



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
NÚCLEO DE PESQUISA EM ONCOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA E CIÊNCIAS  
MÉDICAS

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS TWIST1,  
KAI1 E E-CADERINA EM AMOSTRAS DE CÂNCER DE  
PÊNIS, DE PACIENTES ATENDIDOS EM UM HOSPITAL  
DE REFERÊNCIA DO ESTADO DO PARÁ**

Lecildo Lira Batista

BELÉM-PA

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
NÚCLEO DE PESQUISA EM ONCOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA  
E CIÊNCIAS MÉDICAS

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS TWIST1,  
KAI1 E E-CADERINA EM AMOSTRAS DE CÂNCER DE  
PÊNIS, DE PACIENTES ATENDIDOS EM UM HOSPITAL  
DE REFERÊNCIA DO ESTADO DO PARÁ**

Autor: Lecildo Lira Batista

Orientador: Prof. Dr. André Salim  
Khayat

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Oncologia e Ciências Médicas, área de concentração: Medicina I, do Núcleo de Pesquisas em Oncologia da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Oncologia e Ciências Médicas.

BELÉM-PA

2015

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Lecildo Lira Batista

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Oncologia e Ciências Médicas, área de concentração: Medicina I, do Núcleo de Pesquisas em Oncologia da Universidade Federal do Pará para a obtenção do Título de Mestre.

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. Paulo Pimentel de Assumpção

Instituição: UFPA

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dra. Carolina Rosal Teixeira de Souza

Instituição: UFPA

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Hérick Pampolha Huet de Bacelar

Instituição: UEPA

Assinatura: \_\_\_\_\_

## **INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES E FONTES FINANCIADORAS**

### **INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES:**

- Universidade Federal do Pará (UFPA)
  - a) Hospital Universitário João de Barros Barreto
  - b) Núcleo de Pesquisa em Oncologia (NPO)/UNACON/HUJBB
- Hospital Ophir Loyola
  - a) Laboratório de Patologia Hospital Ophir Loyola

### **FONTES DE FINANCIAMENTO:**

- Financiamento próprio

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais: José Ribamar Alves Batista “in memoriam” e Lóide Lira Batista por todo amor e dedicação dispensados a mim.

À minha esposa Késsia Regina Ferreira Batista, por seu companheirismo incansável e incentivo diários.

Ao meu filho José Henrique, que a cada dia me faz querer ser alguém melhor, para servir de exemplo para ele.

Aos meus irmãos: Letice Lira Batista e Leilson Lira Batista que, juntamente com os entes queridos citados acima, contribuem para a composição de minha base familiar, e, portanto tem grande mérito em todas as minhas conquistas.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. André Salim Khayat, meu orientador pela confiança depositada em mim ao conduzir-me nesta difícil tarefa de produção científica em nível de mestrado, bem como por todo incentivo e críticas dispensadas, mas que foram fundamentais para que se obtivesse o êxito nesta proposta.

Ao Dr. Carlos Augusto Moreira Silva, por sua imensa atuação como co-orientador deste trabalho, bem como sua presteza, fundamental no âmbito da área de patologia desta dissertação.

À jovem Dra. Aline Seabra, pela sua presteza em colaborar com a análise estatística.

À Mestre Michelle Carvalho de Abreu, pela inestimável ajuda no que tange à elaboração textual e normas vigentes.

À biomédica Ana Karyssa Mendes Anaissi, pela sua importante contribuição em relação à titulação dos anticorpos.

À Jaqueline Diniz Pinho, mestre em Genética e Biologia Molecular pela sua disposição constante em ajudar.

Ao colega residente de Urologia, Dr. Jund Regis, pela colaboração com a difícil tarefa de coletar dados, bem como análise de prontuários no Hospital Ophir Loyola.

Aos jovens médicos: Renan Kleber Costa Teixeira e Pedro Ruan Ferreira por suas contribuições quanto à elaboração de banco de dados.

Aos pacientes, que mesmo anônimos, contribuíram para elaboração desta dissertação.

## RESUMO

O câncer de pênis é uma doença rara em nações desenvolvidas, sendo mais comum em regiões em desenvolvimento figurando como um importante problema de saúde pública, por ter um caráter mutilante, que pode acarretar problemas psicológicos e sociais ao paciente acometido. O fator prognóstico mais importante do câncer de pênis é o comprometimento linfonodal e a presença de metástases à distância. Os pacientes que apresentam estas características raramente sobrevivem por cinco anos. Por outro lado, nos estádios iniciais da doença o prognóstico é bom, obtendo-se cura na maioria dos casos. Na busca por indicadores prognósticos mais confiáveis, inúmeros genes/proteínas associados à carcinogênese peniana têm sido avaliados vislumbrando um melhor entendimento deste processo, para que métodos mais precisos de diagnósticos identifiquem os pacientes com doenças mais agressivas e de modo mais confiável, e permitindo um tratamento primário mais eficaz e uma maior sobrevida. Algumas classes de marcadores epiteliais e mesenquimais têm sido utilizadas para determinar a presença de transição epitélio mesenquimal em tecidos neoplásicos. Essas classes abrangem proteínas de superfície como a E-caderina, e marcadores do citoesqueleto, como vimentina,  $\beta$ -catenina e fatores de transcrição como Snail, Slug e Twist1. Com este enfoque, realizamos um estudo retrospectivo, onde foram analisados um total de 109 pacientes do Hospital Ophir Loyola, no período de janeiro 2012 a novembro 2014. Foi investigada a expressão proteica do Twist1, Kai1 e E-caderina em tecidos de pênis com lesões benignas e malignas, buscando evidenciar o padrão de imunorreatividade destas, assim como correlacionar este padrão quanto às características de progressão e invasão do câncer de pênis bem como características clínico-patológicas deste tumor. Em relação a E-caderina, 48,6% dos pacientes com câncer de pênis apresentavam expressão reduzida ou ausente. Não houve associação da expressão diminuída da E-caderina com outros fatores clínicos ou patológicos, tendo este resultado significado estatístico. A expressão aumentada do Twist1 também não esteve associada com fatores clínicos ou patológico, bem como o KAI1. Houve relação estatística entre diminuição de expressão E-caderina e Twist1. Obtivemos um resultado inconclusivo da entre a expressão diminuída de E-caderina e Kai1, e não houve significância estatística da análise entre as proteínas Twist1 e Kai1.

Palavras-chave: 1. Aparelho genital masculino - Doenças. 2. Câncer. 3. Pênis. 4. Câncer - Aspectos psicosociais.

## ABSTRACT

Penile neoplasms are a rare disease in developed nations and occur more in the development areas, which states as a major problem of public health by its mutilating features that may lead to social and psychological problems for the patient. The most important prognosis factor are the lymph node involvement and the presence of distance metastasis. Those patients who have these features rarely survive for five years. By the other side, the prognosis is good at the initial phases and the cure is obtained in most of the cases. In the search for more reliable prognosis indicators, countless of genes and proteins associated with the penile carcinogenesis have been evaluated for a better understanding of the process, in order to achieve more accurate diagnosis methods to identify patients with aggressive disease, then submit them to a more efficient primary treatment and a better survival rate. Some groups of epithelial and mesenchymal markers have been used to determine the transition of mesenchymal epithelium in neoplasm tissues. Those groups include surface proteins like E-cadherin and cytoskeleton markers, as vimentin and  $\beta$ -catenin, and transcription factors, as Snail, Slug and Twist1. With this approach, we did a retrospective study which was analyzed 109 patients from Ophir Loyola Hospital, between January 2012 to November 2014. It was investigated the protein expression of Twist1, Kai1 and E-cadherin in penile tissues with benign and malignant lesions to look for evidence of the immunoreactivity pattern and correlate that immunoreactivity pattern with the progression and invasion features of the penile neoplasms and other clinicopathological features of the studied tumor. In relation to E-cadherin, 48,6% of the patients had lower expression of this protein when compared to non-neoplasms tissues, this result showed statistical significance. But the association of the abnormal expression of E-cadherin with other clinicopathological factors was not found. The higher expression of Twist1 it was not associated with clinicopathological factors and the Kai1. There was statistical significance when we simultaneously compared the defective expression of E-cadherin and Kai1 and we obtained an inconclusive outcome about the association between them and there was not statistical significance among the analysis of the Twist1 e Kai1 proteins.

Keywords: 1. Male genital system - Diseases. 2. Cancer. 3. Penile. 4. Cancer - psychosocial aspects

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

|  | Páginas |
|--|---------|
| Figura 1- Incidência de Carcinoma de pênis nas Mesorregiões do Estado do Pará.   | 6       |
| Figura 2- Anatomia do pênis.   | 7       |
| Figura 3- Classificação Tumoral TNM 2010.  | 11      |
| Figura 4- Metástases Linfonodais.  | 12      |
| Figura 5- Rede linfática da região inguino-femural   | 15      |
| Figura 6- Transição epitélio mesenquimal   | 17      |
| Figura 7- Foto de imuno-histoquímica com imunomarcção normal e com redução da expressão de E-caderina  | 33      |
| Figura 8- Foto de imuno-histoquímica com marcação de Twist1 em tecido não-tumoral, com localização citoplasmática e somente na camada basal. | 37      |
| Figura 9- Foto de imuno-histoquímica com marcação de Twist1 em tecido tumoral, com localização nuclear.                                      | 38      |
| Figura 10- Foto de imuno-histoquímica com marcação de KAI1 localizado na membrana citoplasmática   | 39      |

**LISTA DE TABELAS**

|  | Páginas |
|--|---------|
| Tabela 1- Estadiamento TNM   | 10      |
| Tabela 2 - Faixa etária dos pacientes com câncer de pênis que constituem a casuística da pesquisa.         | 30      |
| Tabela 3- Expressão de E-caderina em tecidos neoplásicos e não neoplásicos.                                | 31      |
| Tabela 4- Expressão de E-caderina de acordo com as características patológicas dos pacientes investigados. | 33      |
| Tabela 5- Tipo de expressão de Twist1 conforme características patológicas.                                | 36      |
| Tabela 6- Expressão de Kai1 conforme características patológicas das amostras.                             | 39      |

## SUMÁRIO

|  |     |
|--|-----|
| 1 INTRODUÇÃO.....                                  | 2   |
| 1.1 Carcinoma de Pênis: Considerações Gerais ..... | 2   |
| 1.2 Fatores etiológicos e de risco .....           | 2   |
| 1.3 Epidemiologia.....                             | 5   |
| 1.4 Caracterização do tumor.....                   | 7   |
| 1.5 Modalidades de tratamento .....                | 12  |
| 1.5.1 Tratamento da lesão primária.....            | 13  |
| 1.5.2 Tratamento dos linfonodos regionais .....    | 14  |
| 1.6 Transição Epitélio Mesênquimal .....           | 15  |
| 1.7 E-Caderina.....                                | 19  |
| 1.8 Kai1 .....                                     | 20  |
| 1.9 Twist1.....                                    | 21  |
| 2 JUSTIFICATIVA E APLICABILIDADE.....              | 23  |
| 3 OBJETIVOS.....                                   | 24  |
| 3.1 Objetivo geral .....                           | 24  |
| 3.2 Objetivos específicos .....                    | 24  |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS .....                         | 255 |
| 4.1 Casuística.....                                | 25  |
| 4.2 Critérios de inclusão .....                    | 25  |
| 4.3 Critérios de exclusão .....                    | 25  |
| 4.4 Aspectos éticos .....                          | 26  |
| 4.5 Imunohistoquímica .....                        | 26  |
| 4.6 Análise Estatística.....                       | 28  |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                      | 29  |
| 6 CONCLUSÕES.....                                  | 41  |
| 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                  | 42  |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Carcinoma de Pênis: Considerações Gerais

O câncer de pênis é uma doença rara em nações desenvolvidas, sendo mais comum em regiões em desenvolvimento figurando como um importante problema de saúde pública, por ter um caráter mutilante, que pode acarretar problemas psicológicos e sociais ao paciente acometido (BARROS *et al.*, 2009; KOIFMAN *et al.*, 2011).

Um agravante neste panorama é o fato de que o diagnóstico, na maioria dos casos, é realizado em estágios avançados, sendo observada uma sobrevida geral baixa. O fator prognóstico mais importante do câncer de pênis é o comprometimento linfonodal e a presença de metástases à distância. Os pacientes que apresentam estas características raramente sobrevivem por cinco anos (NARDOZA JÚNIOR; ZERSTI FILHO; REIS, 2010). Por outro lado, nos estádios iniciais da doença o prognóstico é bom, obtendo-se cura na maioria dos casos.

Apesar de muitos fatores estarem relacionados ao surgimento ou não da metástase linfonodal a maior parte deles não apresenta reprodutibilidade e confiabilidade suficiente para serem tomados como indicadores de condutas (BATISTA *et al.*, 2014). Ademais, as decisões acerca da modalidade terapêutica nestes tumores são baseadas em parâmetros clínico-patológicos, incluindo principalmente o estadiamento clínico TNM e a gradação histológica. Apesar de úteis, estes fatores frequentemente falham na diferenciação entre lesões mais ou menos agressivas.

Na busca por indicadores prognósticos mais confiáveis, inúmeros genes/proteínas associados à carcinogênese peniana têm sido avaliados vislumbrando um melhor entendimento deste processo, para que métodos mais precisos de diagnósticos identifiquem pacientes com doenças mais agressivas de modo mais confiável, e sejam submetidos a um tratamento primário precoce mais eficaz e permitindo uma maior sobrevida.

### 1.2 Fatores etiológicos e de risco do carcinoma de pênis

Dentre os principais fatores de risco para o câncer de pênis estão: a presença de fimose, ausência da prática de circuncisão, más condições de higiene pessoal, baixo padrão socioeconômico, os efeitos crônicos e irritativos da pele – nos quais o acúmulo de esmegma abaixo do prepúcio aumenta a incidência de patologias inflamatórias como a balanite crônica e a balanite xerótica obliterante, além de predispor à fibrose do prepúcio, o número de parceiros sexuais, o histórico de doenças venéreas, infecção por HPV e tabagismo (MISRA *et al.*, 2004; DALING *et al.*, 2005; BLEEKER *et al.*, 2009; GUIMARÃES *et al.*, 2011;).

A ausência de água corrente em países subdesenvolvidos prejudica a higiene adequada, inclusive obrigando as populações desses países ao costume do banho público, que dificulta a limpeza dos genitais por pudor (PERSKY, 1977; REDDY *et al.*, 1984). Diferente deste trabalho, um estudo epidemiológico realizado no estado do Pará, que possui vasta rede fluvial, chamou atenção a não observação de câncer de pênis na população indígena. Apesar de não realizarem o ritual da circuncisão, o hábito de utilizarem banho de imersão para a higiene parece atuar como fator de proteção (FONSECA *et al.*, 2000). Adicionalmente, as populações com melhor nível socioeconômico e cultural, as quais realizam uma higiene adequada, apresentam baixos índices de desenvolvimento dessa neoplasia (DALING *et al.*, 2005; BLEEKER *et al.*, 2009).

Apesar da circuncisão neonatal de rotina para prevenção de câncer de pênis ainda representar um ponto controverso na literatura mundial, a Associação Americana de Pediatria publicou revisão favorável à realização da mesma em neonatos, pois os benefícios de redução de neoplasia de pênis e infecção por HIV e HPV superam os riscos (MADEN *et al.*, 1993; REYNOLDS *et al.*, 2004; AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2012;).

Outro fator que está associada ao carcinoma epidérmico de pênis é a presença do HPV que foi demonstrada pela primeira vez no Brasil na década de 1980 (VILLA; LOPES, 1986). O HPV afeta o epitélio escamoso da genitália masculina da mesma forma que a feminina. Essa infecção ocorre através de micro traumatismos, na qual a progressão da incubação viral para a expressão ativa depende de três fatores: permissividade celular, tipo de vírus e condição imunológica do hospedeiro (GROSS *et al.*, 2004; BLEEKER *et al.*, 2009.). O genoma do HPV codifica a oncoproteína E6, que se complexa com a proteína de supressão tumoral TP53, e oncoproteína E7, que liga-se a proteína do retinoblastoma (RB) afetando a ação destas e por consequência a regulação do ciclo celular (BLEEKER *et al.*, 2009; PIZZOCARO *et al.*, 2010).

Os HPV's 6 e 11 são os mais comumente associados às lesões não neoplásicas, como verrugas genitais, podendo ser encontrados no carcinoma verrucoso; enquanto os tipos 16, 18, 31 e 33 entre outros são associados com carcinoma *in situ* e invasivo. O HPV 16 é o mais frequentemente detectado na lesão primária tendo sido também descrito nas lesões metastáticas de pênis (VILLA; LOPES, 1986; VARMA *et al.*, 1991; GROSS *et al.*, 2004; TORNESELLO *et al.*, 2008).

A manifestação clínica mais comum da infecção do HPV são as verrugas genitais denominadas condiloma acuminado, derivam de subtipos virais de baixo risco (6 e 11) em 90% dos casos, sendo o prepúcio e a glândula peniana os sítios de maior acometimento. Enquanto que infecção com vírus de alto risco, pode ocorrer em 19% a 44% dos pacientes (GROSS *et al.*, 2004; DALING *et al.*, 2005).

Enquanto uma grande proporção de infecções pelo HPV regride espontaneamente, um número de pacientes persiste com a infecção, mantendo risco de desenvolver neoplasia intra-epitelial do pênis e, ocasionalmente carcinoma invasivo (CRISPEN *et al.*, 2010). Segundo Fonseca *et al.* (2013) a análise em relação à prevalência, distribuição e importância prognóstica para metástases linfonodais em carcinoma escamoso do pênis, do papiloma vírus humano, na população selecionada na região norte do Brasil, observou que a prevalência do HPV encontrada nas amostras histológicas foi de 60,9%, os tipos virais predominantes nas amostras foram os 11 e 6, a presença viral não mostrou qualquer correlação com a sobrevida livre de doença inguinal, sugerindo que esta associação não esteja envolvida nos mecanismos moleculares das metástases linfonodais em câncer de pênis. Mostrou ainda que os subgrupos virais de alto risco, baixo risco ou infecção múltipla não mostraram correlação com metástases linfonodais em câncer de pênis, sugerindo que a infecção viral possa exercer algum papel na etiologia da doença, mas não nos mecanismos de metástases. Os tumores com a presença do HPV mostraram-se mais diferenciados, em relação ao grau histológico, que os tumores com ausência do HPV, a presença de vírus do grupo de alto risco correlacionou-se significativamente como subtipo histológico basalóide e, a ausência deste mostrou relação com tumores de maior estágio patológico.

O tabagismo também é reportado como fator de risco ao câncer de pênis (MUNEER *et al.*, 2009), independentemente do contato direto da droga com o tecido. Porém, essa relação ainda não está bem estabelecida, apesar de alguns trabalhos evidenciarem o risco aumentado entre os fumantes.

Hellberg e Nilsson (1989) em um estudo com 244 pacientes com câncer de pênis e 232 pacientes no grupo controle o tabagismo foi fator de risco independente para o surgimento da neoplasia. Outro estudo mais recente, avaliou 54 pacientes, dos quais, 70% eram fumantes (PAHWA *et al.*, 2012), parecendo haver efeito dose-resposta no aumento do risco nos pacientes com câncer de pênis (SPIESS *et al.*, 2013).

Harish e Ravi (1995) encontraram associação significativa entre fumar ou mascar tabaco e o desenvolvimento do carcinoma de pênis. Em 503 homens pareados por idade, a análise multivariada demonstrou uma significativa associação e relação dose-dependente. Dillner *et al.* (2000) também encontraram uma associação consistente entre o câncer de pênis e o hábito de fumar a partir de levantamento de publicações científicas no MEDLINE de 1966-2000.

### 1.3 Epidemiologia

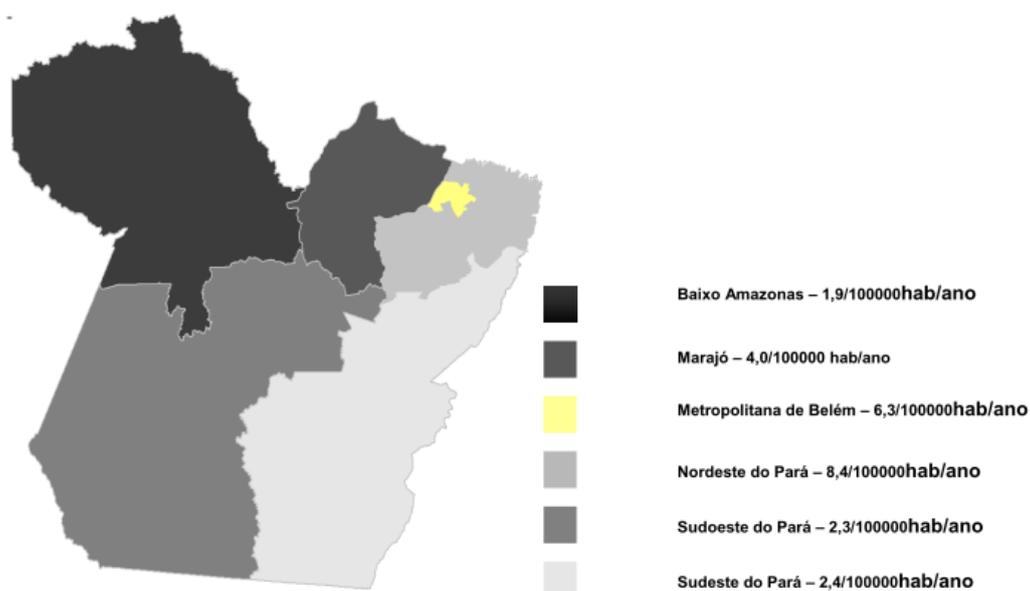
Em países desenvolvidos como os Estados Unidos por exemplo, sua incidência é de 0,7/100.000 homens/ano. Na Espanha, a incidência é entre 0,7 e 1,5/100.000 homens/ano corroborando com a incidência na Europa de menos de dois casos para cada 100.000 homens/ano (FERRÁNDIZ-PULIDO *et al.*, 2012).

No entanto, em muitos países da África, América do Sul e Ásia, a doença representa um problema de saúde importante. A maioria dos casos no mundo ocorre na Índia, Brasil e Uganda, com uma incidência de quatro a seis vezes maior do que os países desenvolvidos (COUTO *et al.*, 2014).

No Brasil, dentre as neoplasias malignas do homem, o câncer de pênis corresponde a aproximadamente 2,1% (MICALI *et al.*, 2006), sendo a incidência maior nas regiões Norte e Nordeste, onde as condições socioeconômicas são precárias (BRUMINI *et al.*, 1982). Entre 2006 e 2007, a Sociedade Brasileira de Urologia realizou um estudo epidemiológico e relatou que em algumas regiões de maior incidência o câncer de pênis corresponde a aproximadamente 2,9 a 6,8 casos/100.000 habitantes, superando muitas vezes os casos de câncer de próstata e bexiga (FAVORITO *et al.*, 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Em 2010, Fonseca *et al.*, realizaram um estudo epidemiológico no estado do Pará, em 346 pacientes com diagnóstico histológico de câncer de pênis, demonstrando a distribuição das incidências relacionadas a cada mesorregião do Estado no período de 1996

a 2006 (Figura 1). Neste estudo, constataram que a incidência da doença no período estudado foi de 5,7/100.000 habitantes/ano. A prevalência desses tumores na instituição do Hospital Ofir Loyola foi de 3,5%, representando a oitava neoplasia maligna mais frequente no sexo masculino e 15,7% entre os tumores urogenitais, sendo o segundo tumor urológico mais frequente.



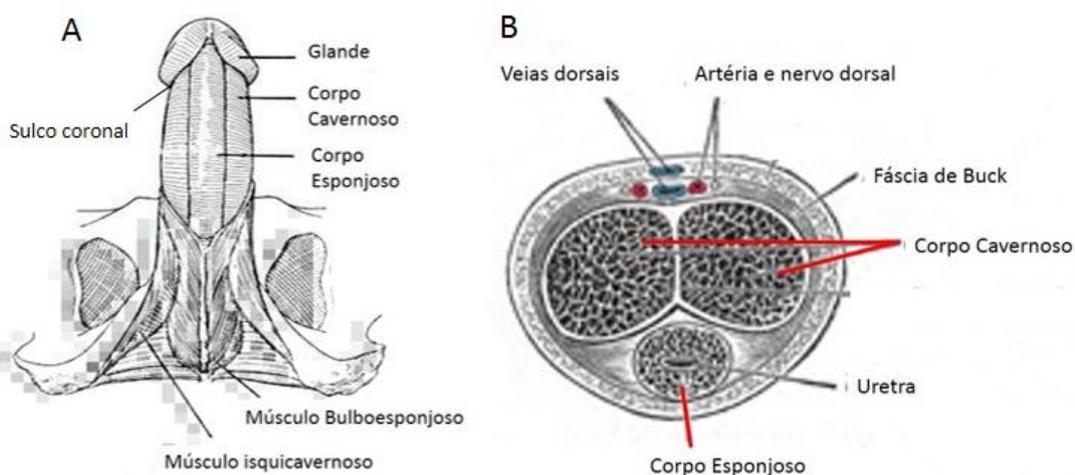
**Figura 1** - Incidência de Carcinoma de pênis nas Mesorregiões do Estado do Pará.  
Fonte: FONSECA *et al.*, 2010.

A doença acomete principalmente homens de baixa classe social e nível de instrução, com pico de incidência entre a sexta e sétima décadas (RIPPENTROP, 2004) e parece não ter distinção entre as etnias negra e branca quando se compara nível social semelhante (FAVORITO *et al.*, 2008). As populações com melhor nível socioeconômico e cultural, nas quais são realizadas uma higiene adequada, apresentam baixos índices de desenvolvimento dessa neoplasia (DALING *et al.*, 2005; BLEEKER *et al.*, 2009).

Pacientes com câncer de pênis, mais frequentemente que em outros tipos de câncer, demoram a procurar serviço de atenção médica 15 a 50% dos pacientes demoram mais de um ano (KOCATURK *et al.*, 2012). Morar com parceira estável não alterou esse atraso. A causa mais comum foi o sentimento de vergonha por sintomas localizados na área sexual (FAVORITO *et al.*, 2008).

### 1.3 Caracterização do tumor

A maioria das neoplasias malignas de pênis é constituída por carcinoma escamoso de pênis correspondendo a mais de 95% dos casos, derivados do epitélio estratificado, tanto da glânde como do sulco coronal e prepúcio (Figura 2). Os carcinomas epidermóide usuais constituem o grupo mais comum (FRALEY *et al.*, 1989; HORENBLAS *et al.*, 1993; VELAZQUEZ; AYALA, LIU, 2008).



**Figura 2** - Anatomia do pênis. A) Visão ventral das estruturas anatômicas; B) Corte coronal.  
Fonte: Active Medical, 2015.

A Organização Mundial de Saúde (EBLE *et al.*, 2004), lançou uma classificação histopatológica dos carcinomas de pênis, na qual se destacam uma grande variedade de subtipos tais como: os carcinomas basalóide, as variantes verrucosas (Warty, papilífero, cuniculatum), o carcinoma *in situ*, conhecido como eritroplasia de Queyrat e doença de Bowen, que se apresenta na forma de modificações celulares epiteliais não invasivas e os carcinomas sarcomatóides (CUBILLA *et al.*, 2001; GUIMARÃES *et al.*, 2009). Recentemente descrito, o carcinoma acantolítico (CUNHA *et al.*, 2009).

A transformação maligna do epitélio de revestimento do pênis segue evolutivamente por fases, até romper a membrana basal e invadir o estroma. Progressivamente essas fases são: o PIN I, II e III (neoplasia intra-epitelial), todas consideradas lesões pré-malignas do

epitélio. O PIN III representa o carcinoma *in situ* estabelecido (GROSSMAN, 1992; LUCIA; MILLER, 1992). Os principais representantes clínicos do carcinoma *in situ* são: Doença de Bowen, eritroplasia de Queirat e a papulose Bowenóide (GROSSMAN, 1992; LUCIA; MILLER, 1992). A mais frequentemente associada com câncer de pênis é a Eritroplasia de Queirat, que sofre degeneração entre 10 a 33% dos casos (GERBER, 1994; MICALI *et al.*, 1996). Outras dermatoses como a balanite xerótica obliterante, leucoplasia, balanopostites crônicas e calo peniano, são também relacionadas com o câncer epidermóide de pênis. Entretanto, o verdadeiro papel das mesmas carecem de dados homogêneos e confiáveis. A associação destas lesões com o câncer epidermóide de pênis, varia segundo a literatura entre 7 e 40% (GROSSMAN, 1992; LUCIA; MILLER, 1992; LYNCH; SCHELLHAMMER, 1998).

Além da classificação histológica, também é importante o grau de diferenciação histológica em tumores bem diferenciados, moderadamente diferenciados e pouco diferenciados, já que essa gradação tem valor preditivo de comprometimento linfonodal e sobrevida global (VELAZQUEZ; AYALA; LIU, 2008). A definição do subtipo histológico tem papel importante no prognóstico e está relacionado ao envolvimento de metástases linfonodais e óbito (GUIMARÃES *et al.*, 2009). Tumores pouco diferenciados apresentam risco maior de desenvolvimento de metástases (FICARRA *et al.*, 2002; CUNHA *et al.*, 2009; CHAUX *et al.*, 2010).

Os tumores classificados como de baixo grau mostram hiperqueratose e papilomatose, células escamosas pouco atípicas, mostrando pontes intercelulares proeminentes, com poucas figuras mitóticas e núcleos pleomórficos aumentados com um ou mais nucléolos proeminentes. Neoplasias menos diferenciadas mostram pouca ou nenhuma queratinização, maior atipia nuclear e atividade mitótica, e maior invasão com áreas de necrose. Na derme, um infiltrado linfocítico ou inflamatório pode estar presente (MICALI *et al.*, 2006). Existe correlação entre o tipo histológico e comportamento biológico do tumor. Tumores grau I e III apresentam metástases inguinais em 15 e 75% dos casos respectivamente (BLEEKER *et al.*, 2009).

O padrão de invasão tumoral é outra variável relacionada a um pior prognóstico. Estudos demonstraram que tumores com padrão de crescimento infiltrativo, invadindo o estroma em grupos pequenos de células, têm maior risco de embolização linfática do que tumores com padrão de crescimento exofítico nos quais a invasão ocorre em grandes grupos

de células, mantendo uma interface tumor-hospedeiro bem definida (GUIMARÃES *et al.*, 2006).

O sistema de classificação TNM (Tabela 1), outra variável importante na determinação do pior prognóstico, visa avaliar a doença sobre vários aspectos, principalmente em relação à invasão angiolinfática. O estadiamento do câncer de pênis é mais comumente realizado utilizando-se a sétima edição do TNM da American Joint Committee (AJCC, 2010), que baseia-se na avaliação da extensão tumoral (T), extensão do comprometimento linfonodal (N) e presença de metástases (M), como descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Estadiamento TNM (2010).**T - Tumor primário**

TX Tumor primário não pode ser avaliado

T0 Sem evidência de tumor primário

Tis Carcinoma *in situ*

Ta Carcinoma verrucoso não invasivo

T1 Tumor invade o tecido conjuntivo subepitelial

T1a: sem invasão linfovascular e bem ou moderadamente diferenciado (Grau 1-2)

T1b: com invasão linfovascular ou pouco diferenciado/indiferenciado (Grau 3-4)

T2 Tumor invade o corpo esponjoso/corpo cavernoso

T3 Tumor invade a uretra

T4 Tumor invade outras estruturas adjacentes

**N - Linfonodos regionais (Clínico e Patológico)**

cNX Os linfonodos regionais não podem ser avaliados

cN0 Sem linfonodos inguinais aumentados visíveis ou palpáveis

cN1 Linfonodo inguinal palpável móvel unilateral

cN2 Linfonodos inguinais palpáveis móveis múltiplos ou bilaterais

cN3 Massa de linfonodos inguinais fixa ou linfadenopatia pélvica, unilateral ou bilateral

pNX Os linfonodos regionais não podem ser avaliados

pN0 Ausência de metástase em linfonodos regionais

pN1 Metástase intranodal em um único linfonodo inguinal

pN2 Metástases em múltiplos linfonodos inguinais ou em linfonodos inguinais bilaterais

pN3 Metástases em linfonodo(s) pélvico(s), unilaterais ou bilaterais, ou extensãoextranodal de metástases em linfonodos regionais

**M - Metástase à distância**

Mx Metástases à distância não pode ser avaliada

M0 Sem metástase à distância

M1 Metástase à distância

**G - Graduação histopatológica**

Gx O grau de diferenciação não pode ser avaliado

G1 Bem diferenciado

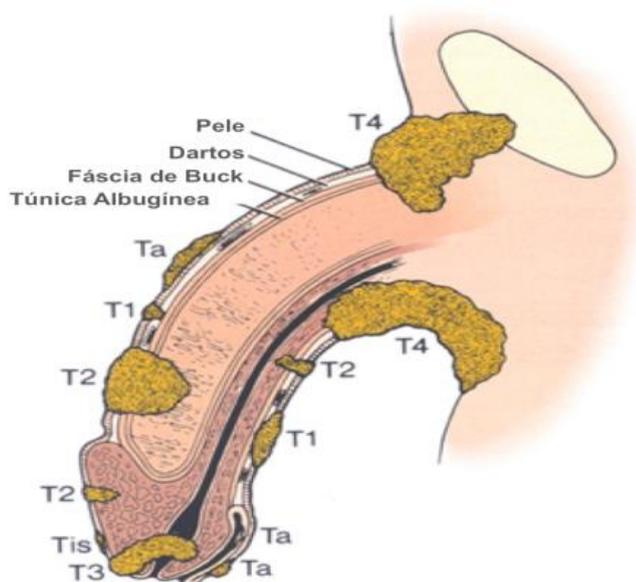
G2 Moderadamente diferenciado

G3 Pouco diferenciado

G4 Indiferenciado

Fonte: Adaptado de AJCC Cancer Staging Manual (2010).

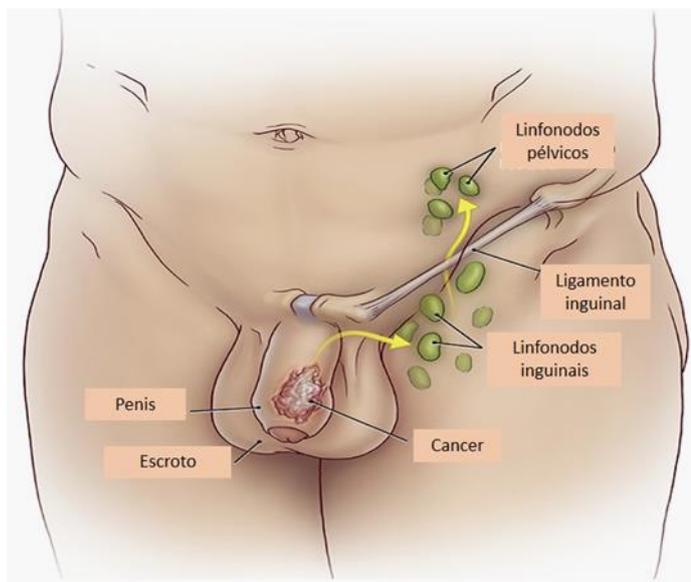
Algumas mudanças ocorreram em relação a sexta edição: T1 foi subdividido em T1a e T1b baseado na presença ou ausência de invasão linfovascular ou indiferenciação tumoral; a categoria T3 foi limitada a invasão uretral e a invasão prostática agora é considerada T4; estadiamento linfonodal é dividido agora em clínico e patológico; a distinção entre linfonodos inguinais superficiais e profundos não existe mais; o grupo T1bN0M0 foi colocado no estágio II, assim como os grupos T2N0M0 e T3N0M0 (Figura 3) (EDGE, 2010).



**Figura 3** - Classificação Tumoral TNM 2010.

Fonte: Adaptado de Institute of the Study of Urologic Diseases. Salônica, Grécia.

Geralmente, o câncer de pênis inicia-se como uma lesão na glândula que, quando não tratada estende-se para o prepúcio e evolui infiltrando tecidos adjacentes como o tecido subepitelial conjuntivo, o corpo esponjoso e o corpo cavernoso até invadir órgãos adjacentes como próstata e bexiga levando à auto amputação (POMPEO *et al.*, 2006). Metástases linfonodais nas regiões femoral e ilíaca são vias de disseminação no carcinoma de pênis, consideradas principal fator prognóstico nessa neoplasia (Figura 3) (CUBILLA, 2009). A invasão perineural também se associa a um pior prognóstico e está relacionado ao comportamento biológico do tumor (CUBILLA *et al.*, 2007; VELAZQUEZ; AYALA, LIU, 2008).



**Figura 4** - Metástases Linfonodais.

Fonte: Adaptado de <http://www.mdanderson.org/patient-and-cancer-information/cancer-information/cancer-types/penilecancer/diagnosis/index.html>

O risco de envolvimento linfonodal varia de 0 a 48% em tumores G1, de 32 a 79% em G2, e 47 a 100% em G3 (SLATON *et al.*, 2001; BLEEKER *et al.*, 2009). No estudo de Horenblas *et al.* em 1994, houve diferença estatística na sobrevida em cinco anos entre pacientes com tumores G1 (79%) e pacientes com tumores G3 (47%). Tumores bem diferenciados costumam ocorrer em pacientes mais velhos e usualmente associados com líquen escleroso preexistente e tem risco baixo de disseminação metastática (BLEEKER *et al.*, 2009; MICALI *et al.*, 2006).

### 1.5 Modalidades de tratamento

O tratamento do carcinoma escamoso de pênis deve ser individualizado e se basear nas características da lesão primária e no estadiamento. Apesar das diversas modalidades terapêuticas, o tratamento cirúrgico continua sendo o mais empregado e com melhores resultados (ORNELAS *et al.*, 1994; AGRAWAL *et al.*, 2000; LYNCH *et al.*, 2002; POMPEO *et al.*, 2010).

### 1.5.1 Tratamento da lesão primária

Está dirigido para a eliminação completa do tumor obtida pela excisão cirúrgica com margem de segurança entre 1 e 2 cm, avaliada por histologia negativa do tecido neoplásico (congelação). Agrawal *et al.* (2000), após estudar os limites cirúrgicos de 64 pacientes, recomenda margens negativas de 10 mm para tumores grau I e II e de 15 mm para tumores grau III. A preservação de segmento peniano que permita vida sexual satisfatória é desejável, desde que não comprometa o êxito de uma operação oncológica. A extensão da excisão, portanto, depende da localização e dimensões do tumor (HOREMBLAS *et al.*, 1992; AGRAWAL *et al.*, 2000; POMPEU *et al.*, 2010).

Lesões pequenas localizadas no prepúcio podem ser tratadas por circuncisão, embora os índices de recorrência sejam altos (20-30%), o que significa que os pacientes assim tratados devem ter seguimento frequente (HOREMBLAS *et al.*, 1992; LYNCH *et al.*, 2002; POMPEO *et al.*, 2010). Tumores pequenos, únicos, localizados na glândula, tem como opção o tratamento por procedimento conservador como a glandectomia ou, ainda, com excisão tumoral associada a utilização de enxertos dérmicos, guardando-se sempre o princípio de margens livres (HOREMBLAS *et al.*, 1992; MCDOUGAL *et al.*, 2005; POMPEU *et al.*, 2010).

A penectomia é o tratamento “padrão ouro” para a lesão primária do câncer epidermóide de pênis. Quando parcial requer transecção dos corpos cavernosos. A uretra e o corpo esponjoso devem ser deixados com maior comprimento (1cm), o que favorece spatulação uretral e diminuição dos riscos de estenose e retração (HOREMBLAS *et al.*, 1992; LYNCH *et al.*, 2002; POMPEO *et al.*, 2010).

Como esses tumores são comumente ulcerados e infectados recomenda-se o uso de antibióticos de largo espectro por 3-5 dias no pré e no pós operatório. Durante a operação deve-se envolver a lesão com luva ou preservativo estéril para diminuir a contaminação e disseminação de células neoplásicas. Para diminuir a perda sanguínea deve-se por um dreno penrose ao redor da base do pênis servindo de torniquete (LYNCH *et al.*, 2002; POMPEO *et al.*, 2010).

Existe a técnica Micrográfica de Mohls para tumores de pequenas dimensões e inclui a remoção da lesão e o estudo microscópico de cada camada retirada. Apesar de conservadora esta técnica é limitada pelo tamanho da lesão, pois aquelas maiores ou iguais

a 2cm ou com histologia desfavorável tem alto índice de recidiva (LYNCH *et al.*, 2002; POMPEO *et al.*, 2010).

A radioterapia externa ou a braquiterapia podem ser oferecidas a um grupo restrito de pacientes que rejeitam a cirurgia. Destaque-se porém que o carcinoma escamoso do pênis costuma ser radiorresistente e os casos com boa resposta inicial tem níveis significativos de recidiva local. Além das frequentes complicações locais. A crioterapia constitui opção válida para lesões pequenas, superficiais ou para pacientes que não aceitam a cirurgia (LYNCH *et al.*, 2002; AZRIF *et al.*, 2006; HERGATY *et al.*, 2006; POMPEO *et al.*, 2010).

Tumores que envolvem extensamente o pênis são tratados mais adequadamente por penectomia total com realização de uretostomia perineal. Em tumores mais avançados, que invadem proximalmente os corpos cavernosos e o escroto, deve ser considerada a emasculação, que consiste na penectomia total, escrotoectomia e orquiectomia bilateral (ORNELAS *et al.*, 1994; AGRAWAL *et al.*, 2000; LYNCH *et al.*, 2002; MCDOUGAL *et al.*, 2005; HERGATY *et al.*, 2006; POMPEO *et al.*, 2010).

#### 1.5.2 Tratamento dos linfonodos regionais:

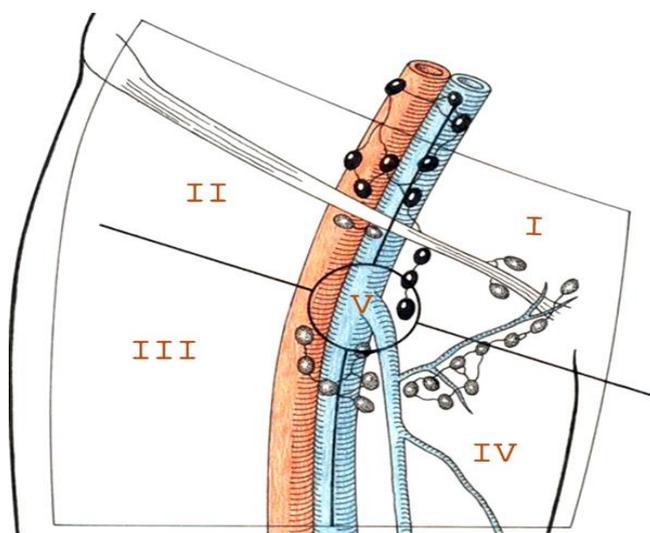
A probabilidade de cura dos pacientes com infiltração dos linfonodos inguinais torna-se significativamente comprometida, reconhecendo-se esta condição como fator prognóstico mais importante na evolução dos pacientes. Embora exista tendência para se considerar o tratamento cirúrgico ou mesmo radioterápico dos linfonodos depois da excisão cirúrgica da lesão primária, este tema permanece controverso, principalmente pela dificuldade de avaliação clínica do envolvimento linfonodal de maneira não invasiva (NARDI *et al.*, 2013).

Tradicionalmente, a região inguinal é dividida em quatro seções por uma linha horizontal e uma projeção vertical através da fossa ovalis. O grupo superficial é dividido em cinco subgrupos anatômicos com a zona central a ser localizado na confluência da veia safena magna e veia femoral. As outras quatro zonas são descritos como lateral superior, lateral inferior, superior medial e medial inferior (Figura 4) (PROTZEL *et al.*, 2009).

As controvérsias referem-se à necessidade de realização de linfadenectomias sistematicamente, à técnica, lateralidade, extensão, momento e às complicações cirúrgicas de menor ou maior gravidade (necroses cutâneas, deiscências, infecções, drenagem linfática, linfocele) encontradas em 50% dos casos (NARDI *et al.*, 2013).

A imprecisão do estadiamento clínico desses tumores é fato reconhecido. Aproximadamente 20% dos linfonodos clinicamente negativos têm metástases ocultas e 50% daqueles com linfonodos inguinais palpáveis não tem histologia positiva para neoplasia quando operados. Isto não teria grande importância se a maioria das técnicas utilizadas para a linfadenectomia apresentasse índices aceitáveis de complicações pós-operatórias (LYNCH *et al.*, 2002; POMPEU *et al.*, 2005; POMPEU *et al.*, 2010).

A radioterapia das regiões inguinais, preconizada no passado, está praticamente em desuso visto que essas áreas toleram mal as doses necessárias, pelos riscos de linfedema, ulcerações e necrose (LYNCH *et al.*, 2002; POMPEU *et al.*, 2005; POMPEU *et al.*, 2010).



**Figura 5** - Rede linfática da região inguino-femural. A região é dividida em cinco zonas: uma zona central (V), superior (I) e zonas medial inferiores (IV), e zonas laterais superiores (II) e inferiores (III).  
Fonte: Protzel *et al.*, 2009.

## 1.6 Transição Epitélio Mesenquimal

O epitélio caracteriza-se por um conjunto de células fortemente aderidas lateralmente por junções célula-célula, formando uma fina camada celular. Esta camada é polarizada, sendo que ápice e base da célula apresentam propriedades diferentes. Todas as células apresentam a mesma polaridade ápico-basal e sua superfície basal encontra-se situada sobre uma matriz extracelular especializada, a lâmina basal. As junções célula-célula são mediadas por uma série de proteínas, entre elas membros do complexo caderina-catenina, responsáveis

pela junção aderente na borda lateral da célula (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1997; ALBERTS *et al.*, 2004.).

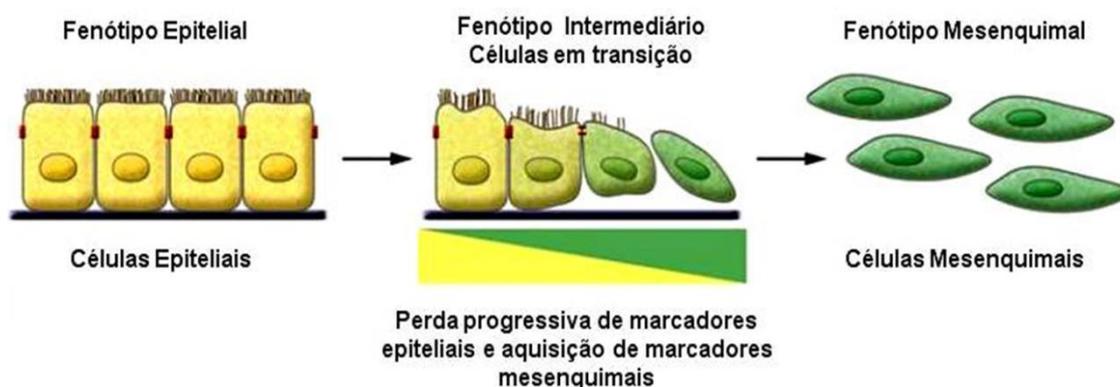
Por outro lado, as células mesenquimais formam uma rede tecidual difusa, onde a camada celular não é completa e a superfície da célula está conectada às células vizinhas somente por alguns pontos de contato, e não há polarização ápico-basal no citoesqueleto destas células. A matriz extracelular, formada por colágeno e fibronectina, apresenta-se, diferentemente da lâmina basal, como uma rede com vários pontos de adesão às células. (THIERY *et al.*, 2009; SCANLON *et al.*, 2013).

A transição epitélio mesenquimal é um processo que ocorre fisiologicamente durante algumas fases do desenvolvimento embrionário em algumas espécies de animais, que desempenha um papel crucial em muitos processos histogênicos, particularmente nos vertebrados, onde o coração, o sistema musculo-esquelético, a maioria das estruturas craniofaciais e os nervos periféricos são formados por esse mecanismo (ACLOQUE *et al.*, 2009).

Existem três tipos diferentes de transição epitélio mesenquimal com configurações biológicas que levam a consequências funcionais muito distintas. Por enquanto, os sinais específicos que a delinham nas três configurações ainda não são claros, no entanto, é bem aceito que as distinções funcionais são aparentes (KALLURI; WEINBERG, 2009; ZEISBERG; NEILSON, 2009; SOUZA, 2011; SCANLON *et al.*, 2013).

O tipo um, gera células mesenquimais para que haja modificação da função tecidual e é importante no cenário embrionário, onde as células epiteliais passam por vários processos de remodelamento, como intercalação, invaginação, evaginação, ramificação e formação de múltiplas camadas celulares. Este processo é importante, por exemplo, para a formação das três camadas do embrião durante a fase de gastrulação. O processo inverso, a transição mesenquimal epitelial, também pode ocorrer nesta fase. A maior parte dos tecidos e órgãos adultos surge a partir de uma série de conversões de células epiteliais para as células mesenquimais, através do programa de transição epitélio mesenquimal e do processo inverso, a transição mesenquimal epitelial (KALLURI; WEINBERG, 2009; SCANLON *et al.*, 2013). O tipo dois começa como parte de um evento de reparação que normalmente gera fibroblastos e outras células relacionadas, a fim de reconstruir tecidos após traumas e lesões inflamatórias. Na configuração de fibrose do órgão, a tipo 2 pode continuar a responder à inflamação persistente, levando eventualmente à destruição de órgãos (KALLURI; WEINBERG, 2009; ZEISBERG; NEILSON, 2009; SCANLON *et al.*, 2013).

Adversamente, a tipo três, pode promover a progressão e invasão de um tumor, ao permitir formação de uma célula fenotipicamente mesenquimal, que pode migrar para longe da camada epitelial na qual se originou. Neste processo, uma célula epitelial polarizada, que normalmente interage com a membrana basal por meio de sua superfície basal, sofre modificações bioquímicas, moleculares e morfológicas, as quais resultam na aquisição de um fenótipo de célula mesenquimal, cujas capacidades de migração, invasão e resistência à apoptose encontram-se aumentadas em relação as células epiteliais. Neste momento, ocorre a perda de expressão de alguns marcadores epiteliais, como a E-caderina, responsáveis pela estabilidade da ligação entre célula-célula. Outros marcadores mesenquimais como a vimentina, começam a ser expressos, dando à célula um fenótipo mais fusiforme e propício à invasão (Figura 6) (ACKLAND *et al.*, 2003; KALLURI; RADISKY, 2005; WEINBERG, 2009).



**Figura 6** – Transição epitélio mesenquimal: Modificação do fenótipo epitelial para um fenótipo mesenquimal.  
Fonte: Apatado de Kalluri e Weinberg, 2009.

Algumas classes de marcadores epiteliais e mesenquimais têm sido utilizadas para determinar a presença de transição epitélio mesenquimal em tecidos neoplásicos. Essas classes abrangem proteínas de superfície como a E-caderina, e marcadores do citoesqueleto, como vimentina,  $\beta$ -catenina e fatores de transcrição como Snail, Slug e Twist1 (ZEISBERG; NEILSON, 2009).

As mudanças bioquímicas associadas à transição epitélio mesenquimal podem ser induzidas por muitos fatores de transcrição. Pesquisas recentes têm mostrado papel importante das proteínas Snail e Slug na mediação da transição epitélio mesenquimal, em eventos celulares de migração, invasão, e sobrevivência, que podem levar à progressão de

neoplasias epiteliais e são hábeis para reprimir a transcrição da E-caderina, aumentar a expressão e a atividade das metaloproteínas de matriz e, como consequência, aumentar a capacidade de invasão das células tumorais (BATLLE *et al.*, 2000; OKUBO *et al.*, 2001; ZEISBERG; NEILSON, 2009; SOUZA, 2011).

A expressão do fator de transcrição Twist na progressão tumoral foi convincentemente associada com o processo metastático. Está envolvido na repressão de marcadores epiteliais, especificamente E-caderina,  $\beta$ -catenina e  $\gamma$ -catenina, ao mesmo tempo em que está envolvido na indução da expressão de marcadores mesenquimais, especificamente vimentina e fibronectina sendo estes também um marcador explorado em estudos que avaliam a transição epitélio mesenquimal (YANG *et al.*, 2004; KWOK *et al.*, 2005).

Um estudo realizado com amostras tumorais de bexiga mostrou uma correlação entre a alta expressão de Twist1 e a baixa expressão da E-caderina. No grupo com expressão de E-caderina preservada, a taxa de sobrevida em cinco anos foi melhor para pacientes com baixa expressão de Twist do que para aqueles com alta expressão desta proteína. Entre os tecidos tumorais, a expressão Twist1 era mais alta nas lesões metastáticas do que nos tumores primários. Além disso, os cânceres de bexiga também exibiram uma correlação significativa entre o aumento de Twist1 e redução de E-caderina (QIN *et al.*, 2012).

Segundo Vesuna *et al.* (2008), em linhagens celulares de câncer de mama, a elevada expressão de Twist1 demonstrou ter um papel direto no mecanismo de transição epitélio mesenquimal por baixa-regulação da expressão de E-caderina e promoveu um fenótipo invasivo metastático. Isto colocou em foco os múltiplos papéis de Twist em favorecer a transformação neoplásica, bem como fornecer uma via alternativa contra a qual novas estratégias terapêuticas podem ser construídas.

Apesar de muitos estudos fornecerem importantes informações sobre a compreensão da biologia dos tumores malignos bem como dos genes envolvidos na Transição epitélio mesenquimal, os mecanismos de Twist1 na tumorigênese e na transição epitélio mesenquimal do carcinoma escamoso de pênis ainda permanecem por serem elucidados.

## 1.7 E-caderina

As caderinas são glicoproteínas transmembrana de 720 a 750 aminoácidos, e se apresentam na forma de dímeros, constituídos por uma região extracelular N-terminal e por uma região citoplasmática de C-terminal. O domínio extracelular contém sequências repetidas às quais se liga o cálcio, essencial para a função adesiva das caderinas que na sua ausência sofrem uma enorme alteração conformacional, sendo degradadas por enzimas proteolíticas (WHEELLOCK; JOHNSON, 2003).

O domínio citoplasmático associa-se ao citosqueleto da célula, o que não acontece com outras moléculas de adesão como as selectinas, integrinas e membros da superfamília das imunoglobulinas. As caderinas foram nomeadas inicialmente de acordo com o tecido que as expressaram. A E-caderina é encontrada em vários tipos de células epiteliais, a pancaderina está presente em várias células placentárias e da epiderme e a N-caderina é expressa em células nervosas e nos músculos. Todas estas são classificadas como caderinas clássicas (LODISH *et al.*, 2000; DERICKE; BRACKE, 2004).

E-caderina é uma glicoproteína transmembranar de supressão tumoral essencial para a adesão célula-célula epitelial. O gene *CDH1*, localizado no cromossomo 16q22.1, codifica a E-caderina, que é sintetizada por um RNAm, encontrando-se madura na forma de uma glicoproteína de membrana com 120kDa (MAREEL; BRACKE; VAN ROY, 1995; BRACKE; VAN ROY; MAREEL, 1996).

Caderinas medeiam a adesão célula-célula através da interação dos seus domínios extracelulares com outras caderinas. A interrupção funcional da E-caderina é indispensável para transição epitelio mesenquimal durante a gastrulação e organogênese em que as células epiteliais são convertidas em células mesenquimais. Ao deixar de expressar E-caderina, as células tumorais passam a expressar altos níveis de N-caderina, potencializando as interações com fibroblastos e células endoteliais que também expressam N-caderina (BAUM; SETTLEMAN; QUINLAN, 2008).

Entre os diversos estudos que tem procurado modificações moleculares que fazem com que uma célula epitelial adquira propriedades de célula mesenquimal, é observada frequentemente a perda da transcrição de proteínas epiteliais como a E-caderina (KANG; MASSAGUE, 2004; LEE *et al.*, 2006).

Souza em 2011, em estudo com câncer de pênis evidenciou que a perda da E-caderina esteve associada com fatores clássicos de pior prognóstico: tumores histologicamente pouco diferenciados, de padrão de crescimento infiltrativo, com metástase linfonodal, invasão

perineural e angiolímfática e pior prognóstico. Campos *et al.* (2006) observaram que a baixa imunorreatividade de E-caderina está associada com a presença de metástase.

Masferrer e colaboradores (2015), evidenciaram a perda simultânea de expressão de E-caderina e aumento da expressão de vimentina em 43,5% dos casos de carcinoma de células escamosas do pênis. HPV foi significativamente associada com a perda de E-caderina, mas não com transição epitelial-mesenquimal. As taxas de recorrência e mortalidade foram significativamente maior nos casos que mostram transição epitelial-mesenquimal, portanto é associada com mau prognóstico.

## 1.8 Kai1

Kai1 é uma glicoproteína transmembrana presente em tecidos humanos normais com um importante papel como regulador do comportamento celular (DONG *et al.*, 1996; JACCKSON; MARREIROS; RUSSEL, 2005).

Kai1 (CD82, Kangai, ou C33), um membro da família tetraspaninas, é uma proteína transmembrana III que atravessa a membrana celular quatro vezes, formando assim uma pequena e uma grande alça extracelular bem como uma alça intracelular muito curta. As tetraspaninas não foram relacionadas à atividades enzimáticas intrínsecas, embora sejam conhecidos para organizar grandes complexos multiméricos. ECL2 tem uma região constante, ligada a oligomerização com outras tetraspaninas, e uma parte variável, que está implicada na organização de proteínas de membrana não-tetraspaninas, incluindo um receptor tirosina-cinase, proteínas adaptadoras que são parte integrante de cascatas de sinalização, e a proteínas de adesão de células e de sinalização a receptores da superfamília das integrinas (HEMLER *et al.*, 1996; KITADORO *et al.*, 2001; SEIGNUERET, 2006). Esses parceiros de interação são recrutados por um "microdomínio enriquecido com tetraspaninas" onde a transdução de sinal ocorre (CHARRIN *et al.*, 2003; ESPENEL *et al.*, 2008; HEMLER *et al.*, 2005; BERDITCHEVSKI *et al.*, 2007). Através destas interações, tetraspaninas regulam uma variedade de acontecimentos celulares, incluindo a transcrição, a sinalização celular, adesão, migração, sobrevivência, endocitose e a exocitose, a diferenciação e a fusão, por mecanismos ainda não totalmente resolvidos (MAECKER *et al.*, 1997; HEMLER *et al.*, 2001; HEMLER *et al.*, 2003).

*KAI1* foi originalmente identificado como um supressor de progressão de metástase em modelo de câncer de próstata em rato (DONG *et al.*, 1995; MAECKER *et al.*, 1997; HEMLER *et al.*, 2001; STIPP; KOLESNIKOVA; HEMLER, 2003). Evidências acumuladas salientam o papel do Kai1 como um supressor de amplo espectro de invasão e metástase. Em tumores sólidos malignos, detecção de Kai1 indica um bom prognóstico para pacientes com câncer, consequentemente, uma perda ou baixa expressão está diretamente correlacionada com prognóstico ruim em alguns outros tipos de câncer, incluindo próstata, pulmão, pâncreas, mama, bexiga, cólon, cervical, colo uterino, endométrio e ovário (YCHIKAWA *et al.*, 1992; DONG *et al.*, 1995; ADACHI *et al.*, 1996; GUO *et al.*, 1996; SHO *et al.*, 1998; TAKAOKA *et al.*, 1998; HUANG *et al.*, 1998; MAURER *et al.*, 1999; HOULE *et al.*, 2002; JACKSSON *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2000; WU *et al.*, 2004;). Diminuição ou ausência de Kai1 tem sido bem observada em algumas linhagens celulares de tumores metastáticos. E sua reintrodução nas células tumorais inibem migração e invasão *in vitro* bem como supressão de metástase em modelos animais (TATAOKA *et al.*, 1998; JACKSSON; KINGSLEY; RUSSELL, 2000; SHINOHARA *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2001; HEMLER *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2003; SRIDHAR; MIRANTI, 2006; JEE *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2008).

Alguns estudos mostram uma significativa relação entre expressão de CD82/Kai1 e E-caderina e invasão ou metástases em tumores malignos (JACKSSON *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2007). Protzel *et al.* (2008) ao avaliarem 30 casos de cancer de penis observou que todos os pacientes com expressão diminuída ou negativa de Kai1 / CD82 em lesões primárias tinham metástases em linfonodos ( $p = 0,0002$ ). Em pacientes com expressão positiva Kai1 / CD82 houve um melhor prognóstico significativo para a sobrevivência em comparação com os outros grupos ( $p = 0,0042$ ).

### 1.9. Twist1

O gene *TWIST1* é um fator transcricional pertencente à família hélice- $\alpha$ -hélice e é conhecido por promover a transição epitélio mesenquimal e regular negativamente a E-caderina. Por outro lado, sua baixa expressão leva a uma diminuição do potencial metastático e da invasão das células tumorais (KWOK *et al.*, 2005). As proteínas Twist exercem importantes funções regulatórias durante a embriogênese (ZHANG *et al.*, 2007).

A função de Twist1 em células humanas foi primeiramente identificada na síndrome de Saethre-Crotzan, uma condição autossômica dominante que é caracterizada pela presença de craniossinostose. Nesta condição, mutações no gene *TWIST1* são responsáveis pela inativação da proteína, de mesmo nome, nos osteoblastos, levando a uma ossificação prematura das fontanelas (GUENON *et al.*, 2006).

Yang *et al.* (2004) foram os primeiros a informar que Twist1 desempenha um papel essencial na metástase do câncer. Inicialmente foi encontrado reprimindo a expressão da molécula de adesão celular e supressor de tumor E-caderina. Posteriormente, descobriu-se que ele está envolvido no processo metastático através de uma gama diversificada de vias de sinalização. Twist é frequentemente denominado Twist1 por causa da presença de outra proteína bHLH, a Twist2, codificada pelo gene *TWIST2*, que tem funções diferentes *in vivo* (FRANCO *et al.*, 2011).

A proteína Twist1 modula muitos genes alvos através de elementos E-box responsivos (domínio ligante), apresenta elevada expressão em metástases e está relacionada a muitos tipos de tumores agressivos, tais como: câncer de mama (YANG *et al.*, 2004), carcinoma hepatocelular (LEE *et al.*, 2006), câncer de próstata (KWOK *et al.*, 2005, YUEN *et al.*, 2007), câncer gástrico (LUO *et al.*, 2008; FENG *et al.*, 2009), carcinoma de células escamosas esofágico (YUEN *et al.*, 2007; SASAKI *et al.*, 2009), carcinoma colorretal (OKADA *et al.*, 2010), carcinoma nasofaríngeo (SONG *et al.*, 2006), cânceres cerebrais (ELIAS *et al.*, 2005; MILLER *et al.*, 2006), câncer de cabeça e pescoço (OU *et al.*, 2008), câncer de tireóide (SALERNO *et al.*, 2011), tumor de células gigantes de osso (SINGH *et al.*, 2011) e tem uma fraca expressão em tumores pancreáticos (HOTZ *et al.*, 2007).

HUNG *et al.*, (2009) descreveu, a co-expressão de Twist1 com fator indutor de hipóxia 1 alfa (HIF-1- $\alpha$ ) e Snail (outro fator de transcrição do processo de Transição epitelio mesenquimal) como um importante preditor prognóstico em pacientes com câncer de pulmão de não-pequenas células.

## 2 JUSTIFICATIVA E APLICABILIDADE

Pelo fato de o câncer de pênis representar um grave problema de saúde pública em países em desenvolvimento (FAVORITO *et al.*, 2008) e seu tratamento, muitas vezes mutilante, causa efeitos devastadores nos pacientes. Nos estádios iniciais da doença o prognóstico é bom, obtendo-se cura na maioria dos casos. O fator prognóstico mais importante do câncer de pênis é o comprometimento linfonodal regional. Sobrevida de cinco anos em pacientes com infiltração linfática inguinal varia de 20 a 50%, porém 80% daqueles cuja linfadenectomia detecta moléstia mínima alcançam essa sobrevida. Pacientes com acometimento pélvico ou com metástases a distância raramente sobrevivem por cinco anos (NARDOZZA JÚNIOR; ZERATI FILHO; REIS, 2010).

Em últimas palavras, os dados obtidos pela realização deste trabalho poderão auxiliar em identificar através da identificação de possíveis novos marcadores moleculares quais pacientes apresentam doença mais agressiva e, deste modo, se possa justificar um tratamento também mais agressivo como por exemplo a realização de linfadenectomia inguinal mais precoce, e assim proporcionar a este paciente uma maior possibilidade de sobrevida.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Análise da expressão proteica do Twist1, Kail e E-caderina em tecidos de pênis com lesões benignas e malignas.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Evidenciar o padrão de imunorreatividade das proteínas Twist1, Kail e E-caderina em câncer de pênis e tecidos não neoplásicos;
- Correlacionar o padrão de imunorreatividade das proteínas Twist1, Kail e E-caderina quanto as características de progressão e invasão do câncer de pênis;
- Avaliar e correlacionar os resultados encontrados nestas análises com as demais características clínico-patológicas do tumor estudado.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Casuística

Este estudo consiste de dados retrospectivos, o qual se deteve em análise de laudos histopatológicos, prontuários médicos, revisão de lâminas e reação imunohistoquímica no material arquivado em bloco de parafina de 109 pacientes, sendo destes 74 portadores de câncer de pênis e que foram submetidos a tratamento cirúrgico, e 35 que foram submetidos a procedimento de postectomia e que no histopatológico não foi identificado lesão neoplásica (grupo controle). O período de realização de coleta de dados foi de Janeiro 2012 a Novembro 2014 no Hospital Ophir Loyola. Utilizando como base o prontuário e laudo histopatológicos dos pacientes, as seguintes variáveis foram avaliadas: história de tabagismo, etilismo, presença ou não de circuncisão e fimose, renda familiar, escolaridade, região e cidade de origem, tipo histológico, grau de diferenciação, margens cirúrgicas, estadiamento clínico-patológico, presença de invasão angiolímfática e perineural, presença de metástases e recidivas durante o intervalo de seguimento (APÊNDICE A).

Os pacientes foram previamente informados sobre este estudo, o qual foi realizado somente mediante o seu consentimento através de um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (APÊNDICE B).

### 4.2 Critérios de inclusão

- Tumores primários de câncer de pênis cujas amostras teciduais foram fixadas em formaldeído a 10% e emblocadas em parafina;
- Tecidos não tumorais (postectomia), cujas amostras teciduais foram fixadas em formaldeído a 10% e emblocadas em parafina;
- Pacientes que possuíam fichas clínicas e prontuários acessíveis e preenchidos;
- Pacientes que concordaram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

### 4.3 Critérios de exclusão

- Blocos de parafina que não continham fragmentos representativos da neoplasia;
- Pacientes que não concederam anuência para participação nesta pesquisa.

#### 4.4 Aspectos éticos

A pesquisa atende a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, que orienta sobre os princípios éticos a serem adotados na pesquisa com seres humanos, respeitando as normas éticas de preservação dos dados que garantam o anonimato dos sujeitos; a inexistência de prejuízo à saúde dos pacientes e de ônus financeiro aos pacientes ou familiares bem como o sigilo da identidade dos pacientes. O trabalho foi previamente analisado pelo comitê de ética do Hospital Ophir Loyola sob parecer de número: 948.189. Os resultados desta pesquisa serão tornados públicos, tão logo sejam consistentes, sendo estes favoráveis ou não. Os benefícios desta pesquisa foram o levantamento de informações para ampliar e melhorar os conhecimentos de marcadores biológicos e sua relação com a neoplasia de pênis.

A pesquisa apresentou riscos, mas estes foram minimizados visto que os pesquisadores e pesquisados utilizaram equipamentos de proteção individual e durante os procedimentos médicos necessários foram realizadas as técnicas assépticas preconizadas e necessárias. Os riscos de identificação do paciente também foram minimizados, pois houve total sigilo em relação aos nomes e qualquer outra forma de cadastro dos pacientes. A coleta dos dados dos prontuários e de entrevista com os pacientes foram realizados de forma a não interferir nas condutas médicas e a garantir o bem-estar do paciente e da equipe de saúde.

#### 4.5 Imunohistoquímica

As padronizações das reações bem como os testes foram realizadas no laboratório de imunohistoquímica do serviço de anatomia patológica do Hospital Ophir Loyola. As reações foram desenvolvidas em cortes histológicos de 3 $\mu$ m de espessura, estendidos em lâminas de vidro sinalizadas. Posteriormente, estes foram desparafinizados em dois banhos de xilol, o primeiro por 30 minutos em estufa a 60°C e o segundo por 20 minutos a temperatura ambiente. Em seguida os cortes foram reidratados em etanol em banhos descendentes (etanol

absoluto, etanol 95% e etanol 85%) por cinco minutos cada. Para remoção do pigmento formólico, os cortes foram imersos por dez minutos em solução de hidróxido de amônio a 10% mais etanol a 95%. Após lavagem em água destilada por 10 minutos, as lâminas receberam tratamento para recuperação antigênica. Para recuperação antigênica, as lâminas foram mergulhadas em solução de ácido cítrico (2,10g de ácido cítrico monohidratado, pH 6,0) e levadas por 15 minutos em micro-ondas na potência máxima. Posteriormente, os cortes foram lavados em água destilada por 10 minutos. Posteriormente, para a inibição da peroxidase endógena, os cortes passaram por dois banhos de 15 minutos em peróxido de hidrogênio 6% em metanol (1:1, v/v). Novamente, os cortes foram lavados em água destilada por 10 minutos e, posteriormente, imersos em três banhos de solução de Tris (6,05g de tris e 8,5g NaCl para 1 litro de água destilada) pH 7,4, por cinco minutos cada.

As lâminas, contendo os cortes foram submetidas à incubação, com os anticorpos primários diluídos em solução específica. Para a identificação da proteína Twist foi utilizado o anticorpo anti-Twist monoclonal Twist 2C1a – ABCAM (ab 50887) diluição 1:50. Para a proteína Kai1, o anticorpo monoclonal anti-Kai-1/CD82-ABCAM (ab 59509) diluição 1:200 e para a E-caderina, o anticorpo monoclonal anti-E-caderina-Ventana (ROCHE) o qual foi utilizado em preparação padronizada pelo fabricante. Todos os espécimes foram incubados com o anticorpo primário de acordo com protocolo preconizado pelo fabricante e padronizado no laboratório. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada e em solução tampão de TRIS pH 7,4. O kit LSAB peroxidase K0690 (Dako Corporation) foi utilizado como soro secundário e complexo terciário por 30 minutos cada. Posteriormente as lâminas foram lavadas em TRIS pH 7,4 dois banhos de cinco minutos. A revelação da reação foi feita através da imersão das lâminas em solução do cromógeno diaminobenzidina – DAB (DAB, 3,3 – diaminobenzidina, Sigma Chemical CO. St Louis, MO/USA) por dez minutos. Os cortes foram, então, lavados em água destilada e contra corados com hematoxilina de Mayer por dez minutos. Em seguida, os cortes foram lavados novamente em água destilada por 10 minutos. As lâminas sofreram, finalmente, as etapas de desidratação em cadeia ascendente de etanóis e diafanização em dois banhos de xilol e serão montadas em Permount (Fisher Scientific, Fair Law, NJ/USA) para exame ao microscópio de luz.

## Análise da Imunomarcção

A reação foi considerada positiva quando houve a presença da coloração castanha, condição caracterizadora da presença do cromógeno DAB, na reação imunohistoquímica, e negativa para as células que não apresentaram marcação castanha.

As lâminas foram observadas em microscópio de luz, modelo Nikon H550S, sob um foco fixo e com clareza de campo. O sistema de contagem usado, nesse estudo, para a E-caderina foi semelhante ao utilizado por Afrem *et al.* (2014): onde a marcação maior ou igual a 75% das células foi considerado positiva e menor que este valor como perda de expressão. Para o Twist1 o sistema de análise foi similar ao utilizado por Zhuo *et al.* (2014), no qual as marcações maiores que 5% e pelo menos de fraca intensidade foi considerado como positivo, ou seja, expressão aberrante ou inadequada. O Kai1 foi analisado utilizando-se o parâmetro de que todas as lâminas que apresentaram marcação acima de 5% foram consideradas como expressão adequada enquanto as demais foram consideradas como ausência de expressão ou expressão inadequada, método semelhante ao utilizado por Zheng *et al.* (2007). As lâminas foram analisadas por dois patologistas independentes, os quais não tinham conhecimentos dos dados clínicos dos pacientes de forma a evitar vieses e um consenso foi obtido para cada lâmina investigada.

### 4.6 Análise Estatística

Foram utilizados os programas Microsoft Office Word® 2010 para elaboração da parte textual do projeto e do Microsoft Office Excel® 2010 para elaboração dos dados em planilhas eletrônicas. Foram utilizados testes estatísticos de Qui-quadrado para a avaliação de frequências entre os grupos investigados, análise por teste de McNemar para avaliação conjunta da expressão entre as diferentes proteínas e a análise de Regressão logística para inferências entre aspectos clínicos e expressão proteica. O nível de significância adotado foi  $\alpha \leq 5\%$ . Para a análise estatística foi utilizado o programa Bioestat 5.3 (AYRES *et al.*, 2007).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O câncer de pênis é uma neoplasia mutilante de grande impacto físico e psicológico para os indivíduos afetados. É um tumor incomum em nações desenvolvidas, mas com incidência altamente significativa em países em desenvolvimento e subdesenvolvidos, sendo diretamente relacionada com condições socioeconômicas locais. No Brasil é considerado um importante problema de saúde por figurar entre as mais altas incidências desta neoplasia no mundo, sendo o Estado do Pará, norte do Brasil, uma das regiões que apresenta maior prevalência da doença (FAVORITO *et al.*, 2008; SALVIONI *et al.*, 2009; FONSECA *et al.*, 2010; SOUZA, 2011).

A alta incidência de câncer de pênis, somada ao seu curso clínico frequentemente desfavorável, motivam pesquisas relacionadas à sua patogênese. A heterogeneidade de eventos celulares e moleculares constitui um grande desafio ao estabelecimento de terapias efetivas. Desta maneira, uma associação mais precisa entre dados clínicos, celulares e moleculares pode levar a uma maior compreensão sobre o surgimento e progressão desta neoplasia.

Nas amostras estudadas, a idade média foi de 59 anos (Tabela 2), apresentavam principalmente baixa renda mensal (83% tinham renda de até 1 salário mínimo), e baixo grau de instrução (76% tinham como formação até o nível fundamental), semelhante aos dados de outros estudos nacionais (FONSECA, 2010; COUTO *et al.*, 2014) e internacionais (HEGARTY *et al.*, 2006; HERNANDEZ *et al.*, 2008; FERRÁNDIZ-PULIDO *et al.*, 2012).

**Tabela 2**-Faixa etária dos pacientes com câncer de pênis que constituem a casuística da pesquisa:

| Idade        | n    |       |
|--------------|------|-------|
| Média        | 61,9 |       |
| Faixa etária | n    | %     |
| 20-30        | 1    | 1,35  |
| 31-40        | 8    | 10,8  |
| 41-50        | 10   | 13,51 |
| 51-60        | 15   | 20,28 |
| 61-70        | 13   | 17,58 |
| 71-80        | 16   | 21,63 |
| 80-89        | 6    | 8,1   |
| ≥90          | 5    | 6,75  |
| Total        | 74   | 100   |

Como abordado previamente, a transição epitélio mesenquimal caracteriza-se como um importante processo fisiológico que ocorre durante a embriogênese, como também causa fibrose, participando da cicatrização de feridas (KALLURI e NEILSON, 2003). Ademais, estudos recentes sugerem que ela é capaz de promover a progressão para carcinoma através de uma variedade de programas genéticos relevantes, que permite a uma célula epitelial polarizada sofrer várias alterações bioquímicas, moleculares e morfológicas que lhe conferem a perda de adesão célula-célula e célula-matriz extracelular, assumindo um fenótipo de células mesenquimais, migrando para outros sítios, se infiltrando nos tecidos e promovendo metástases distantes (KALLURI e NEILSON, 2003; KALLURI e WEINBERG, 2009).

A expressão da E-caderina é necessária para a manutenção da polaridade da célula epitelial e integridade da arquitetura tecidual. Contudo, uma observação cada vez mais evidente é a de que a expressão reduzida de proteínas envolvidas na adesão e comunicação célula-célula, como a E-caderina, provavelmente está relacionada à promoção do processo de invasão e adesão do tumor metastático (COWIN *et al.*, 2005). Além disso, alterações no

sistema caderina-catenina também podem estar envolvidas na tumorigênese. E-caderina e beta-catenina, componentes da via de transdução de sinal de Wnt, podem servir como um interruptor comum nos processos centrais que regulam a diferenciação celular e crescimento. Assim, a interrupção da ação da E-caderina ou diminuição da sua expressão, é indispensável durante os eventos da transição epitélio mesenquimal em que as células epiteliais são convertidas em células mesenquimais (CHETTY *et al.*, 2008; VESUNA *et al.*, 2008).

Tais alterações também podem ser observadas através de análises histopatológicas e imunohistoquímicas. Em nossa série, ao avaliar a expressão da E-caderina, foi demonstrado que o percentual de células com a expressão normal foi maior no tecido sadio (97,1%) quando comparado com o tumor (51,4%). Assim, quando avaliada a expressão defeituosa, ou seja, a perda de expressão da proteína, observou-se associação estatisticamente significativa ( $p=0,000$ ) com as amostras tumorais (se apresentando em 48,6% dos tumores) quando comparados com os sadios (2,9%), observando uma razão de chances (odds ratio) de 32, isto é, esta alteração de expressão proteica está 32 vezes mais relacionada com as células neoplásicas do que com as não- neoplásicas (Tabela 3). Este achado corrobora com dados da literatura mundial nos quais a perda de expressão de E-caderina foi associada a vários outros carcinomas como de cabeça e pescoço, mama, pulmão e próstata (NATSUGOE *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2009; LIN *et al.*, 2010).

**Tabela 3:** Expressão de E-caderina em tecidos neoplásicos e não neoplásicos.

| Neoplasias          | Expressão E-caderina |                |       |
|---------------------|----------------------|----------------|-------|
|                     | Normal (N)           | Defeituosa (N) | Total |
| Câncer <sup>1</sup> | 51,4% (38)           | 48,6% (36)     | 74    |
| Normal              | 97,1% (34)           | 2,9% (1)       | 35    |
| Total               | 66,1% (72)           | 33,9% (37)     | 109   |

<sup>1</sup>( $p=0,000$ ; OR=32,211, IC95% = 4,188-247,757)

Masferrer e colaboradores (2015) avaliaram também por imunohistoquímica a expressão da E-caderina, vimentina e fatores de transcrição relacionados com a transição epitélio mesenquimal, como Twist1, Zeb1 e Snail em amostras de carcinoma de pênis e observaram a perda da expressão de E-caderina na membrana das células em 71,8% dos

casos (46/64). Embora essa perda não tenha sido associada com mau prognóstico, a sua expressão nuclear (26%) foi significativamente associada com maior mortalidade. Dos pacientes que manifestaram E-caderina nuclear, 41,6% morreram da doença em comparação com 15,3% nos outros grupos ( $p < 0,05$ ). Além disso, a análise de sobrevivência de Kaplan-Meier mostrou que os cânceres de pênis com E-caderina nuclear foram associados a um pior prognóstico. No entanto, não foi encontrada associação entre a E-caderina, vimentina, Zeb1 ou Twist e estágio do tumor ou o padrão de diferenciação.

A perda da expressão de E-caderina já foi relatada em outros tipos tumorais como cânceres de esôfago, carcinomas ductais invasivos de mama, adenomas de cólon, câncer de boca e câncer de tireóide, onde foi observada sua associação com estadiamento tumoral mais avançado, crescimento com padrão infiltrativo e maior risco de metástase linfonodal (GOULD ROTHBERG e BRACKEN, 2006; NATSUGOE *et al.*, 2007; KROEPIL *et al.*, 2012; SRIDEV *et al.*, 2015; CHENGY *et al.*, 2015). Por esses e outros inúmeros achados na literatura mundial, sugere-se que a expressão defeituosa de E-caderina (diminuição significativa ou perda) seja um dos primeiros passos que justificam o processo de transição epitélio mesenquimal contribuindo para a progressão de diversos tumores, incluindo tumores penianos.

Outro aspecto importante na predição de metástases no câncer de pênis é a invasão vascular e linfática. Primeiramente essa associação prognóstica foi demonstrada por Lopes *et al.* (1996) e posteriormente confirmada por vários autores como fator de risco independente para metástase linfonodal (FICARRA *et al.*, 2002; LOPES *et al.*, 2002; CAMPOS *et al.*, 2006; SOUZA, 2011). Alguns marcadores podem associar-se de forma significativa a esta característica como a E-caderina. No presente estudo não se pode ser estimada pela análise multivariada, como um fator risco para invasão angiolímfática.

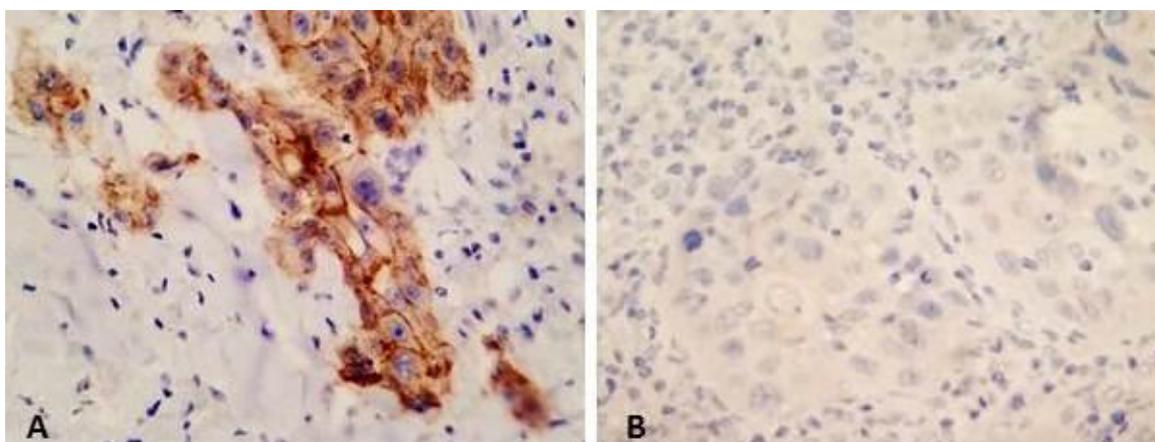
Contudo, a expressão defeituosa de E-caderina, pode ser a explicação de como essas células podem conferir um fenótipo celular "dominante", que se desprendem mais facilmente umas das outras, aumentando a motilidade, facilitando e viabilizando a invasão e progressão do tumor. Nossa pesquisa demonstrou que a expressão defeituosa da proteína (Figura 7) esteve mais frequente na invasão perineural (48% expressão diminuída X 31% expressão normal) e metástase nodal (32,4% expressão diminuída e 16,4% expressão normal) quando comparados com tecido normal (Tabela 4). Estes achados também estão de acordo com os dados fornecidos por Guimarães *et al.* (2006), onde se observaram que pacientes que apresentavam perda de expressão intensa de E-caderina no tumor, mostravam-se mais

propensos ao padrão de crescimento infiltrativo e apresentavam risco de comprometimento linfonodal.

**Tabela 4:** Expressão de E-caderina de acordo com as características patológicas dos pacientes investigados.

| Características patológicas     | Expressão E-caderina |               |         |
|---------------------------------|----------------------|---------------|---------|
|                                 | Normal (N)           | Diminuída (N) | N total |
| Invasão perineural              | 31% (9)              | 48% (12)      | 21      |
| Linfadenectomia                 | 23,7% (9)            | 41,7% (15)    | 24      |
| Metástase Nodal                 | 16,2% (6)            | 32,4% (11)    | 17      |
| Invasão Angiolinfática          | 15,8% (6)            | 17,1% (6)     | 12      |
| Nível de diferenciação-GII-GIII | 50% (19)             | 54,3% (19)    | 38      |
| T2-T4                           | 27,8% (10)           | 14,7% (5)     | 15      |
| N1-N3                           | 16,7% (6)            | 23,5% (8)     | 14      |

\*% valores percentuais referentes a proporção de casos (sendo normal ou diminuída, conforme a coluna) dentro de cada característica patológica (com e sem características patológicas, onde o percentual do grupo sem a característica patológica está omitido).



**Figura 7:** Seções histológicas de carcinoma epidérmico de pênis. (A) Imunomarcção normal da proteína E- caderina. (B) Marcação reduzida/ ausente em mais de 50% das células.

Os dados desta análise também são corroborados por outro estudo realizado com 125 amostras de câncer de pênis, o qual relatou que a baixa expressão da E-caderina foi significativamente correlacionada com metástases linfonodais, dos quais 59,5% dos pacientes com baixa expressão abrigavam metástases, contra 38,3% com alta expressão ( $p=0,032$ ). Entretanto, a análise multivariada mostrou que houve uma tendência para uma relação entre a expressão da E-caderina e metástase ( $p=0,089$ ), não confirmando a E-

caderina como um preditor independente de envolvimento linfonodal (CAMPOS *et al.*, 2006; SOUZA, 2011).

Resultados semelhantes foram obtidos por ZHU *et al.* (2007), avaliando amostras de carcinoma de pênis, nos quais metástases linfáticas foram significativamente correlacionadas com a baixa expressão de E-caderina e com o estágio do tumor, grau histológico e embolização vascular.

Outro grupo de pesquisadores avaliou também por imunomarcção a expressão de E-caderina, correlacionando com N-caderina,  $\beta$ -catenina, e vimentina. Com base na decisão por consenso de ambos os avaliadores, a diminuição da expressão da E-caderina foi verificada em 60% dos pacientes (36/60), no entanto, não houve expressão ectópica de E-caderina.

Dentre os 36 casos, uma perda concomitante de expressão membranosa  $\beta$ -catenina ocorreu em 29 indivíduos (80,6%), e apenas 3 dos 36 pacientes do estudo (8,3%) mostrou expressão para vimentina. Assim sendo, os pesquisadores puderam observar que a interrupção de expressão da E-caderina mostrou uma correlação positiva significativa com a perda de expressão membranosa de  $\beta$ -catenina ( $p < 0,001$ ) e com invasão linfovascular ( $p = 0,026$ ) (MAY *et al.*, 2015).

É importante salientar que muitos pacientes com câncer de pênis têm diagnóstico tardio, sendo portanto, o diagnóstico precoce, essencial para melhorar o prognóstico do indivíduo acometido por esta neoplasia. A exemplo, a taxa de sobrevivência de cinco anos varia de 0% a 66%, dependendo do grau de disseminação metastática linfonodo regional e distante (SPIESS *et al.*, 2013).

O estadiamento clínico completo requer uma avaliação metastática minuciosa. Dentre os fatores prognósticos comprovados do câncer de pênis estão o estadio, o tipo e grau histológico, o nível de invasão, a embolização vascular e linfática, a invasão perineural, e principalmente a presença e extensão de metástases regionais linfonodos inguinais, sendo estes, importantes fatores prognósticos específicos de sobrevivência de câncer (GUIMARÃES *et al.* 2006; PETTAWAY *et al.*, 2007; PIZZOCARO *et al.*, 2010).

De acordo com o trabalho de Souza *et al.* (2011) o grau de diferenciação celular do tumor em sua porção central e superficial apresentou tendência de associação com o nível de expressão da E-caderina: apresentando perda intensa de 12,5% no bem diferenciado, 21% no moderadamente diferenciado e 37,5% no pouco diferenciado. No fronte de invasão houve

um resultado com significado estatístico na comparação da expressão da E-caderina ao grau de diferenciação, sendo esta perda tanto maior quanto pior o grau de diferenciação do tumor.

Em relação ao estadió T do tumor, não houve associação com o padrão de expressão de E-caderina, seja na porção central e superficial do tumor ou no fronte de invasão. A frequência de metástases linfonodal, no fronte de invasão, apresentou associação com a expressão da E-caderina que foi de 49% de perda intensa nos sem metástase e de 80% nos com metástase. Na pesquisa realizada por Campos *et al.* (2006) foi observado uma relação da baixa expressão da E-caderina com a presença de metástases e a invasão perineural também esteve associada à expressão da E-caderina. Nos tumores sem invasão perineural foi observada maior expressão normal de E-caderina, no entanto a invasão vascular não apresentou esta relação.

Masferrer e colaboradores (2015) detectaram em 43,5% dos casos que havendo, simultaneamente, baixa expressão de E-caderina e expressão aumentada de vimentina havia pior prognóstico dos casos de câncer de pênis. Por outro lado, Foda *et al.* (2015) não conseguiram estabelecer uma relação entre a expressão da E-caderina com fatores prognósticos no adenocarcinoma mucinoso colorretal.

Nossos resultados não evidenciaram relação com um destes fatores patológicos supracitados, porém demonstrou que a alteração de expressão da E-caderina esteve significativamente mais diminuída nos tecidos com câncer de pênis do que nos tecidos não neoplásicos.

Outra proteína estudada neste trabalho foi a Twist1, que desempenha um papel essencial na metástase do câncer. Inicialmente foi encontrado reprimindo a expressão da molécula de adesão celular e supressor de tumor E-caderina. Posteriormente, descobriu-se que ele está envolvido no processo metastático através de uma gama diversificada de vias de sinalização. (YANG *et al.*, 2004)

Em relação a análise da proteína Twist1, observamos que também não houve uma associação significativa estatisticamente entre a expressão aumentada desta com fatores clinico-patológicos de pior prognóstico (tabela 5).

**Tabela 5-** Tipo de expressão de Twist1 conforme características patológicas:

|  | Twist1     |               | Total(N) |
|--|------------|---------------|----------|
|  | Normal (N) | Aumentada (N) |          |
| <b>Invasão perineural</b>              | 15,8% (6)  | 36,4% (8)     | 14       |
| <b>Linfadenectomia</b>                 | 26,3% (10) | 45,5% (10)    | 20       |
| <b>Metástase Nodal</b>                 | 24,3% (9)  | 31,8% (7)     | 16       |
| <b>Invasão Angiolinfática</b>          | 10,5% (4)  | 13,6% (3)     | 7        |
| <b>Nível de diferenciação-GII-GIII</b> | 48,6% (18) | 72,7% (16)    | 34       |
| <b>T2-T4</b>                           | 19,4% (7)  | 23,8% (5)     | 12       |
| <b>N1-N3</b>                           | 11,1% (4)  | 33,3% (7)     | 11       |

Fonte: protocolo de pesquisa

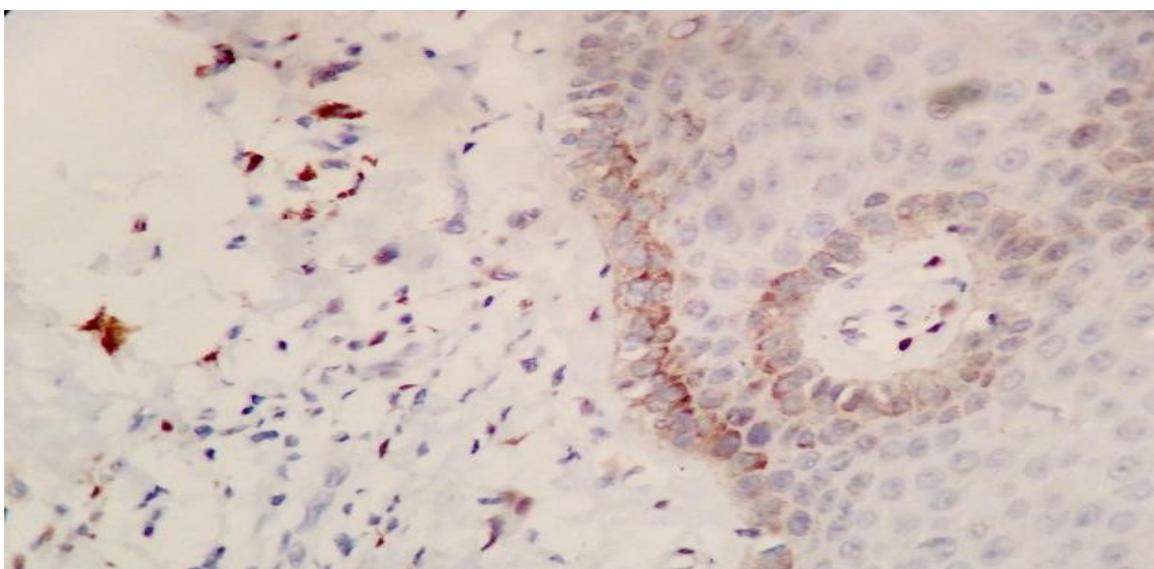
\*% valores percentuais referentes a proporção de casos (sendo normal ou aumentada, conforme a coluna) dentro de cada característica patológica (com e sem características patológicas, onde o percentual do grupo sem a característica patológica está omitido).

De acordo com Silva *et al.* (2012) em uma análise de tecido epitelial oral normal, leucoplasia oral e carcinoma escamoso oral houve alta expressão de Twist1 em tumores pouco diferenciados. Zeng *et al.* (2015) também evidenciou que a expressão de Twist esteve associado com pior sobrevida. Zhang *et al.* (2007) avaliaram a relação dos níveis de expressão de Twist1 em tecidos não tumorais de bexiga comparando-os com tecidos de tumor vesical e encontrou que nos tecidos tumorais havia um maior nível de expressão desta proteína, bem como havia maior expressão principalmente nos casos de pior prognóstico. Adicionalmente, no tumor de bexiga, Zhang *et al.* (2007), não observaram a imunomarcagem em tecidos não malignos, em contraste com os tecidos tumorais, onde ainda esta marcação era mais forte de acordo com o grau e também nos tumores em que apresentavam metástase linfonodal, além disso esta imunomarcagem esteve associada com a perda de expressão da e-caderina.

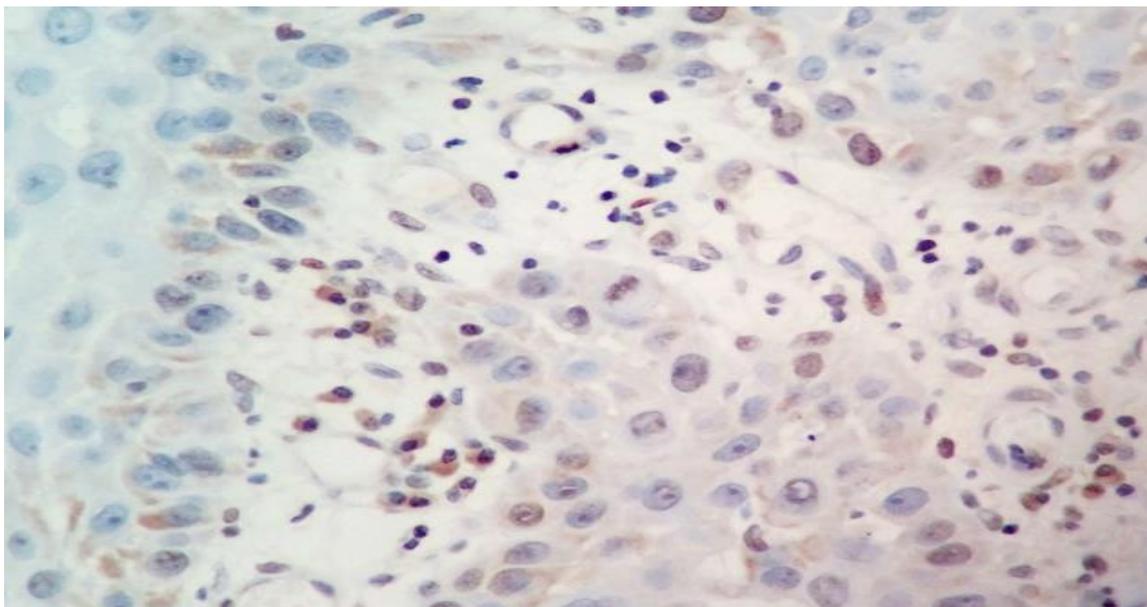
Zhuo *et al.* (2014) em carcinoma nasofaringe observaram que 70,8% dos casos de câncer apresentaram imunomarcagem (nuclear e citoplasmática) enquanto que esta foi evidenciada em apenas 15% dos tecidos não neoplásicos. Silva *et al.* (2012), em espécimes de epitélio normal e tecidos displásicos de tecido da cavidade oral encontraram imunomarcagem de Twist1 também somente nas camadas basal e parabasal do epitélio, sendo esta citoplasmática. Nos espécimes de carcinoma escamoso houve uma distribuição difusa

nas ilhas neoplásicas exibindo expressão elevada em tumores pobremente diferenciados. A expressão nuclear foi observada em poucos casos.

Em nossa pesquisa, a imunomarcção do Twist1 no tumor ocorreu predominantemente nuclear, com eventuais granulações citoplasmáticas, em todas as camadas de células. Houve também marcação em tecidos não tumorais sendo que foi observada no citoplasma e de forma granular, atingindo somente a camada basal (Figura 8 e 9).



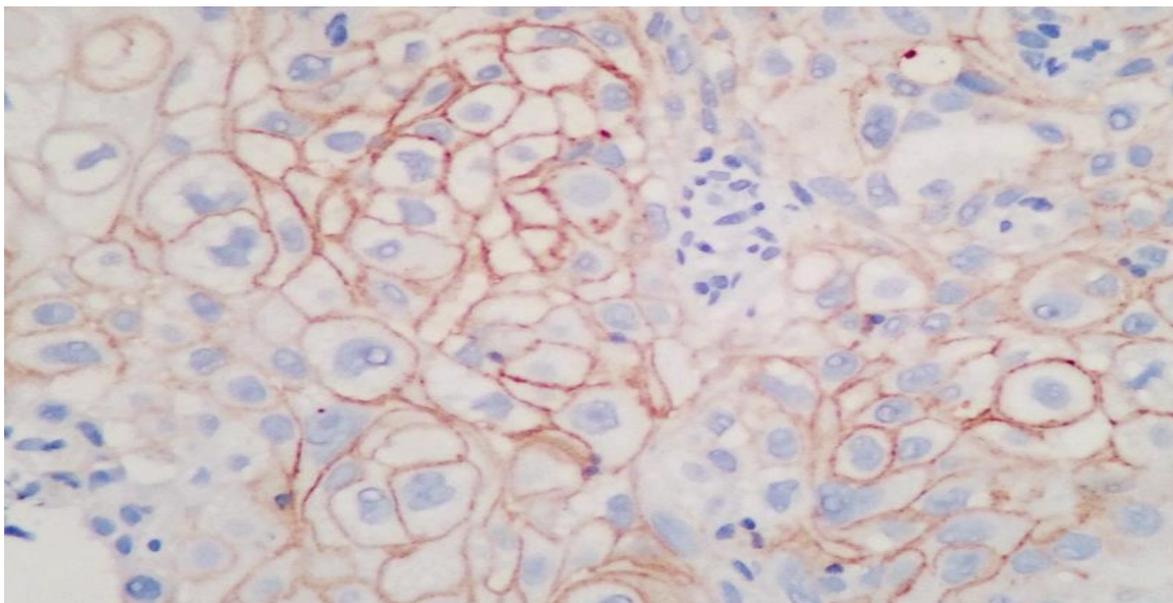
**Figura 8:** Expressão de Twist1 em tecido não-tumoral, com localização citoplasmática e somente na camada basal.



**Figura 9:** Expressão de Twist1 em carcinoma de pênis tecido tumoral, com localização nuclear.

Lei *et al* (2015), em avaliação de pacientes em diferentes fases de osteossarcoma, foram analisados 32 casos de tumores e 10 casos de osteocondroma, um tumor benigno do osso, encontraram marcação do Twist1 no núcleo e citoplasma, sendo esta positiva em 18 dos 32 casos de osteossarcoma e apenas em 1 de 10 osteocondroma. A taxa de marcação do Twist1 foi significativamente maior no tumor maligno do que no benigno, bem como também foi maior quanto mais avançada era a fase do câncer.

Em nossa pesquisa a expressão do Kai1 foi observada na membrana citoplasmática e também citoplasmática (Figura 10).



**Figura 10:** Imunomarcção KAI1, de localizado na membrana citoplasmática.  
Fonte: Arquivo pessoal

Quanto à expressão de Kail, Protzel *et al.*(2008) avaliando 30 casos de câncer de pênis, encontraram associação da marcação com o grau de diferenciação e com a metástase nodal, porém não houve esta associação com o estágio T do tumor. A marcação ocorreu predominantemente na membrana plasmática e citoplasma, semelhante ao nosso trabalho. Entretanto, em nossa casuística não se pôde obter resultados que comprovassem estatisticamente uma relação de expressão defeituosa do Kail com os fatores patológicos (Tabela 6).

**Tabela 6:** Expressão de Kail conforme características patológicas das amostras

| Características patológicas     | Expressão KAI1   |                  | N total |
|---------------------------------|------------------|------------------|---------|
|                                 | Com marcação (N) | Sem marcação (N) |         |
| Invasão perineural              | 23,1%(6)         | 23,5%(8)         | 14      |
| Linfadenectomia                 | 40,7%(11)        | 27,3%(9)         | 20      |
| Metástase Nodal                 | 32%(8)           | 23,5%(8)         | 16      |
| Invasão Angiolinfática          | 11,5%(3)         | 11,8%(4)         | 7       |
| Nível de diferenciação-GII-GIII | 61,5%(16)        | 54,5%(18)        | 34      |
| T2-T4                           | 17,4%(4)         | 23,5%(8)         | 12      |
| N1-N3                           | 30,4%(7)         | 11,8%(4)         | 11      |

\*% valores percentuais referentes a proporção de casos (sendo normal ou diminuída, conforme a coluna) dentro de cada característica patológica (com e sem características patológicas, onde o percentual do grupo sem a característica patológica está omitido).

Zheng *et al.* (2007) observaram relação entre a expressão de Kai1 e a presença de metástase hepática em adenocarcinoma gastrointestinal, sendo esta diminuída nos pacientes que apresentaram metástase. Houve marcação nos tecidos normais adjacentes ao tumor, altamente expresso no tecido tumoral, porém pouco ou nenhuma expressão em tumores com metástase hepática. Esta marcação também ocorreu predominantemente na membrana e no citoplasmática, o mesmo padrão de marcação encontrado em nossa pesquisa. Pôde-se observar que em 66% dos pacientes sem marcação do Kai1 em nossa pesquisa apresentavam metástase nodal, embora não tenha sido uma associação estatisticamente significativa, o que corroboraria com alguns trabalhos já descritos.

Em câncer de laringe, Yu *et al.* (2015) também observaram o mesmo padrão de marcação. Onde a expressão de Kai1 foi de 41% nos tecidos tumorais e 96% nos tecidos normais, com este resultado sendo estatisticamente significativo. Houve resultado com significado estatístico também a relação negativa da marcação desta proteína em pacientes que consumiam álcool, grau de diferenciação histológica, estagio TNM e metástase linfonodal.

Em outros tumores como o de câncer pulmonar do tipo não pequenas células, Shiw *et al.* (2012) também encontraram uma relação da baixa expressão de E-caderina associada a baixa expressão do Kai1, relacionada ainda a fatores de pior prognóstico tais como grau de diferenciação, presença de metástases, estadio e sobrevida. Em nossa casuística observou-se que, apesar de não ser um resultado estatisticamente significativo ( $p=0,00547$ ), também ocorreu uma potencial associação (resultado inconclusivo) entre uma expressão diminuída de E-caderina com a redução de imunomarcação do KAI1 nas amostras.

Liu *et al.* (2015) também relacionaram a expressão de E-caderina e Twist1, bem como outros marcadores, com alguns fatores de pior prognóstico no câncer de bexiga não invasivo. Em nosso trabalho encontrou-se uma relação com significado estatístico da associação da perda da expressão de E-caderina com marcação por imunohistoquímica aumentada do Twist1.

Com estes dados, pode-se atestar a relação destas três proteínas na origem ou na progressão deste tipo tumoral, que carece de maiores estudos, visto que é um câncer com relativamente pouca informação já descrita, seja em caráter celular ou molecular. Talvez pelo fato de ser um tipo de neoplasia mais raramente encontrada, principalmente em países com maior desenvolvimento sócio-econômico.

## 6 CONCLUSÕES

Aproximadamente 49% dos pacientes que apresentavam carcinoma escamoso de pênis tinham expressão diminuída da E-caderina, resultado que apresentou significância estatística. Logo a redução da expressão desta proteína é uma característica peculiar ao tumor investigado.

Não houve associação da expressão diminuída da E-caderina com outras características patológicas, bem como do Twist1 e do Kai1.

Foi observada uma associação entre o aumento da expressão de Twist1 e a redução da expressão de E-caderina nas amostras investigadas, logo, evidencia-se o suposto papel biológico de Twist1 sobre a E-caderina em câncer de pênis.

Atestou-se um resultado inconclusivo entre as proteínas E-caderina e Kai1, embora tenha-se observado a hipoeexpressão concomitante entre as duas. Logo, esta relação requer maiores investigações.

Não observamos relação, estatisticamente significativa, entre a modificação de expressão das proteínas Twist1 e Kai1, embora ambas tenham demonstrado relação com a expressão da E-caderina. Deste modo, a regulação da expressão de ambas, deve se dar por vias/modos independentes.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACTIVE MEDICAL. Site: [http://www.maximum-.com/pages.html?pages\\_id=3&title=Penis](http://www.maximum-.com/pages.html?pages_id=3&title=Penis). Acessado em 21.07.2015
- ACKLAND, M.L. et al. Epidermal growth factor stimulates epithelio-mesenchymal transition in the stable human breast carcinoma cell line variant PMC42-LA. *Lab Invest*, v. 83, p. 435-48, 2003.
- ACLOQUE, H. et al. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J. Clin Invest*, v. 119, p. 1438-49, 2009.
- ADACHI, M. et al. Correlation of KAI1/CD82 gene expression with good prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, v. 56, p. 1751-5, 1996.
- AFREM, M. C. et al. The immunohistochemical investigations of cadherin “switch” during epithelial-mesenchymal transition of tongue squamous cell carcinoma. *Rom J Morphol Embryol* 2014, 55 (3suppl); 1049-1058
- AGRAWAL, A. et al. The histological extent of the local spread of carcinoma of the pênis and its therapeutic implications. *BJU Int*, v. 85, p. 299-301, 2000.
- ALBERTS, B. et al. Estrutura da membrana: organização interna da célula. In: \_\_\_\_\_. *Biologia molecular da célula*. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, p. 583-614.
- AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Circumcision policy statement. *Pediatrics*, v. 130, n. 3, p. 585-6, 2012.
- AYRES, M. et al. A. A. S. BioEstat 5.3: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, MCT-CNPq, 2007, p. 364.
- AZRIF, M. et al. External-beam radiotherapy in T1-2 N0 penile carcinoma. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, v. 18, p. 320-5, 2006.
- BARROS E.M, MELO M.C.B. Câncer de pênis: perfil sócio-demográfico e respostas emocionais à penectomia em pacientes atendidos no Serviço de Psicologia do Hospital do Câncer de Pernambuco. *Rev SBPH*, v. 12, p. 53-68, 2009.
- BATISTA, L.L. et al. Estudo das linfadenectomias inguinais realizadas em pacientes portadores de câncer de pênis em hospital de referência na Amazônia. *Revista Paraense de Medicina*, v. 28, n. 3, p. 33-41, 2014.
- BATLLE, E. et al. The transcription factor snail is a repressor of Ecadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol*, v. 2, p. 84-9, 2000.
- BAUM B, SETTLEMAN J, QUINLAN MP. Transitions between epithelial and mesenchymal states in development and disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 19, p. 294-308, 2008.

BERDITCHEVSKI, F.; ODINTSOVA, E. Tetraspanins as regulators of protein trafficking. *Traffic*, v. 8, p. 89-96, 2007.

BLEEKER, M.C. et al. Penile cancer: epidemiology, pathogenesis and prevention. *World J Urol.*, v. 27, p. 141-50, 2009.

BRACKE, M.; VAN ROY, F.; MAREEL, M. The E-cadherin/catenin complex in invasion and metastases. *Curr Top Microbiol Immunol*, v. 213, n. Pt1, p. 123-61, 1996.

BRUMINI, R. Câncer no Brasil: dados histopatológicos 1976-80. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 1982.

CAMPOS, R.S. et al. E-cadherin, MMP -2, a MMP-9 as prognostic markers in penile cancer: analysis of 125 patients. *Urology* 2006; 67(4):797-802.

CAMPOS, R.S. et al. Ecadherin, MMP-2, and MMP-9 as prognostic markers in penile cancer: analysis of 125 patients. *Urology*, v. 67, p. 797-802, 2006.

CHARRIN, S. et al. Multiple levels of interactions within the tetraspanin web. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 304, p. 107-12, 2003.

CHAUX, A. et al. Warty Basalóide Carcinoma: Clinicopathological Features of a Distinctive Penile Neoplas. Report of 45 Cases. *Modern Pathology*, v.23, p. 896-904, 2010.

CHENG, Y. et al. Expression of EpCAM and E-cadherin in papillary thyroid carcinoma and its clinicopathologic significance. *Zhonghua Bingli Xue Za Zhi*.2015 mar;44(3);189-94.

CHETTY, R.; SERRA ,S.; ASA, S.L. Loss of membrane localization and aberrant nuclear E-cadherin expression correlates with invasion in pancreatic endocrine tumors. *Am J Surg Pathol*. 2008 Mar;32(3):413-9.

COUTO, T.C. . et al. Epidemiological study of penile cancer in Pernambuco: experience of two reference centers. *Int Braz J Urol*. 2014; 40: 738-44.

COWIN, P.; ROWLANDS, T.M.; HATSELL, S.J. Cadherins and catenins in breast cancer. *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17(5): 499-508.

CRISPEN, PL; MYDLO, JH. Penile Intraepithelial Neoplasia and Others Premalignant Lesions of the Penis. *Urol Clin North Am*, v. 37, p. 335-42, 2010.

CUBILLA, A.L. et al. Histologic classification of penile carcinoma and its relation to outcome in 61 patients with primary resection. *Int J Surg Pathol*, v. 9, p. 111-20, 2001.

CUBILLA, A.L. The role of pathologic prognostic factors in squamous cell carcinoma of the penis. *World J Urol*, v. 27, p. 169-77, 2009.

DALING, J.R. et al. Penile cancer: importance of circumcision, human papillomavirus and smoking in situ and invasive disease. *Int J Cancer*, v. 116, p. 606-16, 2005.

DERYCKE, L.D.; BRACKE, M.E. N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. *Int J Dev Biol*, v. 48, p. 463-76, 2004.

DILLNER, J. et al. Etiology of squamous cell carcinoma of the penis. *Scand J Urol Nephrol Suppl*, v. 205, p. 189-93, 2000.

DONG, J.T. et al. Prostate cancer-biology of metastasis and its clinical complications. *World J Urol*, v. 14, p. 182-9, 1996.

DONG, J.T., et al. KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. *Science*, v. 268, p. 846-84, 1995.

EBLE, J.N. et al. Pathology & genetics tumours of the urinary system and male genital organs. Lyon: IARC Press; 2004. Penile cancer, p. 279-98. (IARC WHO Classification of Tumours, n° 6).

EDGE, S.B.; AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER. AJCC cancer staging manual. 7<sup>th</sup> ed. New York: Springer, 2010. 648 p.

ELIAS, M.C. et al. TWIST is expressed in human gliomas and promotes invasion. *Neoplasia*, v. 7, p. 824-37, 2005.

ESPENEL, C. et al. Single-molecule analysis of CD9 dynamics and partitioning reveals multiple modes of interaction in the tetraspanin web. *J Cell Biol*, v. 182, p. 765-76, 2008.

FAVORITO, L.A. et al. Epidemiologic study on penile cancer in Brazil. *International Braz J urol: official journal of the Brazilian Society of Urology*, v. 34, n.5, p. 587-91, 2008.

FAVORITO, L.A. et al. Epidemiologic study on penile cancer in Brazil. *International braz j urol: official journal of the Brazilian Society of Urology*.2008;34(5):587 ---91;

FERRÁNDIZ-PULIDO, C.; DE TORRES, I.; GARCÍA-PATOS, V. Penile squamous cell carcinoma. *Actas Dermosifiliogr*. 2012;103:478-87.

FICARRA V. et al. Predictive pathological factors of lymph node involvement in the squamous cell carcinoma of the penis. *Int Urol Nephrol* 2002; 2:245-50.

FODA A.A. et al. Mucinous colorectal adenocarcinoma: influence of EGFR and E-cadherin expression on clinicopathological features and prognosis. *appl Immunohistochem mol morphol* 2015 aug 23 (7); 506-15.

FONSECA, A.G. et al. Estudo Epidemiológico do Câncer de Pênis no Estado do Pará, Brasil. *Rev. Pan-Amaz.Saude.*, 1(2):85-90, 2010.

FRALEY, E.E. et al. The role of ilioinguinal lymphadenectomy and significance of histological differentiation in treatment of carcinoma of the penis. *J Urol*, v. 142, p. 1478-82, 1989.

FRANCO, H.L. et al. Redundant or separate entities?—roles of Twist1 and Twist2 as molecular switches during gene transcription. *Nucleic Acids Res*, v. 39, p. 1177-86, 2011.

GERBER, G.S. Carcinoma in situ of the penis. *J Urol*, v. 151, p. 829-33, 1994.

GOULD ROTHBERG B.E.; BRACKEN M.B. E-cadherin immunohistochemical expression as a prognostic factor in infiltrating ductal carcinoma of the breast: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 100:139-48.

GROSS, G; PISTER, H. Role of human papillomavirus in penile câncer. *Med. Microbiol. Immunol*, v. 19, n.1, p. 35-44, 2004.

GROSSMAN, H.B. Premalignant and carcinomas of the penis and scrotum. *Urol Clin North Am*, v. 19, p. 221-6, 1992.

GUENON, H. et al. Down-regulation of ubiquitin ligase Cbe induced by Twist1 haploinsufficiency in Saethre-Crotzen syndrome results in increased PI3k/akt signaling and osteoblast proliferation. *Am J Pathol.*, v. 169, n. 4, p. 1303-11, 2006.

GUIMARÃES, G.C. et al. Penile cancer: epidemiology and treatment. *Curr Oncol Rep*, v. 13, p. 231-9, 2011.

GUIMARÃES, G.C. et al. Penile squamous cell carcinoma clinicopathological features, nodal metastasis and outcome in 333 cases. *J Urol*, v. 182, p. 528-34, 2009.

GUIMARÃES, G.C. 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.

GUO, A. et al. KAI1 expression is up-regulated in early pancreatic cancer and decreased in the presence of metastases. *Cancer Res*, v. 56, n. 21, p. 4876-80, 1996.

HARISH, K.; RAVI, R. The role of tobacco in penile carcinoma. *Br J Urol*, v. 75, p. 375-7, 1995.

HEGARTY P.K. et al. A prospective study of 100 cases of penile cancer managed according to European Association of Urology guidelines. *BJU Int*. 2006; 98:526-31.

HELLBERG, D. et al. Penile cancer: is there an epidemiological role for smoking and sexual behaviour? *Br Med J (Clin Res Ed)*, v. 295, p. 1306-8, 1989.

HEMLER, M.E. Specific tetraspanin functions. *J Cell Biol*, v. 155, n. 7, p. 1103-07, 2001.

HEMLER, M.E. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 6, p. 801-11, 2005.

HEMLER, M.E.; MANNION B.A.; BERDITCHEVSKI, F. Association of TM4SF proteins with integrins: relevance to cancer. *Biochim Biophys Acta*, v. 1287, p. 67-71, 1996.

HEMLER, M.E. Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu Rev Cell Dev Biol*, v. 19, p. 397-422, 2003.

HERGATY, P.K. et al. A prospective study of 100 cases of penile cancer managed according European Association of Urology guidelines. *BJU Int*, v. 98, p. 526-31, 2006.

HERNANDEZ B.Y. et al. Burden of invasive squamous cell carcinoma of the penis in the United States, 1998-2003. *Cancer*. 2008; 113(10 Suppl):2883-91.

HORENBLAS, S. et al. Squamous cell carcinoma of the penis. Treatment of primary tumor. *J Urol*, v. 147, p. 1533-8, 1992.

HOTZ, B. et al. Epithelial to mesenchymal transition: expression of the regulators snail, slug, and Twist1 in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*, v. 13, p. 4769-76, 2007.

HOULE, C.D. et al. Loss of expression and altered localization of KAI1 and CD9 protein are associated with epithelial ovarian cancer progression. *Gynecol. Oncol.*, v. 86, n. 1, p. 69-78, 2002.

HUANG, C.L. et al. Correlation of reduction in MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 expression with recurrences in breast cancer patients. *Am. J. Pathol.*, v. 153, n. 3, p. 973-83, 1998.

HUNG, J.J. et al. Prognostic significance of hypoxia-inducible factor-1alpha, TWIST1 and Snail expression in resectable non-small cell lung cancer. *Thorax*, v. 64, p. 1082-9, 2009.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER – INCA. Estatísticas do Câncer. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2014. Disponível em: <http://www1incagovbr/vigilancia/> 2014>. Acesso em 16 dez. 2014.

JACKSON, P.; KINGSLEY, E.A.; RUSSELL, P.J. Inverse correlation between KAI1 mRNA levels and invasive behaviour in bladder cancer cell lines. *Cancer Lett*, v. 156, n. 1, p. 9-17, 2000.

JACKSON, P.; MARREIROS, A.; RUSSEL, P.J. KAI-1 tetraspanin and metastasis suppressor. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 37, p. 530-4, 2005.

JEE, B.K. et al. Effect of KAI1/CD82 on the beta1 integrin maturation in highly migratory carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 359, n. 3, 703-8, 2007.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Membrana plasmática: digestão intracelular. In: \_\_\_\_\_. *Biologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. p. 94-100.

KALLURI, R.; WEINBERG, R.A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, v. 119, p. 1420-8, 2009.

KANG, Y.; MASSAGUE, J. Epithelial-mesenchymal transitions: Twist in development and metastasis. *Cell*, v. 118, n. 3, p. 277-9, 2004.

KOIFMAN, L. et al. Epidemiological aspects of penile cancer in Rio de Janeiro: evaluation of 230 cases. *Int Braz J Urol International Braz*, v.37, n.2,2011,p.231-243.

KITADOKORO, K. et al. CD81 extracellular domain 3D structure: insight into the tetraspanin superfamily structural motifs. *EMBO J*, v. 20, n. 1-2, p. 12-8, 2001.

KOCATURK, B.; VERSTEEG, H.H. Tissue factor isoforms in cancer and coagulation: may the best isoform win. *Thrombosis research*, v. 129, s. 1, p. 69-75, 2012.

KWOK, W.K. et al. Up-regulation of TWIST in prostate cancer and its implication as a therapeutic target. *Cancer Res*, v. 65, p. 5153-62, 2005.

LEE, T.K. et al. Twist overexpression correlates with hepatocellular carcinoma metastasis through induction of epithelial-mesenchymal transition. *Clin Cancer Res*, v. 12, p. 5369-76, 2006.

LEI P. et al. Expression profile of Twist1, vascular endothelial growth factor end CD34 in patients with diferent phases of osteosarcoma. *Oncology Letters* 10:417-421, 2015.

LIN Q, LI M, SHEN ZY, et al. Prognostic impact of vascular endothelial growth factor-A and E-cadherin expression in completely resected pathologic stage I non-small cell lung cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2010; 40:670-6.

LIU B. et al. Expression profile of epithelial-mesenchymal transition markers in non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: correlation with intravesical recurrence following transurethral resection. *Urol Oncol* 2015 Mar,33(3) 110 e 11-8 .

LIU L.K. et al. Upregulation of vimentin and aberrant expression of E-cadherin/beta-catenin complex in oral squamous cell carcinomas: correlation with the clinicopathological features and patient outcome. *Mod Pathol* 2010; 23:213-24.

LIU, F.S. et al. Frequent down-regulation and lack of mutation of the KAI1 metastasis suppressor gene in epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol. Oncol*, v. 78, n. 1, p. 10-5, 2000.

LIU, J. et al. Expression of KAI1/ CD82, E-cadherin and integrin beta-1 and their relationship with tumor invasion and metastasis in gastric cancer. *Chinese Journal of Pathology*, v. 36, p. 558-9, 2007.

LODISH, H. et al. *Molecular cell biology*. 4th ed. New York: W.H. Freeman, 2000.

LOPES A. et al. 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.

LUCIA, M.S.; MILLER, G.J. Histopathology of malignant lesions of the penis. *Urol Clin North Am*, v. 19, p. 227-46, 1992.

LUO, G.Q. et al. Effect and mechanism of the Twist gene on invasion and metastasis of gastric carcinoma cells. *World J Gastroenterol*, v. 14, p. 2487–93, 2008.

LYNCH JR, D.F.; SCHELLHAMMER, P.F. Tumors of the penis. In: WALSH, P.C. et al. (Ed). *Campbell's Urology*. Pennsylvania: W.B. Saunders, 1998. p. 2453-85.

LYNCH, B.F.; PETTAWAY, C.A. Tumors of the pênis. In: WALSH, P.C. et al. *Campbell's Urology*. 8 ed. Philadelphia: Sauders, 2002, p. 2945-82.

MADEN, C. et al. History of circumcision, medical conditions, and sexual activity and risk of penile cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 85, n. 1, p. 19-24, 1993.

MAECKER, H.T.; TODD, S.C.; LEVY, S. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J*, v. 11, p. 428-42, 1997.

MAREEL, M.; BRACKE, M.; VAN ROY, F. Cancer metastasis: negative regulation by invasion-suppressor complex. *Cancer Detec Prevent*, v. 19, n. 5, p. 451-64, 1995.

MASFERRER, E. et al. Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Penile Squamous Cell Carcinoma. *The Journal Of Urology*, v. 193, n. 2, p. 699-705, 2015.

MAURER, C.A. et al. Reduced expression of the metastasis suppressor gene KAI1 in advanced colon cancer and its metastases. *Surgery*, v. 126, n. 5, p. 869-80, 1999.

MAY M. et al. A switch from epithelial to mesenchymal properties correlates with lymphovascular invasion in squamous cell carcinoma of the penis. *Pathol Res Pract*.2015 Sep; 211(9):641-5.

MCDOUGAL, W.S. Phalic preserving surgery in patients with invasive squamous cell carcinoma of the pênis. *J Urol*, v. 174, p. 2218-20, 2005.

MICALI, G. et al. Penile cancer. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 54, n. 3, p. 369-91, 2006.

MICALI, G. et al. Squamous cell carcinoma of the penis. *J Am Academ Dermatol*, v. 35, p. 432-51, 1996.

MILLER, S.J. et al. Large-scale molecular comparison of human Schwann cells to malignant peripheral nerve sheath tumor cell lines and tissues. *Cancer Res*, v. 66, p. 2584-91, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Câncer no Brasil: dados de registros de base populacional. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2003.

MISRA, S.; CHATURVEDI, A.; MISRA, N.C. Penile carcinoma: a challenge for the developing world. *The lancet oncology*, v. 5, n. 4, p. 240-7, 2004.

MUNEER, A. et al. Molecular prognostic factors in penile cancer. *World J Urol*, v. 27, p. 161-7, 2009.

NARDI, A.C.; GLINA, S.; FAVORITO, L.A. Epidemiological study of penile cancer in Brazil. *Int Braz J Urol.* 2007;33(Suppl 1):1-7.

NARDI, A.C. et al. *Urologia Brasil.* São Paulo: Ed. Planmark, 2013, p. 723-729.

NARDOZZA JÚNIOR, A.; ZERATI FILHO, M.; REIS, R.B. *Urologia Fundamental.* São Paulo: Planmark, 2010. 420p.

NATSUGOE, S. et al. Snail plays a key role in E-cadherin preserved esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2007; 17:517-23.

OKADA, T. et al. TWIST1 hypermethylation is observed frequently in colorectal tumors and its overexpression is associated with unfavorable outcomes in patients with colorectal cancer. *Genes Chromosome Cancer*, v. 49, p. 452-62, 2010.

OKUBO, T. et al. Down-regulation of promoter 1.3 activity of the human aromatase gene in breast tissue by zinc-finger protein, snail (Snai1). *Cancer Res*, v. 61, p. 1338-46, 2001.

ORNELLAS, A.A. et al. Surgical treatment of invasive squamous cell carcinoma of the penile: retrospective analysis of 350 cases. *J Urol*, v. 151, p. 1244-9, 1994.

OU, D.L. et al. Role of Twist in head and neck carcinoma with lymph node metastasis. *Anticancer Res*, v. 28, p. 1355-9, 2008.

PAHWA, M. et al. Penile cancer in India: a clinicoepidemiological study. *Gulf J Oncolog*, v. 12, p. 7-10, 2012.

PERSKY, L.E. Epidemiology of cancer of the penis: II Penis carcinoma. *Recent Results Cancer Res*, v. 60, p. 97-109, 1977.

PETTAWAY C, LYNCH D Jr, DAVIS J. Tumors of the penis. In: Wein AJ, Kavoussi L, Novick AC, et al, eds. *Campbell-Walsh Urology.* 9th ed. Philadelphia: Saunders; 2007:959–992.

PIZZOCARO, G. et al. EAU penile cancer guidelines 2009. *European urology*, v. 57, n. 6, p. 1002-12, 2010.

POMPEO, A.C.L. Câncer de pênis. In: NARDOZZA JUNIOR, A.; ZERATI FILHO, M.; REIS, R.B. *Urologia Fundamental.* São Paulo: Ed. Planmark, 2010, p. 171-8.

POMPEO, A.C.L. Extended lymphadenectomy in penile câncer. *Can J Urol*, v. 2, p. 30-6, 2005.

POMPEO, A.C.L.; HEYNSCF, ABRAMS, P. Penile cancer - International consultation on penile câncer. *Société internationale d'Urologie (SIU).* *Urology*, v. 1076, s. 2, p. S1-S73, 2010.

PROTZEL, C. et al. Down-regulation of the metastasis suppressor protein KAI1/CD82 correlates with occurrence of metastasis, prognosis and presence of HPV DNA in human penile squamous cell carcinoma. *Virchows Arch*, v. 452, p. 369-75, 2008.

PROTZEL, C. et al. Lymphadenectomy in the Surgical Management of Penile Cancer. *European Urology*, v. 55, p. 1075-88, 2009.

QIN, Q. et al. Normal and disease-related biological functions of Twist1 and underlying molecular mechanisms. *Cell Research*, v. 22, p. 90-106, 2012.

RADISKY, D.C. Epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci*, v. 118, p. 4325-6, 2005.

REDDY, C.R.R.M.; DDEVENDRANATH, V.; PRATAP, S. Carcinoma of penis. Role of phimosis. *Urology*, v. 24, p. 85-8, 1984.

REYNOLDS, S.J. et al. Male circumcision and risk of HIV-1 and other sexually transmitted infections in India. *Lancet*, v. 363 (9414), p. 1039-40, 2004.

RIPPENTROP, J.M.; JOSLYN, S.A.; KONETY, B.R. Squamous cell carcinoma of the penis: evaluation of data from the surveillance, epidemiology, and end result program. *Cancer*, v. 101, n. 6, p. 1357-63, 2004.

SALERNO, P. et al. TWIST1 plays a pleiotropic role in determining the anaplastic thyroid cancer phenotype. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 96, p. 772-81, 2011.

SALVIONI R, NECCHI A, PIVA L, Colecchia M, Nicolai N. Penile cancer. *Urol Oncol* 2009; 27:677-85.

SASAKI, K. et al. Significance of Twist expression and its association with E-cadherin in esophageal squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*, v. 28, p. 158, 2009.

SCANLON, C.S. et al. Biomarkers of Epithelial-Mesenchymal Transition in Squamous Cell Carcinoma. *J Dent Res*, v. 92, n. 2, p. 114-121, 2013.

SCHOCK, F.; PERRIMON, N. Molecular mechanisms of epithelial morphogenesis. *Ann Rev Cell Dev Biol*, v. 18, p. 463-93, 2002.

SEIGNEURET, M. Complete predicted three-dimensional structure of the facilitator transmembrane protein and Hepatitis C virus receptor CD81: conserved and variable structural domains in the tetraspanin superfamily. *Biophys. J*, v. 90, p. 212-27, 2006.

SHINOHARA, T. et al. Transduction of KAI1/CD82 cDNA promotes hematogenous spread of human lung-cancer cells in natural killer cell-depleted SCID mice. *Int J Cancer*, v. 94, p. 16-23, 2001.

SHIW W. et al. Expression and clinical significance of CD82 and E-cadherin in non-small cell lung cancer. *Arquives of Iranian medicine*, vol 15, num 11, nov 2012.

SHO, M. et al. Transmembrane 4 superfamily as a prognostic factor in pancreatic cancer. *Int J Cancer*, v. 79, p. 509-16, 1998.

SILVA, B.S.F. TWIST and p-Akt immunoexpression in normal oral epithelium, oral dysplasia and in oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, v. 17, n.1, p. 29-34, 2012.

SINGH, S. et al. The role of TWIST as a regulator in giant cell tumor of bone. *J Cell Biochem*, v. 112, p. 2287-95, 2011.

SLATON, J.W. et al. Tumor stage, vascular invasion and the percentage of poorly differentiated cancer: independent prognosticators for inguinal lymph node metastasis in penile squamous cancer. *The Journal of urology*, v. 165, n. 4, p. 1138-42, 2001.

SONG, L.B. et al. The clinical significance of Twist1 expression in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Lett*, v. 242, p. 258-65, 2006.

SOUZA, M.J.L. Avaliação da transição epitélio-mesênquima no carcinoma de pênis. 2011. 99 f. Tese (Doutorado) – Curso de Pós-Graduação em Ciências – Área de concentração: Oncologia, Fundação Antônio Prudente, São Paulo, 2011.

SPIESS, P.E. et al. Current Concepts in Penile Cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 2013;11:617–624

SRIDEVI, U. et al. Expression of E-cadherin in normal oral mucosa, in oral precancerous lesions and in oral carcinomas. *Eur J Dent*. 2015 Jul-Sep;9(3):364-72.

SRIDHAR, S.C.; MIRANTI, C.K. Tetraspanin KAI1/CD82 suppresses invasion by inhibiting integrin-dependent crosstalk with c-Met receptor and Src kinases. *Oncogene*, v. 25, p. 2367-78, 2006.

STIPP, C.S.; KOLESNIKOVA, T.V.; HEMLER, M.E. Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends Biochem. Sci*, v. 28, p. 106-12, 2003.

TAKAOKA, A. et al. Reduced invasive and metastatic potentials of KAI1-transfected melanoma cells. *Cancer Res*, v. 89, p. 397-404, 1998.

TAKAOKA, A. et al. suppression of invasive properties of colon cancer cells by a metastase suppressor KAI-1 gene. *Oncogene*, v. 16, p. 1443-53, 1998.

THIERY, J.P. et al. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell*, v. 139, p. 871-90, 2009.

TORNESELLO, M.L. et al. Human Papillomavirus genotypes and HPV16 variantes en penile carcinoma. *Int J Cancer*, v. 122, p. 132-7, 2008.

TSEN, H.F. et al. Risk factors for penile cancer: results of a population -based case -control study in Los Angeles County (United States). *Cancer causes & control: CCC*, v. 12, n. 3, p. 267 -77, 2001.

VARMA, V.A. et al. Association of human papillomavirus with penile carcinoma: a study using polymerase chain reaction and in situ hybridization. *Hum Pathol*, v. 22, p. 908-13, 1991.

VELAZQUEZ, E.F.; AYALA, G.; LIU, H. 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*, v. 32, p. 974-80, 2008.

VESUNA, F. et al. Twist is a transcriptional repressor of E-Cadherin gene expression in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 367(2): 235–41.

VILLA, L.L.; LOPES, A. Human Papillomavirus DNA sequence in penile carcinomas in Brazil. *Int J Cancer*, v. 37, p. 853-5, 1986.

WHELOCK, M.J.; JOHNSON, K.R. Cadherins as modulators of cellular phenotype. *Ann Rev Cell Dev Biol*, v. 19, p. 207-35, 2003.

WU, D.H. et al. KAI1 gene expression in colonic carcinoma and its clinical significances. *World J. Gastroenterol*, v. 10, p. 2245-49, 2004.

XU, J.H. et al. KAI1 is a potential target for anti-metastasis in pancreatic cancer cells. *World J Gastroenterol*, v. 14, n. 7, p. 1126-32, 2008.

YANG, J. et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*, v. 117, p. 927-39, 2004.

YANG, X. et al. Overexpression of KAI1 suppresses in vitro invasiveness and in vivo metastasis in breast cancer cells. *Cancer Res*, v. 61, p. 5284-8, 2001.

YU L. et al. Clinicopathological significance of cancer stem cells marked by CD133 and KAI1 expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *World Journal of Surgical Oncology* 2014, 12:118

YUEN, H.F. et al. Significance of TWIST and E-cadherin expression in the metastatic progression of prostatic cancer. *Histopathology*, v. 50, p. 648-58, 2007.

YUEN, H.F. et al. Upregulation of Twist in oesophageal squamous cell carcinoma is associated with neoplastic transformation and distant metastasis. *J Clin Pathol*, v. 60, p. 510-4, 2007.

ZEISBERG, M.; NEILSON, E.G. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest*, v. 119, p. 1429-37, 2009.

ZENG J. et al. Prognostic value of Twist in lung cancer: systematic review and meta-analysis. *Trans Lung Cancer Res* 2015; 4(3); 236-241

ZHANG, X.A. et al. Requirement of the p130CAS-Crk coupling for metastasis suppressor KAI1/CD82-mediated inhibition of cell migration. *J. Biol. Chem*, v. 278, p. 27319-28, 2003.

ZHANG, Z.; XIE, D.; LI, X. Significance of Twist1 expression and its association with E-cadherin in bladder cancer. *Hum Pathol*, v.38, n.4, p. 598-606, 2007.

ZHENG, H. et al. Expression of KAI1 and tenascin, and microvessel density are closely correlated with liver metastasis of gastrointestinal adenocarcinoma. *J Clin Pathol* 2007;60: 50-56.

ZHU, Y. et al. The prognostic significance of p53, Ki-67, epithelial cadherin and matrix metalloproteinase-9 in penile squamous cell carcinoma treated with surgery. *BJU Int.* 2007 Jul; 100(1):204-8.

ZHUO, X. Expression of Twist, an induced of epithelial-mesenchymal transition, in nasopharyngeal carcinoma and its clinical significance. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7 (12).

**APÊNDICE A**  
**PROTOCOLO DE PESQUISA**

TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA:

**“ESTUDO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS TWIST, KAI-1 E E-CADERINA EM AMOSTRAS DE CÂNCER DE PÊNIS DE PACIENTES ATENDIDOS EM UM HOSPITAL DE REFERÊNCIA DO ESTADO DO PARÁ”.**

Nome: \_\_\_\_\_ Registro: \_\_\_\_\_

Procedência: \_\_\_\_\_ Data de Nasc: \_\_\_\_\_

Tabagismo: ( ) Sim. Idade de início \_\_\_\_\_ Maços/dia: \_\_\_\_\_ Parou há \_\_\_\_\_ meses  
( ) Não.

Etilismo: ( ) Sim. Idade de início \_\_\_\_ ( ) Social ( ) Inveterado Parou há \_\_\_\_ meses  
( ) Não.

Tipo de tratamento: ( ) Penectomia parcial ( ) Penectomia total ( ) Linfadenectomia

História pessoal e familiar de neoplasia maligna? ( ) Sim ( ) Não

Hábitos de higiene:

Circuncisão? ( ) Sim ( ) Não Fimose? ( ) Sim ( ) Não

Renda familiar (salários mínimos): \_\_\_\_\_

Escolaridade: \_\_\_\_\_

Idade do início da vida sexual: \_\_\_\_\_

Número de parceiros(as) no último ano: \_\_\_\_\_

Sintomas presentes: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Características, tamanho e localização da lesão: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Tipo histológico: \_\_\_\_\_

Nível de infiltração: \_\_\_\_\_

Grau de diferenciação: \_\_\_\_\_

Margens cirúrgicas: \_\_\_\_\_

Estadiamento clínico-patológico: \_\_\_\_\_

Presença de invasão angio-linfática e perineural: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Tempo de seguimento: \_\_\_\_\_

Presença de metástases: \_\_\_\_\_

Recidivas durante o intervalo de seguimento: \_\_\_\_\_

Tempo de sobrevida: \_\_\_\_\_

Óbito: \_\_\_\_\_

## APÊNDICE B

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Baseado na Resolução Nº 466 de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde)

(Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Ophir Loyola Av. Magalhães Barata, 992 - São Brás, Belém - PA, 66060-281 (91) 3265-6500)

Caro senhor,

O senhor foi selecionado e está sendo convidado a participar de uma pesquisa que visa conhecer melhor o processo de formação de tumores de pênis, no intuito de colaborar com o desenvolvimento de novas formas de diagnóstico e/ou terapias.

Esta pesquisa é intitulada “**Estudo da expressão das proteínas Twist1, Kai1 e E-caderina em amostras de câncer de pênis de pacientes atendidos em um hospital de referência do Estado do Pará**”

E tem como objetivo avaliar através de estudos de imunohistoquímica, a expressão das proteínas Twist1, Kai1 e E-caderina, em tecidos de pacientes portadores de câncer de pênis. Estas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo.

Este estudo consistirá de dados retrospectivos, o qual se detém em análise de laudos histopatológicos, prontuários médicos, revisão de lâminas e reação imunohistoquímica no material arquivado em bloco de parafina de pacientes que foram submetidos a tratamento cirúrgico devido patologia de câncer de pênis e pacientes submetidos a procedimento cirúrgico de postectomia. Utilizando como base o prontuário e laudo histopatológicos dos pacientes, as seguintes variáveis serão avaliadas: história de tabagismo, etilismo, história pessoal e familiar de neoplasia maligna, hábitos de higiene, presença ou não de circuncisão e fimose, renda familiar, escolaridade, região e cidade de origem, número de parceiros, sintomas presentes, características, tamanho e localização da lesão, tipo histológico, nível de infiltração, grau de diferenciação, margens cirúrgicas, grau de Broders, estadiamento clínico-patológico, presença de invasão angio-linfática e perineural, tempo de seguimento, presença de metástases e recidivas durante o intervalo de seguimento, tempo de sobrevida e óbito.

Quando for necessário exemplificar determinada situação, sua privacidade será assegurada, uma vez que seu nome será substituído de forma aleatória. O benefício relacionado à sua participação será de aumentar o conhecimento científico para a área da oncologia. O (A) Sr (a) não terá um benefício direto, pois trata-se de um estudo experimental testando a hipótese de que alguns marcadores podem estar indicando um futuro surgimento do câncer como também a metástase (disseminação) tumoral. No entanto, somente no final deste estudo poderemos concluir a presença de algum benefício para pacientes acometidos e futuros acometidos pela doença. O Sr não terá despesas pessoais em qualquer fase do estudo. Também não terá compensação financeira relacionada à sua participação.

Informo que o senhor tem a garantia de acesso, em qualquer etapa do estudo, sobre qualquer esclarecimento de eventuais dúvidas; e caso sinta necessidade, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto de Ciências da Saúde da UFPA.

O Senhor tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais da pesquisa e caso seja solicitado, terá acesso a todas as informações.

Em qualquer etapa, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o mestrando Lecildo Lira Batista, CPF 76044963268, RG1022518981. Além dos pesquisadores: Prof. Dr. André Salim Khayat, que podem ser encontrados no Hospital Universitário João de Barros Barreto—quanto no Núcleo de Pesquisa em Oncologia, situados dentro do Hospital Universitário João de Barros Barreto na Rua dos Mundurucus, 4487; ou pelos telefones 8142-1948; 8165-6596 ou 8847-1504 e no Hospital Ophir Loyola. Em caso de dúvida sobre a ética da pesquisa pode-se entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Ophir Loyola Av. Magalhães Barata, 992 - São Brás, Belém - PA, 66060-281 (91) 3265-6500.

O pesquisador utilizará os dados e o material coletado somente para esta pesquisa e as informações obtidas serão analisadas em conjunto com as informações de outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. Você terá todo direito de se manter atualizado sobre os resultados parciais da pesquisa. Sua participação é voluntária, isto é, a qualquer momento você pode recusar-se a responder qualquer pergunta ou desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição que forneceu seus dados.

A pesquisa apresentará riscos, mas estes serão minimizados visto que os pesquisadores e pesquisados utilizarão equipamentos de proteção individual e durante os

procedimentos médicos necessários serão realizadas as técnicas assépticas preconizadas e necessárias. Os riscos de identificação do paciente também serão minimizados, pois haverá total sigilo em relação aos nomes e qualquer outra forma de cadastro dos pacientes que estão nos prontuários. A coleta dos dados dos prontuários e de entrevista com os pacientes serão realizados de forma a não interferir nas condutas médicas e a garantir o bem-estar do paciente e da equipe de saúde.

Os benefícios desta pesquisa serão o levantamento de informações para ampliar e melhorar os conhecimentos de marcadores biológicos e sua relação com a neoplasia de pênis.

Os pesquisadores se comprometem a utilizar os dados coletados somente para a pesquisa que, depois de finalizada, terá seus resultados veiculados no meio acadêmico e científico. Serão resguardados o seu nome, endereço, filiação e qualquer outro dado relacionado à sua identificação, que sob nenhuma hipótese será divulgada. As imagens utilizadas na divulgação dos resultados não possibilitarão a identificação do paciente. Estas imagens terão a finalidade de identificar características apenas de estruturas orgânicas acometidas pela patologia relacionadas ao caso clínico. Apenas para esta pesquisa.

Declaro estar ciente do inteiro teor deste TERMO DE CONSENTIMENTO e estou de acordo em participar do estudo proposto, sabendo que dele poderei desistir a qualquer momento, sem sofrer qualquer punição ou constrangimento. Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Estudo da expressão de genes envolvidos na tumorigênese do câncer de pênis em pacientes atendidos em hospital de referência do estado do Pará.”

\_\_\_\_\_ Belém,

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Assinatura do sujeito/Representante responsável

\_\_\_\_\_ Belém,

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Assinatura da testemunha

(Para caso de sujeitos menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual).

Belém, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura do sujeito que colheu o TCLE

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

ASSINATURA DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL

NOME:

ENDEREÇO:

FONE:

REGISTRO NO CONSELHO:

Belém, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Identificação do CEP.**

Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Ophir Loyola Av. Magalhães Barata, 992  
- São Brás, Belém - PA, 66060-281 (91) 3265-6500.

## ANEXO A

HOSPITAL OPHIR LOYOLA -  
HOL



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ESTUDO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA TUMORIGÊNESE DO CÂNCER DE PÊNIS EM PACIENTES ATENDIDOS EM HOSPITAL DE REFERÊNCIA DO ESTADO DO PARÁ

**Pesquisador:** Iecildo Lira Batista

**Área Temática:** Genética Humana:

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

**Versão:** 1

**CAAE:** 39808314.7.0000.5550

**Instituição Proponente:** Hospital Ophir Loyola

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 948.189

**Data da Relatoria:** 19/01/2015

#### **Apresentação do Projeto:**

Este estudo será do tipo observacional com método indutivo, estatístico-descritivo, retrospectivo, de fontes primárias e secundárias e unicêntrico, que consistirá de dados retrospectivos, o qual se detém em análise de laudos histopatológicos, prontuários médicos, revisão de lâminas e reação imunohistoquímica no material arquivado em bloco de parafina de pacientes que foram submetidos a tratamento cirúrgico devido patologia de câncer de pênis no período de janeiro 2002 a novembro 2014 no Hospital Ophir Loyola, com o objetivo de verificar se a expressão proteica do TWIST1, KAI-1 e E-CADERINA estão relacionados a progressão do câncer de pênis. Serão coletados também dados dos pacientes submetidos a procedimento cirúrgico de postectomia e que no histopatológico não foi evidenciado câncer de pênis, sendo estes dados utilizados como grupo controle. Utilizando como base o prontuário e laudo histopatológicos dos pacientes, as seguintes variáveis serão avaliadas: história de tabagismo, etilismo, história pessoal e familiar de neoplasia maligna, hábitos de higiene, presença ou não de circuncisão e fimose, renda familiar, escolaridade, região e cidade de origem, número de parceiros, sintomas presentes, características, tamanho e localização da lesão, tipo histológico, nível de infiltração, grau de diferenciação, margens

**Endereço:** GOVERNADOR MAGALHAES BARATA 523/1075  
**Bairro:** SAO BRAS **CEP:** 66.063-240  
**UF:** PA **Município:** BELEM  
**Telefone:** (91)3265-6645

**E-mail:** cepophirloyola.pa@gmail.com

## ANEXO B



GOVERNO DO ESTADO DO PARÁ  
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE  
HOSPITAL OPHIR LOYOLA



DIRETORIA DE ENSINO E PESQUISA  
DEPARTAMENTO DE ENSINO E PESQUISA  
DIVISÃO DE PESQUISA

Belém, 01 de dezembro de 2014.

### DECLARAÇÃO

Declaro em nome do Hospital Ophir Loyola ter conhecimento do projeto de pesquisa intitulado: : **“Estudo da expressão de proteínas envolvidos na tumorigênese do câncer de Pênis em pacientes atendidos em Hospital de referencia do Estado do Pará”**, tendo como pesquisadores **Andre Salim Khayat** (orientador) e **Lecildo Lira Batista** dando-lhes consentimento para realizar a pesquisa nesta Instituição, após apresentação do Parecer de Aprovação de um Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, durante o período preestabelecido.

Estamos cientes e concordamos com a publicação dos resultados encontrados, sendo obrigatoriamente citado na publicação o nome do **Hospital Ophir Loyola** como um dos locais de realização da pesquisa.

Atenciosamente,

Enla: Maria do Rosário Fernandes  
Chefe Div. Educação Continuada e  
Prevenção de Câncer / DEEP  
COREN-PA: 055713

*Maria do Rosário Fernandes*  
Maria do Rosário Fernandes  
Chefe em Exercício da Divisão de Pesquisa