13,00	21,00	16,60	M
PN133	15,00	18,00	16,00	16,00	15,00	16,00	M
PN134	11,00	15,00	16,00	16,00	12,00	14,00	U
PN135	17,00	18,00	17,00	16,00	16,00	16,80	M
PN136	12,00	11,00	11,00	8,00	11,00	10,60	U
PN137	12,00	14,00	14,00	11,00	12,00	12,60	U
PN138	12,00	15,00	13,00	12,00	12,00	12,80	U
PN139	18,00	12,00	13,00	13,00	15,00	14,20	U
PN140	7,00	8,00	0,00	6,00	0,00	4,20	U
PN142	19,00	19,00	20,00	17,00	23,00	19,60	M
PN143	15,00	17,00	23,00	12,00	14,00	16,20	M
PN144	22,00	23,00	24,00	19,00	30,00	23,60	M
PN145	11,00	11,00	11,00	10,00	1,00	8,80	U

Amostra	Nível de hipermetilação						Status
	CpG1 (%)	CpG2 (%)	CpG3 (%)	CpG4 (%)	CpG5 (%)	CpG final (%)	
PN146	14,00	15,00	11,00	10,00	11,00	12,20	U
PN148	24,00	22,00	25,00	23,00	22,00	23,20	M
PN150	15,00	12,00	18,00	11,00	14,00	23,20	M
PN153	17,00	17,00	14,00	13,00	14,00	15,00	U
PN154	16,00	19,00	24,00	19,00	23,00	20,20	M
PN155	12,00	11,00	13,00	12,00	12,00	12,00	U
PN156	12,00	17,00	15,00	12,00	16,00	14,40	U
PN157	12,00	10,00	9,00	9,00	11,00	10,20	U
PN158	6,00	10,00	7,00	6,00	9,00	7,60	U
PN161	12,00	13,00	15,00	12,00	12,00	12,80	U
PN163	5,00	8,00	6,00	6,00	8,00	6,60	U
PN165	22,00	24,00	27,00	22,00	25,00	24,00	M
PN167	84,00	86,00	84,00	83,00	93,00	86,00	M
PN168	14,00	11,00	11,00	8,00	15,00	11,80	U