



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Faculdade de Ciências Médicas

Paulo Ornellas de Souza

**Validação experimental da subexpressão de C3a do sistema complemento
no plasma de pacientes com carcinoma epidermóide de pênis**

Rio de Janeiro
2018

Paulo Ornellas de Souza

**Validação experimental da subexpressão de C3a do sistema complemento no plasma de
pacientes com carcinoma epidermóide de pênis**

Tese apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor, ao Programa de
Pós-graduação em Ciências Médicas, da
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Dr^a Gilda Alves Brown
Coorientadora: Dr^a.Maria Helena Ornellas

Rio de Janeiro
2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S729 Souza, Paulo Ornellas de.
Validação experimental da subexpressão de C3a do sistema complemento no plasma de pacientes com carcinoma epidermóide de pênis / Paulo Ornellas de Souza. - 2018.
102 f.

Orientador: Gilda Alves Brown.
Coorientadora: Dr^a.Maria Helena Ornellas

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-Graduação em Ciências Médicas.

1. Pênis - Câncer - Teses. 2. Neoplasias Penianas - Cirurgia. 3. Biomarcadores. 4. Carcinoma de células escamosas. 5. Complemento C3a. 6. Plasma. I. Brown, Gilda Alves. II. Ornelas, Maria Pereira, Denise de Abreu. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.66-006.6

Bibliotecária: Thais Ferreira Vieira - CRB/7 5302

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Paulo Ornellas de Souza

Validação experimental da subexpressão de C3a do sistema complemento no plasma de pacientes com carcinoma epidermóide de pênis

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 17 de dezembro de 2018.

Banca Examinadora:

Dr^a Gilda Alves Brown

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Dr Ronaldo Damiao

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Dr^a Jacyara Maria Brito Macedo

Faculdade de Ciências médicas - UERJ

Dr. Pedro Éder Portari Filho

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Marco Antônio Quesada Ribeiro Fortes

Hospital Naval Marcílio Dias

Rio de Janeiro

2018

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer às minhas orientadoras Dra. Gilda Alves Brown e Maria Helena F. Ornellas de Souza pelo suporte, dedicação e atenção dispensados ao longo desses quatro anos de desenvolvimento deste projeto.

Aos meus colegas, do laboratório de Marcadores Circulantes da UERJ, com especial atenção a Dra. Marilza de M. Ribeiro-Carvalho cuja a experiência e expertise, no campo da pesquisa básica, foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha companheira Elaine Teixeira que soube me apoiar não apenas no desenvolvimento deste projeto de doutorado mas também durante o período de especialização em Cirurgia Geral e Urologia.

À minha família que sempre apoiou minhas escolhas, alicerce primordial no meu processo de formação. Neste contexto, destaco meu pai Dr. Antonio Augusto Ornellas de Souza e minha mãe Maria Helena F. Ornellas de Souza que desde de muito cedo me estimularam a seguir a profissão de médico e me incentivaram a apreciar a pesquisa científica.

Muito obrigado!

Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino.

Leonardo da Vinci

RESUMO

SOUZA, Paulo Ornellas de. **Validação experimental da subexpressão de C3a do sistema complemento no plasma de pacientes com carcinoma epidermóide de pênis.** 2018. 102 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

O carcinoma epidermóide do pênis (CEP) representa 95% dos tipos de câncer de pênis. No Brasil, a incidência é de 2,7%, mas em algumas áreas do país, a incidência pode chegar a 17% dos casos diagnosticados de câncer por ano. É uma doença agressiva cuja sobrevida em 5 anos pode variar entre 85%, para os estádios I e II, a 11 % para os casos avançados. O estadiamento clínico não é um indicador confiável do comprometimento linfonodal e da sobrevida. Sendo assim é importante que se tenha novas estratégias de classificação. Marcadores tumorais podem ser uma nova estratégia. Em nosso estudo anterior foi descrito que os fragmentos de C3 e C4a/b do sistema complemento encontravam-se subexpressos em pacientes com CEP em relação aos indivíduos saudáveis. O objetivo do presente estudo foi validar a subexpressão da proteína C3a do sistema complemento como biomarcador em pacientes com CEP. Nós investigamos a possibilidade da proteína C3a ser um biomarcador no diagnóstico desses pacientes usando um kit comercial de ensaio imuno-enzimático (ELISA – BD BioscienceOptEIA™ Humano C3a Kit). A proteína C3a foi avaliada em amostras de plasma de 39 pacientes com CEP, 50 indivíduos saudáveis e 15 pacientes com câncer de próstata. Adotou-se o teste de Mann-Whitney não paramétrico de comparação das medianas entre os grupos. Corroborando com nossos resultados anteriores, a proteína C3a mostrou-se significativamente subexpressa em pacientes com CEP em comparação com os grupos de indivíduos controles e pacientes com câncer próstata ($p<0,05$). Neste contexto, o C3a mostrou ser experimentalmente um biomarcador plasmático do CEP. A identificação de biomarcadores no plasma de pacientes com CEP são de extrema importância pois são úteis para o manejo clínico, auxiliando nos processos de diagnóstico, estadiamento, avaliação de resposta terapêutica, detecção de recidivas e prognóstico e para teste de novos tratamentos.

Palavras-chave: Câncer Epidermóide de Pênis. Biomarcador. Sistema Complemento. C3a

ABSTRACT

SOUZA, Paulo Ornellas de. **Experimental validation of the complement protein C3a down expression in the plasma of patients with squamous cell carcinoma of the penis.** 2018. 102 f. Tese de doutorado em Ciências Médicas – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Squamous cell carcinoma of penis (SCCP) accounts for 95% of all types of penile cancer. In Brazil, the incidence is 2.7%, but in some areas of the country, the incidence can reach 17% of the diagnosed cases of cancer per year. It is an aggressive disease whose survival over 5 years is around 85% for stages I and II, but can reach 11% in advanced cases. Clinical practice is not a reliable indicator of lymph node involvement and survival. Therefore, it is important to have new classification strategies. Tumor markers may be a new strategy. In our previous study it was described that the C3 and C4a/b fragments of the complement system were underexpressed in patient with SCCP when compared with health individuals. The objective was to validate the subexpression of the complement system C3a protein as a biomarker. We investigated the possibility of C3a protein being a biomarker in the diagnosis of these patients using a commercial enzyme immunoassay kit (ELISA - BD BioscienceOptEIA™ Human C3a Kit). The C3a protein was evaluated in plasma samples from 39 patients with SCCP, 50 healthy controls and 15 patients with prostate cancer. The non-parametric Mann-Whitney test was used to compare the medians between groups. Corroborating with our previous results, C3a protein was shown to be significantly underexpressed in patients with SCCP compared to control and prostate cancer patients ($p < 0.05$). In this context, C3a proved to be experimentally a plasma biomarker of PEC. The identification of biomarkers in the plasma of patients with SCCP is extremely important for clinical management, assisting in the diagnosis, staging, therapeutic response, relapse and prognosis detection and testing of new treatments.

Keywords: Penile epidermoid carcinoma. Tumor Biomarkers. Complement System. C3a

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 -	Sistema TNM (AJCC, UICC), 2002	16
Quadro 2 -	Graduação histopatológica.....	17
Figura 1 –	Cascacata do sistema completo	21
Figura 2 –	Placa de Elisa com solução de parada	29
Figura 3 –	Placa de ELISA com substrato que cora amostras com C3a	30
Figura 4 –	Distribuição do diluente padrão.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características dos pacientes com CEP.....	27
Tabela 2 – Características dos pacientes com câncer de próstata.....	28
Tabela 3 – Comparação dos níveis de C3a (ng/ml) entre controles e pacientes com CEP estratificados por estágios.....	34
Tabela 4 – Comparação dos níveis de C3a (ng/ml) entre controles e pacientes com CEP estratificados por risco.....	34
Tabela 5 – Comparação dos níveis de C3a (ng/ml) entre controles e pacientes com CP, e CP vs. CEP.....	35
Tabela 6 – Complicações operatórias associadas à linfadenectomia inguinal segundo várias séries publicadas na literatura mundial.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEP –	Carcinoma epidermóide de pênis
CP –	Câncer de próstata
DP –	Desvio padrão
DNA –	Ácido desoxirribuncléico
EBV –	Epstein Barr virus
ELISA –	Ensaio imunoensimático
G –	Graduação histopatológica
HPV –	Papiloma vírus humano
Hsp70 –	Heat shock
INCA –	Instituto Nacional do Câncer
MAC –	Complexo de ataque a membrana
MHC –	Complexo de histocompatibilidade classe I
MBL –	Lectina ligadora de manose
NK –	Natural killer
PASW –	Predictive Analytics Software
PEC –	Penile epidermoid carcinoma
PHI –	Prostate Heath Index
PSA –	Antígeno Prostático Específico
SCCP –	Squamous cell carcinoma of penis
TNM –	Tumor; Nodes; Metastasis
TMB –	Tetramethylbenzidine
UICC –	União Internacional Contra o Câncer

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
1 REVISÃO NA LITERATURA	13
1.1 Carcinoma Epidermóide de Pênis e o HPV	13
1.2 Vacinação contra o HPV.....	14
1.3 Estadiamento	16
1.4 Marcadores Tumorais Teciduais.....	17
1.5 Marcadores Tumorais Circulantes.....	18
1.6 Sistema Complemento	20
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivos Gerais.....	24
2.2 Objetivos Específicos	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Pacientes e amostras.....	25
3.2 Ensaio Imunoenzimático	29
3.3 Análise estatística	33
4 RESULTADOS	33
5 DISCUSSÃO	35
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	41
REFERÊNCIAS	42
APÊNDICES	56
APÊNDICE A - Downregulation of C3 and C4A/B complement factor fragments in plasma from patients with squamous cell carcinoma of the penis (Artigo científico) ..	57
APÊNDICE B - Experimental validation of the complement protein C3a down expression in the plasma of patients with squamous cell carcinoma of the penis (Artigo científico) ..	68
APÊNDICE C - Proteomics analysis of tissue samples from patients with squamous cell carcinoma of the penis and positive to human papillomavirus (Artigo científico)	74
APÊNDICE D - HPV vaccination is fundamental for reducing or erradicate penile cancer Opinion: NO (Artigo científico)	87
ANEXO A- Parecer do comitê de ética e pesquisa	90
ANEXO B- Modelos dos termos de consentimento livre e esclarecido	92

INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermóide de pênis (CEP) é uma neoplasia rara que acomete homens principalmente entre os 50 aos 70 anos de idade (POW-SANG *et al.*, 2010, MOSCONI *et al.*, 2005). O CEP representa 95% das neoplasias penianas. Os 5% restantes, decorrem de metástases originadas em tumores de outros órgãos e de lesões tumorais menos frequentes como carcinoma verrucoso, a eritroplasia de Queyrat e a doença de Bowen (GURSEL *et al.*, 1973). O câncer de pênis tem uma baixa incidência global, representando cerca de 0,4%- 0,6% das neoplasias malignas nos Estados Unidos e na Europa e é responsável por 0,1 % das mortes por câncer nestas regiões (MORRIS *et al.*, 2011; HELLER *et al.*, 2016). É uma doença mais comum em áreas menos desenvolvidas no mundo, como na África, Ásia e América do Sul. Nestas áreas, o câncer de pênis pode representar 10 a 20 % de todas as neoplasias em homens. O Brasil tem uma das maiores incidências atingindo de 2,7 a 6,8 por 100.000 casos. Em algumas áreas do país, esta incidência, pode chegar a 17% dos casos de câncer diagnosticados por ano, sendo o quarto tipo mais comum em homens no Brasil (BRUNINI *et al.*, 1982, ORNELLAS *et al.*, 1994, FAVORITO *et al.*, 2008, COUTO *et al.*, 2014). O CEP pode ocorrer em qualquer região do órgão genital masculino. No entanto, as áreas mais afetadas em ordem decrescente de apresentação são: glande (48%), prepúcio (21%), glande e prepúcio (9%), sulco coronal (6%) e haste peniana (< 2%) (SUFRIN *et al.*, 1991).

Entre os fatores de risco envolvidos com o CEP destacam-se: fimose, número de parceiros sexuais, infecção pelo papiloma vírus humano (HPV) e exposição ao tabaco. Uma higiene adequada e a prática de circuncisão neonatal funcionam como fatores de proteção. (DOUGLAWI *et al.* 2017, ORNELLAS *et al.* 2008, RAVI *et al.* 1993). Desse modo, processos inflamatórios estão diretamente relacionados a diversos tipos de câncer e ao câncer de pênis em especial, onde a relação causal entre inflamação, imunidade inata e câncer é mais amplamente aceita (MOSCONI *et al.*, 2005).

Apesar das vias moleculares que ligam a inflamação crônica ao câncer terem sido preconizadas por Virchow há cerca de 150 anos atrás, só recentemente seus mecanismos começaram a ser desvendados . Além das modificações genéticas e epigenéticas que podem estimular à proliferação de células cancerígenas e sua resistência à morte, o microambiente tumoral é reconhecido como um promotor chave da tumorigênese por desencadear e apoiar processos locais de inflamação, angiogênese e metástase (HANAHAN E WEINBERG, 2011). Na inflamação, várias vias determinam o estado de ativação das células do sistema imune inato

e adaptativo. Entre elas a ativação do sistema complemento no microambiente tumoral pode modular a imunidade local e resultar em inflamação e na supressão de respostas antitumorais (HAJISHENGALLIS *et al.*, 2017, REIS *et al.*, 2017).

Recentemente, aplicando abordagem proteômica baseada na técnica *ClintProt*, nosso grupo identificou dois peptídeos diferencialmente expressos no plasma de pacientes com CEP e controles, que correspondiam fragmentos de C3 (m/z 1896.17) e C4a/b (m/z 2021.26) do sistema complemento. Nossos resultados demonstraram que quanto mais avançada era a doença mais subexpressos eram os fragmentos de C3 e C4 a/b (ORNELLAS *et al.*, 2012). Esses fragmentos parecem estar predominantemente subexpressos em pacientes com doença metastática e a resposta imune inata desses pacientes poderia estar suprimida (PARDOLL, 2003). Com base nesses resultados, realizamos a validação experimental da expressão de C3a no plasma de pacientes com CEP. Comparamos os níveis de C3a em pacientes com CEP, pacientes com câncer de próstata (CP) e indivíduos saudáveis, usando ensaio imunoenzimático comercial (ELISA) (ORNELLAS *et al.*, 2017). Optou-se por esta técnica por ter menor custo quando comparada com a abordagem proteômica usada anteriormente (ORNELLAS *et al.*, 2012). A validação pelo método de ELISA é importante porque nenhum método proteômico é 100% seguro e variações podem ocorrer. Além disso, o método usado no artigo anterior é um método experimental de alto custo e não se enquadra como um exame laboratorial de rotina. Diante disso, se há intenção de usar o C3a como um marcador, isto deve ser realizado usando um método simples que possa ser empregado de rotina como o ELISA.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Carcinoma Epidermóide de Pênis e o HPV

Estudos sugerem a relação entre o desenvolvimento do carcinoma de pênis com a infecção por HPV (Papiloma Vírus Humano) (SCHEINER *et al.*, 2008; McCANCE *et al.*, 1986; LONT *et al.*, 2006). Estima-se que o papilomavírus surgiu na África durante a era Paleozóica há 330 milhões de anos. A partir desse momento, se espalhou pelo mundo, tornando-se assim a família de vírus mais antiga e mais conhecida da humanidade (ARALDI *et al.*, 2017). Os papilomavírus são constituídos de DNA, da família *Papillomaviridae*, mucoepiteliotrópicos e espécie-específicos, que são transmitidos por meio de contato direto da mucosa sadia com a mucosa afetada. Até o momento foram descritos mais de 200 tipos de HPVs (HAEDICKE e IFTNER, 2013). Apesar de apresentarem uma organização genômica semelhante, os diferentes tipos de HPV infectam epitélios em regiões anatômicas específicas. Os vírus podem se replicar de forma episomal, isto é o DNA viral permanece circular no núcleo do hospedeiro, não estando integrado ao DNA do mesmo, podendo causar lesões escamosas, denominadas verrugas, papilomas ou condilomas. Aproximadamente 30 tipos de HPV infectam a mucosa do trato anogenital. Estes tipos de HPV que também podem ser detectados na mucosa oral são classificados segundo o prognóstico clínico das lesões ou segundo o seu potencial de malignidade, como: de “baixo risco” (tipos 6 e 11, mais incidentes) ou “alto risco” (tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 66) (BOCARDO e VILLA, 2010).

O câncer de pênis pode ser subdividido em casos positivos e negativos para o HPV, de forma semelhante a que ocorre nos carcinomas vulvar e de cabeça e pescoço (BEZERRA *et al.*, 2001, CUBILLA *et al.*, 2001). Os casos que são negativos para o HPV parecem estar ligados a alterações epigenéticas. Além de outros fatores de risco já citados anteriormente também foram associados à carcinogênese do pênis, a presença de outros vírus, como o Epstein-Barr vírus (EBV), conhecido por estar envolvido em vários tipos de câncer (MÜLLER-COAN *et al.*, 2018). O EBV foi frequentemente encontrado no trato genital, incluindo descargas uretrais, úlceras genitais, bem como em mucosas saudáveis (VOOG, 1996). Em um estudo do nosso grupo (AFONSO *et al.*, 2017) foi demonstrado que 79 de 122 pacientes (64.8%) tinham amostras de câncer de pênis positivas para o HPV e uma prevalência de 50.8% (62/122) para o EBV. As co-infecções por HPV/EBV foram encontradas em 27,3% dos casos. Em relação ao

status de metilação do p16^{ink4a} nas amostras, 64,5% (71/110) eram hipermetiladas, 25,5% (28/110) não metiladas e 10% (11/110) negativas na eletroforese de agarose (AFONSO *et al.*, 2017).

1.2 Vacinação contra o HPV

O principal objetivo dos programas de vacinação contra o vírus do HPV no mundo tem sido a prevenção do câncer de colo uterino (KOUTSKY., 2009). Desde que foi estabelecida a correlação entre o vírus do HPV com o câncer colo uterino nos anos 70, alguns sorotipos foram relacionados a tumores epiteliais na vulva, vagina, ânus, pênis e orofaringe (VORIS *et al.*, 2018). Entretanto, os dados mais robustos na literatura em relação a vacinação contra o HPV se referem a eficácia na prevenção da neoplasia intra-epitelial de colo uterino e do câncer de colo uterino. Uma recente revisão de 10 anos e meta-análise de vários ensaios clínicos randomizados citam a eficácia da vacinação numa proporção de 89,8 a 100% em um seguimento num intervalo de 34,9 meses a 9,4 anos (ANGIOLI *et al.*, 2016). O evento adverso mais comum foi dor no local da injeção da vacina. Nenhum evento adverso sério foi relacionado à vacina (ANGIOLI *et al.*, 2016). Outra revisão de mais de 10 anos, encontrou eficácia semelhante, especificamente para as vacinas bivalente e 9-valente (HARPER *et al.*, 2017). Em relação aos casos masculinos de infecção por HPV, uma preocupação significativa é a baixa taxa de soroconversão após a infecção natural (GIULIANO *et al.*, 2015). Além disso, foi sugerido que a soropositividade do anticorpo contra o HPV em homens não fornece imunidade significativa a infecções futuras, como ocorre em mulheres (LU *et al.*, 2012). Felizmente, a vacina quadrivalente contra o HPV demonstrou ser altamente imunogênica em homens de 16 a 26 anos, com soroconversão até o 7º mês, permanecendo elevada mesmo aos 36 meses, com títulos comparáveis aos das mulheres (HILLMAN *et al.*, 2012). Na Suécia, o atual programa de imunização contra o HPV inclui apenas mulheres jovens, e sugere-se que coberturas acima de 50% nesses programas ofereçam imunidade de rebanho (OSTENSSON *et al.*, 2017; DROLET *et al.*, 2015). Desde a introdução da vacina contra o HPV na Suécia, a incidência de verrugas anogenitais diminuiu entre a população feminina vacinada e a população masculina não vacinada, sugerindo que a imunidade coletiva foi alcançada (HERWEIJER *et al.*, 2014; HERWEIJER *et al.*, 2017). No entanto, entre os homens que fazem sexo com outros homens, a imunidade de rebanho ainda não foi comprovada, razão pela qual um estudo recente

recomendou estratégias de prevenção direcionadas para alcançar esta população (BOGAARDS *et al.*, 2015). A Organização Mundial de Saúde recomenda fortemente a vacinação de crianças de ambos os sexos. Após o início da vacinação, taxa de infecção foi reduzida. Nos EUA, recomenda-se a vacinação de crianças, homens e mulheres de 9 a 26 anos (JIN, 2018).

No entanto, não está claro se a vacinação contra o HPV seria suficiente para erradicar ou reduzir a prevalência de câncer de pênis. Maior educação do paciente juntamente com estratégias de prevenção tais como uso de preservativo, medidas de higiene, cessação do tabagismo e a prevenção de estados de inflamatórios crônicos podem ter impacto considerável na patogênese de lesões pré-cancerosas do pênis. Embora, a adoção da vacinação contra o HPV tenha levado a algum sucesso em mulheres, os resultados ainda não foram elucidados na população masculina. Mais estudos são necessários a longo prazo para declarar que vacinação contra o HPV é eficaz contra o CEP (ORNELLAS *et al.*, 2018).

1.3 Estadiamento

Atualmente, o método de estadiamento para o carcinoma peniano mais utilizado é a classificação TNM de 2002 da União Internacional Contra o Câncer (UICC) adotado pelos Serviços de Urologia do Instituto Nacional de Câncer (INCA) e do Hospital Mário Kröeff (Rio de Janeiro – RJ). Este sistema de classificação permite a avaliação do tumor primário e dos linfonodos da região inguinal, com base no grau de invasão das estruturas penianas pelo tumor primário e a extensão da doença linfonodal inguinal. T - representa o tamanho do tumor, N - o comprometimento dos linfonodos regionais por células metastáticas e M - a avaliação das metástases à distância (Quadro 1).

Quadro 1–Sistema TNM (AJCC, UICC), 2002.

<i>Sistema TNM (AJCC/UICC) 2002</i>	
T – Tumor primário	
Tx – tumor primário não avaliado	
T0 – sem evidência de tumor	
Tis – carcinoma <i>in situ</i>	
Ta – tumor verrucoso não-invasivo	
T1 – tumor invade tecido conjuntivo subepitelial	
T2 – tumor invade corpo cavernoso ou esponjoso	
T3 – tumor invade uretra ou próstata	
T4 – tumor invade estruturas adjacentes	
N – Linfonodos regionais	
Nx – linfonodos não avaliados	
N0 - sem linfonodos positivos	
N1 – metástase única em linfonodo inguinal superficial	
N2 – metástases múltiplas ou bilaterais em linfonodos inguinais superficiais	
N3 – metástases em linfonodos inguinais profundos ou pélvicos	
M – Metástases à distância	
Mx – metástases não avaliadas	
M0 – sem metástases à distância	
M1 – metástases à distância	

Fonte: TNM: classificação de tumores malignos, 6. ed – Rio de Janeiro: INCA, 2004. p 189

Pacientes com carcinomas *in situ* e/ou tumores verrucosos não apresentam envolvimento ganglionar e metástases. É importante ressaltar a importância da associação de duas características patológicas da lesão primária (grau e invasão). Por exemplo, somente 4% dos pacientes com tumores grau 1 ou 2 e sem invasão dos corpos cavernosos, apresentaram gânglios regionais comprometidos (McDOUGAL, 1995).

Quadro 2 – Graduação Histopatológica

<i>Sistema de Classificação de Broders</i>
G – Graduação Histopatológica
Gx – Grau ou diferenciação não podem ser avaliados
G1 – Bem diferenciados
G2 – Moderadamente diferenciados
G3-4 Pobremente diferenciados / indiferenciados

Fonte: <http://portaldaurologia.org.br/medicos/wp-content/uploads/2017/06/98.pdf>

A profundidade da lesão é outro ponto importante, quando não existe a invasão do corpo cavernoso. Na literatura há relatos que mostram que nenhum indivíduo com doença superficial apresentou envolvimento ganglionar (FRALEY *et al.*, 1989). Em contraposição quando o tumor é invasivo, 61 a 75% dos pacientes vão apresentar comprometimento nodal (HORENBLAS *et al.*, 1993; McDUGAL *et al.*, 1986).

A linfadenectomia é o método mais efetivo de identificar e eliminar metástases linfonodais. Ela é necessária nos casos de linfonodos palpáveis, estádios T1G3, T2-T4, quando existe mutação do gene TP53 e invasão linfovascular. A presença de coilocitose na peça cirúrgica peniana caracteriza melhor prognóstico (ORNELLAS *et al.*, 2008)

1.4 Marcadores Tumorais Teciduais

Os marcadores tumorais são macromoléculas presentes no tumor, no sangue ou em outros líquidos biológicos, cujo aparecimento e/ou alterações em suas concentrações estão relacionados com a gênese e o crescimento de células neoplásicas (CAPELOZI, 2001). O marcador ideal reúne como características permitir: o diagnóstico precoce das neoplasias, identificação de sua origem, estabelecimento da extensão da doença, monitoração da resposta terapêutica e a detecção precoce da recidiva (REIS, 2005). Além disso, deve ser órgão-sítio específico e ter meia-vida curta, permitindo acompanhar temporariamente as mudanças do tumor (SILVEIRA *et al.*, 2005).

A principal proteína induzida pelo estresse em processos inflamatórios é a Hsp70 (*heat shock protein*). A Hsp70 protege as células a partir de uma vasta gama de estímulos apoptóticos e necróticos. Com isso, assumiu-se que as proteínas Hsp70 possam conferir vantagem de sobrevivência para as linhagens celulares tumorais. NYLANDSTED *et al.*, (2000) demonstraram que a depleção de Hsp70 por um adenovírus expressando antisense Hsp70 resultou numa morte celular massiva de linhagens de células tumorais de câncer de mama, cólon, próstata e fígado. Estes autores defendem que as proteínas Hsp70 sejam um pré-requisito para a sobrevivência de células tumorais. AGHDASSI *et al.* (2007) demonstraram que a depleção de Hsp70 induz a apoptose no adenocarcinoma pâncreas. A Hsp70 também foi detectada no tecido tumoral dos nossos pacientes com câncer de pênis (KOIFMAN *et al.*, 2015).

Plectina é uma proteína da família plakina. Plakinas conectam filamentos intermediários a desmossomas e hemidesmossomas, estabilizam células mecanicamente, regulam a dinâmica do citoesqueleto e servem como uma plataforma para sinalização de moléculas. NIWA *et al.* (2009) relataram que a expressão de plectina leva ao deslocamento do centrosoma, contribuindo assim para a instabilidade genômica e desenvolvimento do câncer. Nossa grupo detectou plectina em tecido tumoral peniano (KOIFMAN *et al.*, 2015).

Enolase é uma enzima glicolítica que foi usada como marcador de diagnóstico para identificar câncer de pulmão (HE *et al.*, 2007). Nas células cancerosas, a enolase é sobre-expressa e localiza-se na sua superfície, onde atua como uma proteína chave na metástase tumoral, promovendo o metabolismo celular em condições anaeróbicas e conduzindo invasão tumoral através da ativação do plasminogênio e degradação da matriz extracelular. Ela também exibe um padrão característico de acetilação, metilação e fosforilação que regula as funções proteicas e a imunogenicidade. As isoformas alfa e beta enolase foram identificadas exclusivamente nos tecidos tumorais penianos dos nossos pacientes (KOIFMAN *et al.*, 2015).

1.5 Marcadores Tumorais Circulantes

A importância do plasma para o diagnóstico de determinada doença baseia-se em duas características: a facilidade com que ele pode ser obtido de forma segura e o fato de fornecer em forma abrangente, amostras do fenótipo, mostrando o estado do corpo num ponto particular do tempo.

A maioria dos marcadores urológicos peca pela falta de especificidade e sensibilidade (ROSA *et al.*, 2005). Exceção deve ser feita ao PSA que é utilizado para rastreamento de neoplasia prostática e é o marcador tumoral de maior utilidade clínica até o momento. Ele é secretado no lúmen dos ductos prostáticos, estando presente em grandes concentrações no líquido seminal (aproximadamente 2mg/mL). Aparentemente, teria a função de liquefazer o coágulo seminal. Muitos estudos demonstraram que o PSA é útil para o diagnóstico do câncer de próstata. Em geral, o valor preditivo positivo do PSA é de 20% em pacientes com valores ligeiramente elevados (entre 4,0 ng/mL e 10,0 ng/mL), e de 60% em pacientes com valores de PSA superiores a 10ng/mL (ALMEIDA *et al.*, 2007). Hoje em dia, existem diversos exames de sangue com combinam o PSA total com outros marcadores. O teste *phi* (Prostate Heath Index) é um método inovador que consiste em um índice multivariado obtido a partir de algoritmo matemático para avaliação de risco de tumor prostático. O cálculo utiliza os valores combinados de três dosagens: PSA total, PSA livre e p2PSA. A partir do índice *phi* é possível obter uma probabilidade de câncer de próstata utilizando-se apenas uma amostra de soro, que resulta em diminuição de biópsias desnecessárias (LOEB *et al.*, 2014). Existe também o 4KScore que consiste em um teste que combina e mensuração das 4 calicreínas incluindo o PSA total, PSA livre, PSA intacto e a calicreína humana 2 (hK2). O resultado deste teste é combinado em um algoritmo com a idade do paciente, exame retal digital e biópsia negativa prévia. O teste 4Kscore prevê a pontuação percentual de risco de <1% a> 95% de um homem apresentar câncer de próstata agressivo em uma futura biópsia (PAREKH *et al.*, 2015).

A maioria dos estudos que visam identificar marcadores prognósticos para câncer de próstata tem incidido sobre biomarcadores de tecido. Por causa da natureza multifocal da maioria dos casos de câncer de próstata e da heterogeneidade intratumoral (CAI *et al.*, 2012), biomarcadores teciduais estão sujeitos as mesmas limitações que as amostras histopatológicas resultantes de biópsias. Por esse motivo, o desenvolvimento da biópsia líquida representa um avanço significativo para a descoberta de novos biomarcadores. Essa abordagem, possibilita a avaliação de moléculas circulantes em diferentes fluidos biológicos tais como o plasma, soro, urina e líquido cefalo raquidiano (DI MEO *et al.*, 2017). Este método representa uma vantagem sobre a biópsia tecidual tradicional por ser menos invasivo e refletir um perfil genômico melhor de todos os subclones tumorais presentes no paciente, diferente do obtido pela amostra tecidual que é obtida a partir de um único sítio tumoral (CHENG *et al.*, 2016).

Existem inúmeras proteínas que são expressas no plasma em processos inflamatórios. ABE *et al.*, (2004) demonstraram que os níveis plasmáticos de Hsp70 estavam significativamente maiores em pacientes com câncer de próstata em relação ao grupo controle.

Também foram identificados níveis plasmáticos de α -enolase superiores em pacientes com carcinoma de células renais (KANEKO *et al.*, 2013). O fibrinogênio é uma proteína sérica secretada pelos hepatócitos que desempenha um papel central na coagulação (KAMATH & LIP, 2004). Elevados níveis de fibrinogênio estão associados ao desenvolvimento tumoral e às metástases hematogênicas (PALUMBO *et al.*, 2000; SON *et al.*, 2013). Níveis excessivos de fibrinogênio podem atuar como uma barreira física capaz de proteger as células malignas do ataque imune mediado pelas células NK (WANG *et al.*, 2017). Desta forma, níveis elevados de fibrinogênio melhoram a sobrevida das células tumorais em um primeiro momento, protegendo-as do ataque do sistema imune inato (PALUMBO *et al.*, 2005). Diversos estudos já demonstraram que o aumento plasmático dos níveis de fibrinogênio está relacionado com vários tipos de câncer, incluindo câncer colo-rectal,-(YAMASHITA *et al.*, 2009.; TANG *et al.*, 2010.; KAWAI *et al.*, 2011), câncer de pulmão (JONES *et al.*,2006), câncer de pâncreas (GUO *et al.*, 2009), câncer de ovário (POLTERAUER *et al.*, 2009) e câncer gástrico (YAMASHITA *et al.*, 2006).

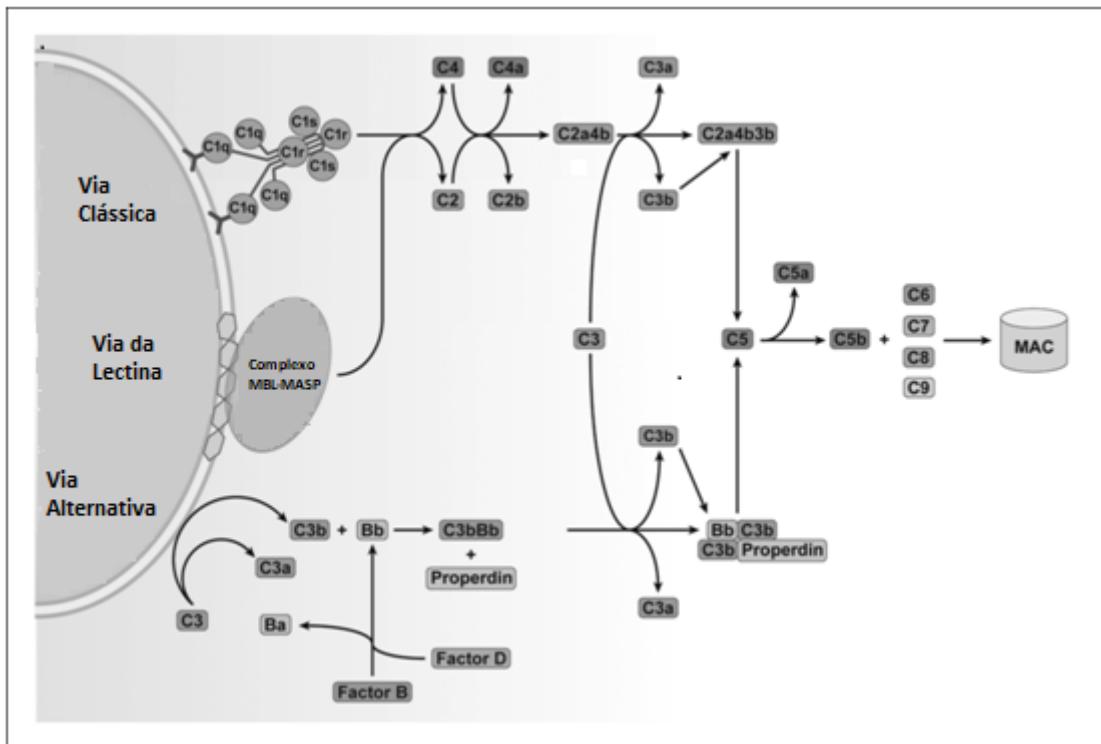
Ye *et al* (2017), avaliando os níveis plasmáticos de C3a e C4, pré e pós operatório, em pacientes com carcinoma gástrico, verificaram que aqueles com depleção dessas proteínas apresentaram uma maior taxa de complicações pós operatória, maior tempo de internação, menor sobrevida global e menor sobrevida livre de doença. Em um estudo de revisão anterior foi sugerido que a ativação do sistema complemento poderia estimular o sistema imune inato contra o câncer através da lise direta das células tumorais ou pela citotoxicidade dependente do sistema complemento (GELDERMAN, *et al.* 2004). Em relação ao câncer de pênis, demonstramos que fragmentos de complemento humano C3 e C4a/b estavam reduzidos no plasma dos pacientes com câncer em relação aos controles. Esta redução seria um potencial biomarcador que poderia ser utilizado de modo preditivo ou prognóstico (ORNELLAS *et al.*, 2012)

1.6 Sistema do Complemento

O sistema complemento é composto por proteínas de membrana plasmática que são solúveis no sangue e que participam das defesas inatas (natural) e adquiridas (memória) do paciente. Essas proteínas reagem entre elas para opsonizar os patógenos e induzir uma série de respostas inflamatórias que auxiliam no combate a microorganismos invasores com a depuração de complexos imunes. O sistema complemento também é importante na eliminação de células

mortas, apoptóticas e tumorais (HAJISHENGALLIS *et al.*, 2017). Inúmeras proteínas do sistema complemento são proteases que se auto-ativam por clivagem proteolítica. Como um componente fundamental da imunidade inata, a cascata do complemento contém algumas das moléculas pró-inflamatórias, incluindo mais notavelmente as anafilatoxinas C3a e C5a (figura 1). A contribuição da cascata do complemento é a inflamação aguda bem estabelecida, assim como a ativação e consumo contínuo de proteínas do complemento em estados inflamatórios crônicos (GUO *et al.*, 2005, KOHL *et al.*, 2001).

Figura 1 – Cascata do sistema complemento



Nota: A cascata do sistema complemento comprehende as vias clássica, alternativa e MBL (lectina ligadora de manose). A via clássica é ativada pela porção Fc da ligação das imunoglobulinas ligadas a antígenos, células apoptóticas, bactérias gram negativas e vírus. O complexo C1, formado por C1q, C1r e subunidades de C1s, iniciam a cascata da via clássica. Após a ligação C1q mediada por um estímulo, C1r catalisa a quebra da ligação de éster de C1s, resultando na ativação e subsequente clivagem de C2 e C4 em seus respectivos fragmentos "a" e "b". A formação de C2a4b cria C3 convertase responsável pela clivagem de C3 em C3a e C3b. O C3b se liga a outras C3 convertases, formando C2a4b3b, também conhecida como C5 convertase. Isto facilita a etapa final da cascata por dividir C5 em C5a e C5b. Este último fragmento é a proteína que se combina com C6, C7, C8 e múltiplas proteínas C9 para formar o MAC (complexo de ataque a membrana responsável pela lise de células e patógenos). A via MBL liga-se a resíduos de manose e outros açúcares, organizados em um padrão, que recobrem superficialmente muitos patógenos. A MBL é uma molécula formada por duas a seis cabeças, semelhante a C1q, que formam um complexo com duas serina proteases a MASP-1 e MASP-2. Quando a MBL é ativada, resulta na clivagem de C2 e C4, com subsequente produção de C3 convertase e ativação da cascata complemento assemelhando-se a via clássica. Por último, a via alternativa é ativada por múltiplos agentes infecciosos incluindo várias bactérias, vírus, fungos e também células neoplásicas. Esta via inicia-se a partir da hidrolise espontânea tiol-éster localizada na cadeia alfa do componente C3, gerando o C3(H₂O). Esta molécula exibe sítios reativos que permite a ligação de uma proteína plasmática, fator B (fB), formando o complexo C3(H₂O)fB. O fB então é clivado por uma enzima denominada fator D (fD). Esta clivagem origina 2 fragmentos Ba e Bb. O fragmento Bb fica ligado a C3(H₂O), gerando oC3(H₂O)Bb, que na presença de íons Mg⁺⁺, tem atividade serino-protease, clivando o C3 em C3a e C3b. Assim como o C3(H₂O), C3b também apresenta sítio de ligação com o fB. Formando o complexo C3bBb, após clivagem do fB em fBb e fBa pelo fD. O C3bBb atua então como C3 convertase, clivando mais moléculas de C3, formando C3bBb3b que cliva C5 em C5a e C5b. Embora as três vias tenham inicialmente diferentes formas de ativação, todas elas comumente clivam C3 em C3a e C3b, resultando na formação terminal do MAC.

Fonte: Extraída e modificada de RUTKOWSKI *et al.*, 2010 .

Postula-se que eventos inflamatórios crônicos estejam relacionados à gênese neoplásica ao passo que processos inflamatórios agudos a combatem (LOVELAND *et al.*, 2008; OSTRAND-ROSENBERG *et al.*, 2008). Durante a evolução de um conjunto de células neoplásicas, neo-antígenos são produzidos. Estes antígenos, produzidos pelas células tumorais diferem dos antígenos das células normais. Com isso, o sistema imunológico é capaz de identificar e eliminar estas células tumorais do organismo (HANAHAN *et al.*, 2000; SMYTH *et al.*, 2001). Embora a maioria das observações *in vivo* sustentem que muitos tumores ativem o sistema do complemento autólogo, é também bem conhecida que a eficácia da citotoxicidade mediada pelo complemento seja prejudicada por vários mecanismos de proteção do tumor (JURIANZ *et al.*, 1999).

Os fragmentos C3, C4a e C4b estão envolvidos na via clássica e na via alternativa do sistema complemento. Estes peptídeos apresentaram-se subexpressos ($p<0,05$) em pacientes com CEP quando comparados com indivíduos saudáveis (ORNELLAS *et al.*, 2012). Neste mesmo estudo, ficou demonstrado também que à medida que a doença progride mais subexpressos ficam os fragmentos de C3 e C4a/b. A degradação do sistema complemento foi também observada em pacientes com câncer de mama (SHEN *et al.*, 2010). No caso de C3, a degradação foi apenas nos fragmentos C3d, C3g, C3 α 1 e C3 β . As convertases C3, peptídeos responsáveis por um papel central no sistema complemento, apresentam diferentes níveis de degradação em pacientes com câncer de mama. Pacientes com câncer apresentam aproximadamente cinco vezes mais peptídeos degradados que indivíduos saudáveis. Em relação ao C4, a degradação foi apenas observada no fragmento C4b e C4 β (SHEN *et al.*, 2010). KOIFMAN *et al.*, (2015) estudando o tecido de pacientes com câncer de pênis detectaram uma subexpressão de C3 do sistema complemento nos pacientes com câncer em relação a população saudável.

A superexpressão de proteínas reguladoras do sistema complemento em células tumorais é uma forma destas células se protegerem do ataque deste sistema de defesa. Acredita-se que CD46, CD55 e CD59 sejam as mais importantes proteínas de membrana reguladoras do sistema complemento, expressas tanto em células normais quanto tumorais. As células tumorais podem também evitar este ataque ligando-se a inibidores do complemento solúveis no soro, tais como o fator H. É também interessante notar que o fator H seja um marcador para o câncer de bexiga, sugerindo uma ligação entre a resistência ao complemento e o escape da vigilância imunológica (FEDARKO *et al.*, 2000). O CD55 foi identificado como um antígeno associado ao câncer. Uma superexpressão de CD55 no tecido tumoral de pacientes com câncer colorretal está correlacionada com uma significativa diminuição na sobrevivência (DURRANT *et al.*,

2003). Além disso, tem sido demonstrado que os níveis de CD46 são inversamente proporcionais aos níveis de C3 depositados no tecido tumoral de pacientes com câncer renal e do colo do útero (BLOK *et al.*, 2000).

Em um estudo de CAMPOS *et al.*, (1998) foi detectada menor atividade das células natural killer (NK) em pacientes com câncer de pênis. As células NK são também parte da resposta imune inata e foram as primeiras a serem identificadas pela sua capacidade em matar células tumorais, sem imunização ou ativação prévias. Elas também são capazes de matar células infectadas por certos vírus e atacar preferencialmente as células que não possuem expressão de抗ígenos do complexo de histocompatibilidade classe I (MHC). Portanto, é evidente a importância da resposta imune inata dos pacientes ao câncer pois a atividade das células natural killer (NK) pode estar reduzida significativamente em pacientes com CEP em relação ao grupo controle (CAMPOS *et al.*, 1998). Apesar da crescente evidência sugerindo que uma variedade de mecanismos responsáveis pela tolerância e repressão relacionada ao tumor, pouco se sabe sobre a ligação cronológica e recíproca entre estes processos. A teoria amplamente aceita da imuno-edição descreve uma evolução estruturada no tempo da relação que ocorre entre o tumor e o sistema imunológico do hospedeiro (DUNN *et al.*, 2002; SMYTH *et al.*, 2006). O mecanismo de escape do tumor em pacientes com câncer parece ser um processo cumulativo que envolve fatores solúveis derivados do tumor, indução de elementos reguladores de várias linhagens de células e diferentes micro ambientes (BRONTE *et al.*, 2006). Em uma análise simplificada, o mecanismo de evasão à atividade imune induzida pelo tumor resulta de duas atividades principais: i) da indução de tolerância do sistema imune aos抗ígenos tumorais; ii) e da supressão funcional dos linfócitos que normalmente combatem o crescimento tumoral (RABINOVICH *et al.*, 2007; ZITVOGEL *et al.*, 2006). Entretanto, outros estudos revelam que proteínas do sistema complemento C3, C4 e C5a possam auxiliar o crescimento tumoral através de imunossupressão (MARKIEWSKI *et al.*, 2008), desregulação das vias de sinalização mitogênicas, proliferação celular sustentada, facilitação da angiogênese, evasão da imuno vigilância e resistência a apoptose (RUTKOWSKI *et al.*, 2010). A deposição de proteínas do sistema complemento, incluindo o complexo do complemento terminal C5b-9, foi demonstrado no câncer de mama (NICULESCU *et al.*, 1992) e no carcinoma papilar de glândula tireóide (YAMAKAWA *et al.*, 1994; LUCAS *et al.*, 1996). A ativação do complemento através da via da lecitina foi demonstrada no carcinoma colorretal (BAATRUP *et al.*, 1994, YTTING *et al.*, 2004). Em pacientes com câncer de ovário, fragmentos do sistema complemento foram detectados em ascites (BJORGE *et al.*, 2005). A ativação do complemento também foi confirmada pela presença de C5a no plasma de pacientes com câncer de pulmão com excessão

dos tumores de pequenas células. Além disso, o valor do C4d como biomarcador prognóstico foi demonstrado para câncer de pulmão (AJONA *et al.*, 2013) e mesotelioma maligno da pleura (KLIKOVITS *et al.*, 2017). Diversos estudos demonstraram a ativação do sistema complemento em diferentes neoplasias (REIS *et al.*, 2018). Entretanto, a via de ativação do complemento que desempenha um papel crucial nos diferentes tipos de câncer ainda não está clara (KOLEV *et al.*, 2018).

Desde a sua descoberta, o sistema do complemento tem sido principalmente considerado como um efetor da imunidade inata com a capacidade de "complementar" a depuração, mediada por anticorpos, de patógenos e a eliminação de células mortas através de processos inflamatórios (RICKLIN *et al.*, 2007). Esta última propriedade é um fator patogênico reconhecido de um amplo espectro de doenças inflamatórias crônicas, incluindo a artrite reumatóide, a glomerulonefrite, a aterosclerose, a asma e a esclerose múltipla. Assim, é evidente que a patogênese mediada pelo sistema complemento seja desencadeada principalmente pela imunidade disfuncional causada tanto pela ausência quanto pela hiperatividade de proteínas do complemento (MARKIEWSKI *et al.*, 2007).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar experimentalmente o C3a como biomarcador em pacientes com carcinoma epidemóide de pênis através de ensaio imunoenzimático comercial.

2.2 Objetivos Específicos

- Comparar os níveis de C3a em pacientes com carcinoma epidermóide de pênis em relação a indivíduos saudáveis.
- Comparar os níveis de C3a em pacientes com carcinoma epidermóide de pênis em relação pacientes com câncer de próstata.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Pacientes e amostras

Esta pesquisa foi aprovada pelos Comitês de Ética do Instituto Nacional de Câncer (# 38/05) e do Hospital Universitário Pedro Ernesto, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (CAAE: 46751515.2.0000.5259), incluindo pacientes dessas instituições e também pacientes do Hospital Mário Kröeff e do Hospital Souza Aguiar. O consentimento informado foi obtido de todos os pacientes e controles entre 2006 e 2017. Foram utilizados neste estudo 104 amostras de plasma humano. O C3a foi avaliado em amostras de plasma de 39 pacientes com CEP (tabela 1), 50 indivíduos saudáveis e 15 pacientes com câncer de próstata (tabela 2), através do ensaio imunoenzimático comercial (ELISA – BD Bioscience OptEIA™ Humano C3a Kit). As amostras de sangue dos pacientes foram coletadas antes dos procedimentos cirúrgicos. Aproximadamente 5 mL de sangue foram coletados usando BD vacutainer com ácido etilenodiamino tetra-acético e aproximadamente 2,5 mL do plasma foram obtidos após centrifugação em 1.500g por 10 minutos dentro de 4 horas após a coleta. O plasma foi imediatamente coletado, aliquotado e, consequentemente, armazenado a - 80°C até a análise.

A idade média foi de 63 anos para pacientes com câncer de pênis e 67 anos para pacientes com câncer de próstata. A idade média dos controles saudáveis foi de 60 anos. Pacientes e controles com infecções ativas ou distúrbios auto-imunes foram excluídos. Nenhum paciente recebeu nenhuma forma de quimioterapia sistêmica ou qualquer outro tratamento neoadjuvante antes da coleta da amostra para o estudo. Os pacientes com CEP foram classificados de acordo com o sistema TNM de 2002 (Tumor, linfonodos e metástase). Dentre todos os 39 casos de CEP incluídos, 6 (15%) eram T1, 19 (48%) eram T2, 11 (28%) eram T3 e 3 (7,6%) eram T4. A distribuição da categoria N revelou 20 (51%) com estágio N0, nenhum N1, 5 (13%) eram N2 e 12 (31%) eram N3. Os 2 pacientes restantes (5%) foram estadiados como NX porque eles recusaram a realizar linfadenectomia. Também estratificamos por estágio sendo o grupo I (T1N0, T1N1 e T2N0-1), II (T1N2, T2N2 e T3N0-2) e III (T1-3N3, T4N0-3 e T4NX). Dos 39 casos, 15 (38%) foram incluídos no grupo I, 10 (25%) no grupo II e 14 (36%) no grupo III. Todos os tumores foram classificados de acordo com o grau histológico pelo sistema Broder. No total, de 10 (25%) pacientes tinham tumores bem diferenciados, 27 (55%) moderadamente diferenciados, e 2 (5%) mal diferenciados.

Em 2006, HUNGERHUBER *et al.*, propuseram uma estratificação por risco baseada em achados de exames clínicos, estadiamento e grau de diferenciação. De acordo com os resultados histopatológicos de 39 pacientes, o grupo de pacientes estratificados por risco foi separado em pacientes de baixo risco (T1G1 e T1G2), de risco intermediário (T2G1, T2G2, T3G1 e T3G2) e tumores de alto risco (T1-3G3 e T4G1-3). A estratificação por risco revelou 6 casos (15%) com baixo risco, 28 (72%) com risco intermediário e 5 (13%) com alto risco.

Os pacientes com câncer de próstata (CP) foram avaliados de acordo com a idade, dosagem sérica de antígeno específico da próstata (PSA), pontuação de Gleason e TNM. As principais características dos pacientes com CEP e CP são apresentadas nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1– Cacterísticas da população de pacientes com CEP

Variável	No. (% ou intervalo)
Idade , média	63 (38-92)
Grau, No. (%)	
Bem Diferenciado	10 (25%)
Moderadamente diferenciado	27 (55%)
Pouco Diferenciado	2 (5%)
Total	39(100%)
TNM: T- tumor; N- nodos; M- metástase	
pT, No. (%)	
pT1	6 (15%)
pT2	19(49%)
pT3	11(28%)
pT4	3(7.6%)
pN, No. (%)	
pN0	20(51%)
pN1	0(0%)
pN2	5(13%)
pN3	12(31%)
pNX (Não avaliado)	2(5%)
M	
M0	39(100%)
M1	0(0%)
Total	39(100%)
Estratificação por risco	
I (T1G1, T1G2)	6(15%)
II (T2G1, T2G2, T3G1 T3G2)	28(72%)
III (T1-3G3 T4G1-3)	5 (13%)
Total	39(100%)
Estratificação por estadiamento	
I (T1N0, T1N1,T2 N0-1)	15(38%)
II (T1N2, T2N2,T3 N0-2)	10(23%)
III (T1-3N3, T4 N0-3, T4NX)	14(36%)
Total	39(100%)

Fonte: O Autor, 2018.

Tabela 2– Cacterísticas da população de pacientes com câncer de próstata

Variável	No. (%)
Idade , media	66 (54-74)
Gleason, mediana	7(6-9)
PSA, media	6.7(0.9-18)
TNM: T- tumor; N- nodos; M- metástase	
Pt	
pT2c	5(33%)
pT3a	9(60%)
pT3c	1(6%)
pN, No. (%)	
pN0	15(100%)
M, No. (%)	
M0	15(100%)
Total	15

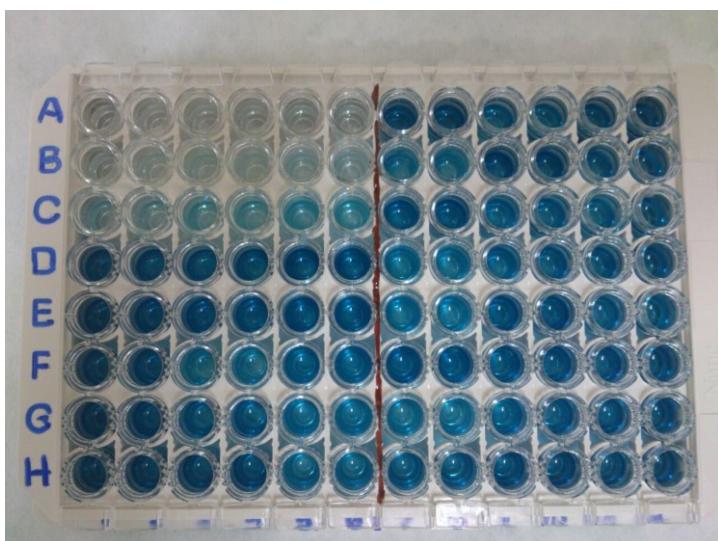
Fonte: O Autor, 2018.

3.2 Ensaio imunoenzimático

O ensaio imunoenzimático comercial (ELISA – BD Bioscience OptEIA™ Humano C3a Kit) é um teste sanduíche de fase sólida que é usado para a determinação quantitativa *in vitro* de C3a no plasma humano com EDTA, soro e outras amostras biológicas. Ele utiliza um anticorpo monoclonal C3a específico para humanos, revestido numa placa de 96 poços. Os padrões e as amostras são adicionados aos poços e qualquer amostra que contenha C3a liga-se ao anticorpo immobilizado. Os poços são lavados e uma mistura de anticorpo biotinilado anti-humano de C3a e de estreptavidina-peroxidase policlonal é adicionado, produzindo um "sanduíche"anticorpo-antígeno-anticorpo. Os poços são novamente lavados e uma solução de substrato é adicionada, o que produz uma cor azul (figura 2) em proporção direta a quantidade de C3a presente em cada amostra inicial. A solução de parada/interrupção da reação muda a cor

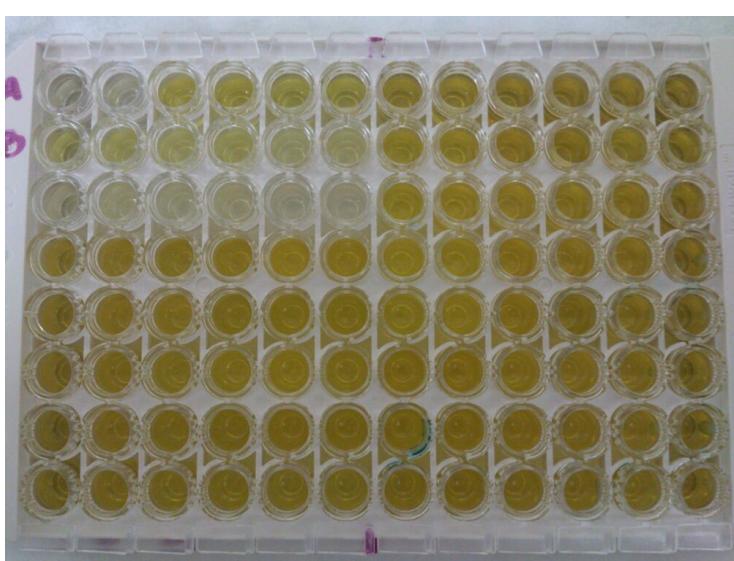
de azul para amarelo, e a absobância da reação deve ser lida em espectrofotometro no comprimento de onda 450 nm (figura 3).

Figura 2 – Placa de ELISA com solução de parada



Fonte: O Autor, 2018.

Figura 3 – Placa de ELISA com substrato que cora amostras com C3a



Fonte: O Autor, 2018.

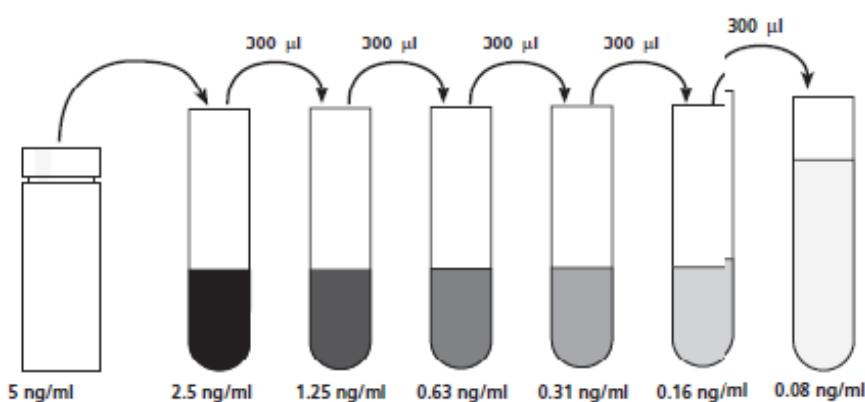
Preparação do reagente:

Todos os reagentes e as amostras diluídas foram mantidas a temperatura ambiente (18 - 25°C) antes de começar o experimento. Todos os padrões e as amostras foram testadas em duplicada. Uma curva padrão foi realizada para cada ensaio.

1. Preparação do padrão:

- O frasco padrão liofilizado foi reconstituído com volume necessário de diluente padrão (informado pelo fabricante) para preparar um padrão de estoque 5 ng/mL.
- Foi adicionado 300 uL de diluente padrão (Diluent - F) para 6 tubos. Estes 6 tubos foram etiquetados de 2,5 ng/mL, 1,25 ng/mL, 0,63 ng/mL, 0,31 ng/mL, 0,16 ng/mL, e 0,08 ng/mL seguindo o esquema apresentado na figura 4.

Figura 4 – Distribuição do diluente padrão



Fonte: ELISA – BD Bioscience OptEIA™ Humano C3a Kit

- Foram realizadas diluições em série, adicionando 300 uL de cada padrão para o próximo tubo e agitados em vortex entre cada transferência (figura 3). O padrão não diluído, só reconstituído (5 ng/mL), serve como o padrão elevado/mais alto.

Tampão de Lavagem:

- Foi diluída a quantidade necessária do tampão de lavagem 20X (wash - G) com água destilada e homogeneizada. Foi preparado 1L, adicionando 50 mL do tampão de lavagem concentrado 20x, a 950 mL de água destilada. Pelo menos 500 mL de solução deve estar preparada para uma placa de 96 poços completa.

Reagente Substrato TMB (H):

Não mais do que 15 minutos antes do uso, foi adicionado volume necessário do reagente substrato TMB One-Step (informado pelo fabricante) para um tubo limpo. Para evitar a contaminação, foi pipetado para fora do tubo/reservatório, em vez de diretamente do frasco.

Procedimento de Ensaio:

1. Foi pipetado 50 uL do diluente de ELISA (em todos os poços da placa).
2. Foi pipetado 100 uL de cada diluição do padrão (já preparado) e das amostras a serem testadas nos seus respectivos poços, seguindo o desenho pré-elaborado para o experimento.
- Obs:** Uma diluição inicial de 1:500, com Padrão/Diluente de Amostra , das amostras de plasma humano (com EDTA) a serem testadas é recomendado.
3. A placa foi agitada por 5 segundos para misturar. Os poços foram cobertos com uma tampa de placa e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente.

Preparação do anticorpo de detecção (detector do ensaio):

- a) Por um tempo de 15 minutos antes do uso, foi pipetado o volume de anticorpo de detecção para um tubo limpo ou frasco.
- b) Foi adicionada a quantidade necessária do concentrado de enzima (250X - D), em seguida agitada no vortex para misturar bem. Para um total de placa de 96 poços, foram adicionados 48 uL de concentrado de enzima (250X - D) em 12 mL de anticorpo de detecção.
4. O conteúdo dos poços foram descartados. Os poços foram lavados com pelo menos 300 mL/tampão de lavagem (G) anteriormente preparado (ver acima) e, em seguida, o conteúdo dos poços foram descartados. Esse procedimento foi repetido 4 vezes, em um total de 5 lavagens. Após a última lavagem, verter a placa batendo em papel absorvente para remover qualquer tampão residual. A remoção completa do líquido é necessária para o desempenho adequado.
5. 100 uL do detector do ensaio foi adicionado preparado no máximo 15 minutos antes, em cada poço. A placa foi agitada por 5 segundos para misturar bem. Os poços foram cobertos com vedante de placa e também com papel alumínio (protegendo da luz) e incubados durante 1 hora à temperatura ambiente.
6. Etapa Final de Lavagem: O conteúdo dos poços foi descartado. Os poços foram lavados com pelo menos 300mL/tampão de lavagem e, em seguida, o conteúdo dos poços descartado. A lavagem foi repetida 6 vezes, em um total de 7 lavagens. Após a última lavagem, a placa foi

vertida batendo em papel absorvente para remover qualquer tampão residual. A remoção completa do líquido é necessária para o desempenho adequado.

7. O volume de 100 uL de reagente substrato TMB One-Step foi adicionado em cada poço. A placa foi agitada por 5 segundos para misturar bem. A placa foi incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente no escuro.
8. O volume de 50 uL de solução de parada (STOP SOLUTION) foi adicionada em cada poço. A placa foi agitada por 5 segundos para misturar bem.
9. A absorbância foi lida em um leitor de ELISA sob comprimento de onda de 450 nm. A placa foi lida em no máximo 30 minutos após parar a reação.

3.3 Análise estatística

Para a avaliação de diferenças entre os tipos de câncer e a variável C3a dos pacientes pesquisados, foram utilizados testes não paramétricos, pois a suposição de normalidade para essas variáveis foi violada. Como a comparação possui somente duas categorias, foi adotado o teste não paramétrico de *Mann-Whitney*, para a comparação das medianas entre os grupos. Os dois pacientes com CEP pouco diferenciado foram agrupados com o grupo pacientes moderadamente diferenciados para fins estatísticos.

Os dados da pesquisa foram tratados no programa estatístico *Predictive Analytics Software* (PASW 18). Em todos os testes estatísticos utilizados, foi considerado um nível de significância de 5%. Dessa forma, são consideradas associações estatisticamente significativas aquelas cujo valor p foi inferior a 0,05.

4 RESULTADOS

Nossos resultados mostraram que os níveis plasmáticos de C3a (ng/mL) do grupo controle, com indivíduos saudáveis, apresentaram diferença estatisticamente significativa pelo teste de Mann-Whitney em comparação com os níveis plasmáticos nos pacientes com CEP. Quando estes pacientes foram estratificados em 3 grupos de estádios, as concentrações de C3a também mostraram diferença significativa em relação ao grupo controle (Tabela 3). O grupo controle apresentou maior concentração mediana de proteína (11,93 ng/mL) do que os pacientes com CEP nos grupos estratificados nos 3 estágios (2,63, 3,04, e 2,69, respectivamente). Embora a comparação entre controles saudáveis e pacientes com CEP tenha sido estatisticamente significativa neste ensaio, não correlacionamos nossos resultados para distinguir os pacientes com CEP nos diferentes estadiamentos. A Tabela 4 mostra que a concentração plasmática de C3a (ng/mL) também é menor em relação aos controles em pacientes com CEP após estratificação pelos 3 grupos de risco diferentes. Independentemente se fosse de alto risco ou de baixo risco, a concentração plasmática de C3a revelou-se baixa em pacientes com CEP. Entretanto neste ensaio, não conseguimos diferenciar significativamente os pacientes com CEP nos diferentes grupos de risco.

Nossos resultados mostraram uma significante menor concentração plasmática de C3a em pacientes com CP quando os comparamos com indivíduos saudáveis ($P < 0,001$). Os níveis de C3a também foram显著mente menores em pacientes com CEP quando comparados com o grupo de pacientes com CP ($P = 0,003$) (Tabela 5).

Tabela 3 – Comparação dos níveis de C3a (ng/mL) entre controles e pacientes com CEP estratificados por estágios

Grupo	Concentração de C3a (ng/mL)				
	N	Média	D.P	Mediana	P-valor
Controles	50	11.43	4.63	11.93	< 0,001
CEP total	39	3.71	2.22	2.68	
CEP estágio 1	15	3.76	2.46	2.63	< 0,001
CEP estágio 2	10	4.10	2.55	3.04	< 0,001
CEP estágio 3	14	3.38	1.77	2.69	< 0,001

Legenda: - As probabilidades de significância (p-valor) referem-se ao teste de Mann-Whitney

- Os valores de p-valor em negrito indicam diferenças significativas.
- Os resultados significativos foram identificados com asteriscos, de acordo com o nível de significância, a saber: p-valor < 0.01 ** (nível de confiança de 99%) e p-valor < 0.05 * (nível de confiança de 95%)
- CEP: câncer epidermóide de pênis; D.P: desvio padrão

Fonte: O Autor, 2018.

Tabela 4 – Comparação dos níveis de C3a (ng/mL) entre controles e pacientes com CEP estratificados por risco

Grupo	Concentração de C3a (ng/mL)				
	N	Média	D.P	Mediana	P-valor
Controles	50	11.43	4.63	11.93	< 0,001
CEP total	39	3.71	2.22	2.68	
CEP risco 1	6	3.66	2.37	2.50	0,001
CEP risco 2	28	3.77	2.33	2.65	< 0,001
CEP risco 3	5	3.44	1.67	2.75	0,002

Legenda: - As probabilidades de significância (p-valor) referem-se ao teste de Mann-Whitney

- Os valores de p-valor em negrito indicam diferenças significativas.
- Os resultados significativos foram identificados com asteriscos, de acordo com o nível de significância, a saber: p-valor < 0.01 ** (nível de confiança de 99%) e p-valor < 0.05 * (nível de confiança de 95%)
- CEP: câncer epidermóide de pênis; D.P: desvio padrão

Fonte: O Autor, 2018.

Tabela 5 – Comparaçao dos níveis de C3a (ng/mL) entre controles e pacientes com CP, e CP vs. CEP

Grupo	Concentração de C3a (ng/mL)				
	N	Média	D.P	Mediana	P-valor
Controles	50	11.43	4.63	11.93	< 0,001
CP	15	5.46	2.57	6.73	
CP	15	5.46	2.57	6.73	0,003
CEP	39	3.71	2.22	2.68	

Legenda: - As probabilidades de significância (p-valor) referem-se ao teste de Mann-Whitney

- Os valores de p-valor em negrito indicam diferenças significativas.

- Os resultados significativos foram identificados com asteriscos, de acordo com o nível de significância, a saber: p-valor < 0.01** (nível de confiança de 99%) e p-valor < 0.05 * (nível de confiança de 95%)

- CEP: câncer epidermóide de pênis; CP: câncer de próstata; D.P: desvio padrão

Fonte: O Autor, 2018.

5 DISCUSSÃO

A relação entre o câncer e a inflamação foi a primeiramente proposta por Rudolf Virchow no século XIX (GRIVENNIKOV *et al.*, 2010). Virchow observou que a inflamação de longo prazo estabelecia um ambiente que favorecia o crescimento de células malignas (BALKWILL *et al.*, 2001). O sistema complemento exerce uma parte central na imunidade inata pois serve como primeira linha de defesa contra microorganismos externos e células do próprio organismo alteradas (RICKLIN *et al.*, 2010). O sistema complemento é composto de proteínas plasmáticas produzidas principalmente pelo fígado ou por proteínas de membrana expressas na superfície celular. (KOLEV *et al.*, 2010)

As proteínas do sistema complemento desempenham um papel duplo no microambiente tumoral. A presença de produtos da divisão do complemento, tais como C1q, C3, C3a, C4, C5, e o MAC (complexo de ataque a membrana) é uma característica proeminente do estado inflamatório no microambiente tumoral (NICULESCU *et al.*, 1992). Classicamente, as proteínas do sistema complemento desempenham um papel importante na defesa contra o câncer através de sua citotoxicidade direta e indireta mediada por anticorpos (GELDERMAN, 2004). Infelizmente, as células neoplásicas expressam uma ampla variedade de defesas contra o ataque mediado pelo complemento. Proteínas reguladoras ligadas à membrana e inibidores do complemento, incluindo CD21, CD35, CD46, dificultam o poder citotóxico do sistema complemento (FISHELSON, 2003). Na interação entre as proteínas do sistema complemento e as células neoplásicas, a evasão tumoral é parcialmente facilitada pela neutralização do ataque do complemento. Isto ressalta os papéis opostos do complemento na carcinogênese. Evidências sugerem que uma melhoria das propriedades líticas das proteínas do complemento, como o MAC seria uma terapia eficaz contra o câncer (GELDERMAN, 2004). Ao mesmo tempo, as proteínas do sistema complemento, tais como C3a, apresentaram propriedades anti-inflamatórias que impediriam a amplificação subsequente de produtos do complemento necessários para a citotoxicidade. Além disso, estudos sugerem que o sistema complemento desempenha papéis antagônicos na promoção da angiogênese. Em pacientes com degeneração macular relacionada com a idade tem-se demonstrado um papel crucial do complemento no desenvolvimento da doença. Nesta doença, ocorre um processo conhecido como neovascularização da coroide onde uma angiogênese exacerbada desta estrutura promove uma invasão vascular para a retina. Proteínas como o C3 e C5 parecem ter um papel angiogênico nestes casos (NOZAKI M *et al.*, 2006). Por outro lado, em estudos com ratos com retinopatia

prematura e disfunções placentárias foi demonstrado que proteínas do complemento podem inibir a angiogênese (GIRARDI G *et al.*, 2006).

Ultimamente, inúmeros estudos tem explorado o papel de terapias mediadas por proteínas do complemento no combate ao câncer. Existe um interesse particular no desenvolvimento de anticorpos monoclonais contra inibidores solúveis ligados à membrana de proteínas do sistema complemento expressos por vários tumores. Esta estratégia visa melhorar a citotoxicidade antitumoral mediada pelo complemento e por anticorpos. Apesar de alguns estudos com resultados promissores, (GELDERMAN *et al.*, 2002) esta estratégia ignora o fato do sistema complemento também promover, em certas ocasiões, a progressão e o desenvolvimento neoplásico. Aparentemente, o sistema complemento deve ser rigorosamente regulado para manter a homeostase do organismo (HAJISHENGALLIS *et al.*, 2017). Diante do complexo cenário atual, existe a demanda de mais estudos sobre a interação do sistema complemento com o câncer.

O CEP se dissemina predominantemente por difusão pelos canais linfáticos para linfonodos inguinais superficiais e profundos e subsequentemente para os linfonodos pélvicos. Vinte e cinco por cento dos pacientes com CEP apresentam acometimento de cadeia linfonodal inguinal no momento do diagnóstico. O exame físico não é um preditor confiável do comprometimento linfonodal (ORNELLAS *et al.*, 2008) pois pacientes com linfonodos palpáveis podem não apresentar metástases. O método de avaliação dos linfonodos inguinais permanece controverso sendo difícil à diferenciação entre linfadenomegalia inflamatória reacional e metastática. Portanto o método mais confiável para a avaliação dos linfonodos é a linfadenectomia. Porém a linfadenectomia inguinal e/ou pélvica não é uma técnica cirúrgica isenta de complicações. Historicamente, a linfadenectomia tem sido associada com altas taxas de complicações (BEVAN-THOMAS *et al.*, 2002). Séries cirúrgicas mais contemporâneas mostram uma taxa global de complicações que podem variar entre 10,3% e 57% para os pacientes submetidos a esse procedimento como parte do tratamento do CEP (Tabela 6).

Tabela 6 – Complicações operatórias associadas à linfadenectomia inguinal segundo várias séries publicadas na literatura mundial

Estudo	Ano	# Pcs	Taxa de complicações (%)	Infecção (%)	deiscência + necrose (%)	Linfocele (%)	Linfedema (%)
Johnson et al.	1984	67	82	14	50	9	50
Ornellas et al.*	1991	44	–	15	5	9	16
Ravi Kamat et al.	1993	112	–	–	25	9	16
Lopes et al.	1993	31	87	–	–	–	–
Darai et al.	1996	145	–	–	18	–	30
Ayyappan et al.	1988	85	–	12	14	3	32 (severa)
Coblentz et al.	1994	78	–	70	36	87	57 (severa)
Bevan-Thomas et al	2002	22	45	9	9	27.2	0
Nelson et al.	2002	53	57	10	8 (necrose)	–	23
Spiess et al.	2004	22	–	7.5 (menor)	2.5 (necrose)	15	15
Koifman et al.*	2008	43	49	9	11	2	17
Koifman et al.*	2013	170	10.3	0.9	1.5 (necrose)	2	4.1

número de pacientes

* Incisão de Gibson

Fonte: Koifman, L; 2013

A presença de invasão linfonodal é o maior fator prognóstico para a sobrevida de pacientes portadores de CEP. Além do acometimento linfonodal outros fatores prognósticos são: a espessura tumoral, o grau de diferenciação, o tipo histológico, a presença de embolização linfovascular, a presença de coilocitose e o estágio da doença (SORIA, 1997; LOPES, 2002; ORNELLAS, 2008). Como atualmente não existem métodos não-invasivos satisfatórios para avaliar o comprometimento metastático dos linfonodos a linfadenectomia está indicada para o tratamento e profilaxia do câncer de pênis. As indicações dependem da existência de adenopatias inguinais palpáveis e do estádio do tumor peniano. Pacientes com linfonodos negativos ao exame físico e que apresentam micrometástases só terão confirmação do diagnóstico pelo exame histopatológico das peças cirúrgicas obtidas pela linfadenectomia.

Além disso, existe grande controvérsia a respeito do momento no qual a linfadenectomia deva ser indicada, a respeito da extensão da linfadenectomia e do tipo de intervenção cirúrgica que varia conforme a experiência dos diversos grupos envolvidos no tratamento desses pacientes. Os pacientes com linfadenectomia negativa precoce apresentam uma maior sobrevida em cinco anos que os submetidos à linfadenectomia precoce positiva. A taxa de sobrevida para os primeiros é de 87% contra 29% para os segundos. Portanto, embora a presença de metástases para linfonodos inguinais tenha resultado em um pior prognóstico, a linfadenectomia está associada a sobrevida a longo prazo e a cura potencial de 29% a 60% dos pacientes (ORNELLAS, 1994, McDUGAL, 1986; HORENBLAS e van TINTEREN, 1994). Além disso, a ressecção imediata de metástases clinicamente ocultas é associada a uma sobrevida melhorada quando comparada com a ressecção retardada de linfonodos positivos (KROON, 2005). Quando comparamos os resultados de linfadenectomias positivas, encontramos uma taxa de sobrevida no caso de linfadenectomia precoce após dois e cinco anos de 29% contra respectivamente 14 e 0% no caso das linfadenectomias tardias (ORNELLAS, 1993, ORNELLAS, 1994). Se o tumor se espalhou para os linfonodos pélvicos, a sobrevida a longo prazo é inferior a 10%. Entretanto, CAMPBELL *et al.* (2017), recentemente, avaliaram que apenas 63 % de pacientes com CEP em estadios N1 e N2 foram submetidos a linfadenectomia nos EUA. Isto mostra uma disparidade entre o que é recomendado pelos *guidelines* e o manejo clínico desses pacientes. Ao mesmo tempo, MATULEWICZ *et al.*, avaliaram que apenas 4,1 % dos urologistas nos EUA realizaram cirurgias penianas e linfadenectomia especificamente para pacientes com CEP. Esses dados sugerem uma maior centralização dos pacientes com esta enfermidade devido a sua raridade nos EUA. Desse modo, para otimizar o tratamento multidisciplinar do câncer de pênis avançado é importante referenciar esses pacientes para grandes centros habituados a tratar esta patologia. (SHREYAS *et al.*, 2018).

Nosso grupo (KOIFMAN *et al.*, 2015) identificou um grande número de proteínas em peças cirúrgicas de pacientes com câncer de pênis e também no grupo controle composto por pacientes sem câncer submetidos à circuncisão. Algumas dessas proteínas, encontradas no grupo de câncer de pênis, também estão diretamente envolvidas no desenvolvimento de outros tipos de câncer. Notavelmente, este trabalho reforça que a proteína do complemento C3 seja uma candidata de biomarcador forte para avaliação de pacientes CEP. Estudando o tecido de pacientes com câncer de pênis detectamos uma subexpressão de C3 do sistema complemento nos pacientes com câncer em relação a população saudável. Uma possível explicação para estes resultados encontra-se na hipótese de que os pacientes com neoplasias têm uma pior resposta imunológica. Além disso, neste estudo todos os pacientes com câncer eram HPV positivos e

isso poderia explicar a ausência de complemento C3 já que as proteínas virais poderiam neutralizar a resposta imunológica (CAMPO *et al.*, 2010).

A baixa concentração de C3a poderia servir como um biomarcador de novas terapias que estão emergindo como terapias de alvo molecular e a imunoterapia, ou pelo menos os tratamentos contra o câncer, devem levar em consideração a baixa imunidade desses pacientes. A concentração de C3a é provavelmente uma consequência de baixa imunidade nesses pacientes. Agora é possível medir um número enorme de biomarcadores, mas cada um deve ser investigado o suficiente para definir suas características operacionais para diagnóstico ou prognóstico. Em última análise, definições claras e o melhor acesso público à informação permitirá a apropriada avaliação de biomarcadores de modo a reduzir ou eliminar esforços redundantes para focar a atenção em pesquisas capazes de responder à questões críticas (ROBB *et al.*, 2016).

A maior parte dos marcadores estudados em pacientes com CEP requer procedimentos invasivos para obtenção do tecido tumoral. Existe, portanto, a necessidade de se encontrar através de uma técnica pouco invasiva marcadores tumorais circulantes capazes de diferenciar portadores de CEP com e sem envolvimento metastático. Em nosso estudo anterior, nós demonstramos a subexpressão de C3 e C4a/b no plasma dos pacientes com CEP quando comparado com indivíduos saudáveis (ORNELLAS *et al.*, 2012). Os pacientes com doença mais agressiva apresentaram níveis mais baixos de C3 e C4a/b. No presente estudo, validamos experimentalmente a subexpressão de C3a no plasma de pacientes com CEP em relação aos controles usando um kit de ELISA comercial. Os pacientes com CEP também foram separados de acordo com o risco. No entanto, em nossa análise, não havia diferença entre os pacientes com CEP e doença mais agressiva e aqueles com doença mais leve. Embora a concentração média de C3a seja inferior em pacientes com doença mais avançada, esses resultados não foram estatisticamente significativos. A intenção deste estudo foi validar nossos resultados anteriores. Possivelmente após novos estudos com um maior número de amostras de pacientes com câncer de pênis em vários estágios, o objetivo de diferenciar os pacientes de acordo com o estágio poderia ser alcançado. Embora os biomarcadores tenham que ser preditivos ou prognósticos ou ambos, tendemos a acreditar que, no futuro, a baixa expressão de C3a pode ser usada como um marcador útil para câncer de pênis e talvez para outros tipos de câncer. A validação de nossos resultados anteriores por um kit comercial foi um primeiro passo necessário antes de novos estudos. No futuro, haverá uma necessidade de um estudo prospectivo maior para testar se existe uma correlação entre carga tumoral, envolvimento linfático e doença metastática com a baixa expressão do fragmento C3a. Caso isso aconteça, a baixa expressão de C3a será

importante para monitorar o controle do tratamento e a detecção precoce de recorrência após o tratamento.

Em nosso estudo anterior (ORNELLAS *et al*, 2012), percebemos que a combinação de fragmentos C3 e C4a/b foi capaz de discriminar pacientes com diferentes estágios de câncer. Este estudo sugere que o C3 seja um marcador da presença do CEP, e ele sozinho não permitiu distinguir as diferentes condições clínicas. No entanto, foi possível confirmar a expressão descendente de C3a no plasma de pacientes com CEP e também no CP. De fato, C3a estava subexpresso em pacientes com câncer de pênis e CP quando comparado com pacientes saudáveis ($P < 0,001$ em ambos os casos). Além disso, os níveis de C3a foram significativamente menores em indivíduos com CEP ($P = 0,003$), quando comparados com os níveis em pacientes que apresentaram CP inicial, tornando o C3a um biomarcador promissor. A supressão da C3a talvez seja importante em outros tipos de câncer, e esta hipótese merece ser testada em estudos futuros. Pacientes com CP não foram incluídos para validar os resultados de pacientes com câncer de pênis, mas porque estávamos curiosos para saber se uma menor expressão de C3a ocorreria em outro tipo de câncer urológico. A diminuição dos níveis de C3a nas amostras de plasma do pacientes CP acabou por demonstrar que nessas amostras também havia subexpressão de C3a. Isso pode ser devido ao câncer, ou o câncer pode ser uma consequência de um sistema imunológico debilitado. Já ficou claro durante anos que o sistema imunológico é subexpresso em pacientes com câncer. No entanto, nossos resultados abrem a possibilidade de tratamentos imunológicos, isto é, que tenham como objetivo ativar o sistema imunológico em pacientes com CEP.

Uma função importante do sistema imunológico é sua capacidade de distinguir as células normais das anormais do organismo. Isso permite que o sistema imunológico ataque as células estranhas, deixando as células normais livres. Para fazer isso, ele usa os pontos de controle (checkpoints) que são moléculas em certas células do sistema imunológico que precisam ser ativadas (ou inativadas) para iniciar uma resposta imune. As células tumorais também podem atuar nos pontos de controle imunológico para inibir o sistema imune. Essas proteínas ajudam a manter as respostas imunes sob controle e podem impedir que as células T matem as células cancerígenas. Quando essas proteínas são bloqueadas, os "freios" no sistema imunológico são liberados e as células T são capazes de atacar as células cancerígenas. Existem diversas drogas que atuam inibindo os pontos de controle imunológicos. As principais atuam sobre a PD-1, PD-L1 e a CTLA-4 que são proteínas ponto de controle imunológico que atuam inibindo o ataque das células T sobre as células tumorais (American Cancer Society). Nos últimos 3 anos houve um "tsunami" de publicações sobre drogas inibidoras de pontos de

controle imunológico. Estas potentes drogas anti- câncer mostraram resultados notáveis no manejo de diferentes neoplasias. Elas foram aprovadas como drogas inibidoras de pontos de controle imunológico para melanoma, câncer de pulmão que não é composto por células pequenas, câncer de bexiga, carcinoma escamoso de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais e linfoma de Hodgkin (KOURIE *et al.*, 2017).

Em relação ao câncer de pênis, devido a ausência de terapias eficientes para o tratamento de pacientes com doença metastática, esta rara doença parece ser um campo promissor para testar essas novas drogas. Existem ensaios clínicos promissores, em andamento, no tratamento desses pacientes (EID *et al.*, 2018).

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

- Nossos estudos comprovaram que pacientes com CEP apresentam subexpressão plasmática de C3. O C3a mostrou ser experimentalmente um potencial biomarcador plasmático do CEP.
- Os níveis de C3a também foram significativamente menores em pacientes com câncer de próstata, mostrando que o C3a pode ser um biomarcador promissor para outros tipos de câncer.
- A diminuição dos níveis de C3a pode não estar relacionada apenas a pacientes com CEP, mas a um comprometimento generalizado da imunidade.
- Mais estudos serão necessários para validar a associação entre os nossos achados com o estágio clínico do câncer de pênis e a sobrevida dos pacientes.

REFERÊNCIAS

- Abe, M. et al. Plasma levels of heat shock protein 70 in patients with prostate cancer: a potential biomarker for prostate cancer. *Clin Prostate Cancer.* 2004;3(1):49-53
- Abi-Aad, A.S.; Dekernion J.B. Controversies in ilioinguinal lymphadenectomy for cancer of the penis. *Urol Clin North Am.,* 1992; 19: 319-24.
- Afonso LA, Carestiato FN, Ornellas AA, Ornellas P, Rocha WM, Cordeiro TI, Lisboa DC, Alves GB, Cavalcanti SMB. Human papillomavirus, Epstein-Barr virus, and methylation status of p16ink4a in penile cancer. *J Med Virol.* 2017;89(10):1837-1843
- Aghdassi, A. et al: Heat shock protein 70 increases tumorigenicity and inhibits apoptosis in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2007; 67(2): 616-25.
- Ajona, D. et al., Investigation of complement activation product c4d as a diagnostic and prognostic biomarker for lung cancer, *J. Natl. Cancer Inst.* 105 (18) (2013) 1385–1393.
- Almeida, Jrc. et al: Marcadores Tumorais: Revisão de Literatura. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2007; 53(3): 305-316
- American Cancer Society. Immune checkpoint inhibitors to treat cancer . 2015. *Disponível em:* <<https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/immunotherapy/immune-checkpoint-inhibitors.html>>. *Acesso em:* 16 set. 2018
- Araldi, Rp et al. Papillomaviruses: a systematic review. *Genet Mol Biol.* 2017; 40(1):1-21.
- Anderson, N.L. And Anderson, N.G. The human plasma proteome: History, character, and diagnostic prospects. *Molecular and Cellular Proteomics,* 2002; 1(11):845-67.
- Baatrup G., et al., Activity and activation of the complement system in patients being operated on for cancer of the colon, *Eur. J. Surg.* 160 (9) (1994) 503–510.
- Bevan-Thomas, R.; Slaton, J.W.; Pettaway, C.A. Contemporary morbidity from lymphadenectomy for penile squamous cell carcinoma: the M.D. Anderson Cancer Center Experience. *J Urol.* 2002; 167: 1638-42.
- Bezerra A.I.R, Lopez A, Santiago GA, Ribeiro KCB, Latorre MRDO, VillaLL. Human papillomavirus as a prognostic factor in carcinoma of the penis. *Cancer.* 2001;91:2315–21.
- Bjorge L., et al., Ascitic complement system in ovarian cancer, *Br. J. Cancer* 92 (5) (2005) 895–905.
- Bocard, E.; Villa, L.L. Vírus e Câncer, capítulo 13; em Oncologia Molecular; Carlos Gil Ferreira e José Cláudio Casali da Rocha (editores), Rio de Janeiro: Atheneu; ed. 2,; p. 183-4, 2010.

Müller-Coan, BG et al. Cancer Progression Goes Viral: The Role of Oncoviruses in Aggressiveness of Malignancies Trends in Cancer , Volume 4 , Issue 7 , 485 – 498, 2018

Balkwill F, Mantovani. Inflammation and cancer:back to Virchow? Lancet 2001;357:539–45.

Bogaards JA et al. Direct benefit of vaccinating boys along with girls against oncogenic human papillomavirus: bayesian evidence synthesis. BMJ. 2015;350:h2016.

Bronte, V. et al. Leukocyte infiltration in cancer creates an unfavorable environment for antitumor immune responses: a novel target for therapeutic intervention. Immunol Invest. 2006;35(3-4):327-57

Cai, Y. et al. Frequent heterogeneous missense mutations of GGAP2 in prostate cancer: implications for tumor biology, clonality and mutation analysis. PLoS One 2012; 7:e32708.

Capelozzi VL. Entendendo o papel de marcadores biológicos no câncer de pulmão. J Pneumol. 2001;27(6):321-28.

Campbell RA, Slopnick EA, Ferry EK, Zhu H, Kim SP, Abouassaly R. Disparity between pre-existing management of penile cancer and NCCN guidelines. *Urol Oncol*. 2017;35(8):531.e9-531.e14. 9.

Campo, MS. et al. HPV-16 E5 down-regulates expression of surface HLA class I and reduces recognition by CD8 T cells. *Virology* 2010; 407, 137-142.

Campos, M.M. et al. Clinical implications of natural killer cytotoxicity in patients with squamous cell carcinoma of the penis. *Nat Immun.*, 1998; 6: 256-62.

Cheng F, Su L, Qian C. Circulating tumor DNA: a promising biomarker in the liquid biopsy of cancer. *Oncotarget*. 2016;7:48832–41.

Cubilla, A.L., Velazques EF, Reuter VE, Oliva E, Mihm MC, Jr, Young RH. Warty (condylomatous) squamous cell carcinoma of the penis: a report of 11 cases and proposed classification of ‘verruciform’ penile tumors. *Am J Surg Pathol*. 2000;24:505–512.

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

Di Meo et al. Liquid biopsy: a step forward towards precision medicine in urologic malignancies. *Molecular Cancer* (2017) 16:80 DOI 10.1186/s12943-017-0644-5.

Dougawi, A e Masterson, T A. Updates on the epidemiology and risk factors for penile cancer. *Transl Androl Urol* 2017;6(5):785-90.

Drolet M et al. Population-level impact and herd effects following human papillomavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2015;15:565-80.

- Dunn, G.P. et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* 2002; 3: 991-8.,
- Durrant, LG. et al. Enhanced expression of the complement regulatory protein CD55 predicts a poor prognosis in colorectal cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2003; 52: 638-42.
- Eid R. et al. Do checkpoint inhibitors provide new hope for management of metastatic penile carcinoma? *Future Oncol.* (2018) 14(8), 677–680
- Favorito, LA. *et al.* Epidemiologic study on penile cancer in Brazil. *Int Braz J Urol* 2008;34:587-91; discussion 591-3. 8.
- Fedarko, N.S. et al. Factor H binding to bone sialoprotein and osteopontin enables tumor cell evasion of complement-mediated attack. *J Biol Chem.* 2000; 275: 16666-72.
- Fishelson Z, et al . Obstacles to câncer immuno- therapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors.*Mol Immunol* 2003;40:109–23
- Fraley, E. E.; Zhang, Z. F.; Manivel, C. et al. The role of ilioinguinal lymphadenectomy and significance of histological differentiation in treatment of carcinoma of the penis. *J Urol* 1989; 142: 1478-82.
- Gelderman KA, et al. Enhancement of the complement activating capacity of 17-1A mAb to overcome the effect of membrane-bound complement regulatory proteins on colorectal carcinoma. *Eur J Immunol* 2002;32: 128–35.
- Gelderman KA, et al.Complement function in mAb-mediated cancer immunotherapy. *Trends Immunol* 2004;25: 158–64.
- Girardi G. et al. Complement activation induces dysregulation of angiogenic factors and causes fetal rejection and growth restriction. *J Exp Med* 2006; 203:2165–75.
- Giuliano AR, Viscidi R, Torres BN, Ingles DJ, Sudenga SL, Villa LL, et al. Seroconversion Following Anal and Genital HPV Infection in Men: The HIM Study. *Papillomavirus Res.* 2015;1:109-115.
- Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010;140:883-99.
- Guo, RF.; Ward PA. Role of C5a in inflammatory responses. *Annu Rev Immunol.* 2005; 23: 821–52.
- Guo Q. et al. Elevated levels of plasma fibrinogen in patients with pancreatic cancer: possible role of a distant metastasis predictor. *Pancreas.* 2009; 38:e75-e79.
- Gursel EO, Georgountzos C, Uson AC, Melicow MM, Veenema RJ. Penile Cancer. *Urology.* 1973; 1(6): 569-78.
- Haedicke, J; Iftner, T. Human papillomaviruses and cancer. *Radiother Oncol.* 2013; 108(3):397-402.
- Hajishengallis G, Reis ES, Mastellos DC, Ricklin D, Lambris JD. Novel mechanisms and functions of complement. *Nat Immunol.* 2017 Nov16;18(12):1288-1298. doi:

10.1038/ni.3858. Review. PubMed PMID: 29144501; PubMed Central PMCID: PMC5706779

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

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013. Review. PubMed PMID: 21376230.

Harper DM, DeMars LR. HPV vaccines - A review of the first decade. *Gynecol Oncol*. 2017;146:196-204. Erratum in: *Gynecol Oncol*. 2017;147:489.

He P, Naka T, Serada S, Fujimoto M, Tanaka T, Hashimoto S, et al. Proteomics-based identification of alpha-enolase as a tumor antigen in non-small lung cancer. *Cancer Sci*. 2007;98:1234-40.

Heller DS. Lesions and Neoplasms of the Penis: A Review. *J Low Genit Tract Dis* 2016;20:107-11.

Herweijer E et al. Association of varying number of doses of quadrivalent human papillomavirus vaccine with incidence of condyloma. *JAMA*. 2014;311:597-603.

Herweijer E et al. Quadrivalent HPV vaccine effectiveness against high-grade cervical lesions by age at vaccination: A population-based study. *Int J Cancer*. 2016;138:2867-74. Erratum in: *Int J Cancer*. 2017;141:E1-E4.

Hillman RJ et al. Immunogenicity of the quadrivalent human papillomavirus (type 6/11/16/18) vaccine in males 16 to 26 years old. *Clin Vaccine Immunol*. 2012;19:261-7.
Ostensson E et al. The economic burden of human papillomavirus-related precancers and cancers in Sweden. *PLoS One*. 2017;12:e0179520.

Horenblas, S. et al. Squamous cell carcinoma of the penis, II: treatment of the primary tumor. *J Urol*. 1992;147: 1533-38.

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

Hungerhuber, E. et al: Risk stratification in penile carcinoma: 25- year experience with surgical inguinal lymph node staging. *Urology* 2006;68:621-625.

Jin J. HPV Infection and Cancer. *JAMA*. 2018;319:1058.

Jurianz, K. et al. Complement resistance of tumor cells: basal and induced mechanisms. *Mol Immunol* 1999; 36, 929- 39.

Jones JM. et al. Plasma fibrinogen and serum C-reactive protein are associated with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2006; 53:97-101.

Kamath S, Lip GY. Fibrinogen: biochemistry, epidemiology and determinants. *QJM*. 2003; 96:711-729

Kaneko N, Gotoh A, Okamura N, Matsuo E, Terao S, Watanabe M, et al. Potential tumor markers of renal cell carcinoma: α -enolase for postoperative follow up, and galectin-1 and galectin-3 for primary detection. *Int J Urol.* 2013;20:530–35.

Kawai K. et al. Hyperfibrinogenemia after preoperative chemoradiotherapy predicts poor response and poor prognosis in rectal cancer. *Int J Colorectal Dis.* 2011; 26:45-51.

Klikovits, T. et al., Circulating complement component 4d (C4d) correlates with tumor volume, therapeutic response and survival in patients with malignant pleural mesothelioma, *Sci. Rep.* 7 (1) (2017) 16456.

Kohl, J. Anaphylatoxins and infectious and non-infectious inflammatory diseases. *Mol Immunol.* 2001; 38:175–87.

Koifman, L. et al. Radical Open Inguinal Lymphadenectomy for Penile Carcinoma: Surgical Technique, Early Complications, and Late Outcomes Evaluation of 340 Procedures. *J Urol.* 2013;190(6):2086-92.

Koifman L, Ornellas P, Ornellas AA. et al. Proteomics analysis of tissue samples from patients with squamous cell carcinoma of the penis and positive to human papillomavirus. *Int Braz J Urol.* 2015; 41(4):642-54

Kolev, M.; Le Frie G.; Kemper, C.Complement—tapping into new sites and effector systems.*NatRevImmunol* 2014;14:811–20.

Kolev, M.; Markiewski MM. Targeting complement-mediated immunoregulation for cancer Immunotherapy. *Seminars in Immunology.* <https://doi.org/10.1016/j.smim.2018.02.003>

Kourie HR, Awada G, Awada A. The second wave of immune checkpoint inhibitor tsunami: advance, challenges and perspectives. *Immunotherapy* 9(8), 647–657 (2017).

Koutsky L. The epidemiology behind the HPV vaccine discovery. *Ann Epidemiol.* 2009;19:239-44

Kroon, B.K. et al. Patients with penile carcinoma benefit from immediate resection of clinically occult lymph node metastases. *J Urol.*, 2005; 173: 816-9.

Loeb S, Catalona WJ. The Prostate Health Index: a new test for the detection of prostate cancer. *Ther Adv Urol.* 2014;6:74–7.

Lont, A.P. et al. Presence of high-risk human papillomavirus DNA in penile carcinoma predicts favorable outcome in survival. *Int J Cancer.* 2006; 119(5):1078-81.

Lopes, A.; et al. Prognostic factors in carcinoma of the penis: multivariate analysis of 145 patients treated with amputation and lymphadenectomy. *J Urol.* 1996; 156: 1637–42.

Loveland, B.E.; Cebon, J. Cancer exploiting complement: a clue or an exception? *Nat Immunol.*, 2008; 9: 1205–6.

Lu B et al. Prevalent serum antibody is not a marker of immune protection against acquisition of oncogenic HPV16 in men. *Cancer Res.* 2012;72:676-85.

Matulewicz RS, Flum AS, Helenowski I, et al. Centralization of penile cancer management in the United States: a combined analysis of the American Board of Urology and National Cancer Data Base. *Urology.* 2016;90:82-88

Markiewski, M.M.; Lambris, J.D. The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. *Am J Pathol.* 2007; 171: 715–27.,

McCance, D.J. et al. Human papillomavirus types 16 and 18 in carcinomas of the penis from Brazil. *Int J Cancer.* 1986;37: 55-9.

Mcdougal, W.S. et al. Treatment of carcinoma of the penis in a case of primary lymphadenectomy. *J Urol.*, 1986; 136: 38-41.

McDougal, W. S. Carcinoma of the penis: improved survival by early regional lymphadenectomy based on the histological grade and depth of invasion of primary lesions. *J Urol* 1995; 154: 1364-68.

Morris BJ. et al. The Strong Protective Effect of Circumcision against Cancer of the Penis. *Adv Urol* 2011;2011:812368.

Mosconi, AM. et al. Cancer of the penis. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005;53:165-77

Niculescu F. et al. Persistent complement activation on tumor cells in breast cancer. *Am J Pathol.* 1992;140: 1039–43.

Niwa T, Saito H, Imajoh-ohmi S, Kaminishi M, Seto Y, Miki Y, et al. BRCA2 interacts with the cytoskeletal linker protein plectin to form a complex controlling centrosome localization. *Cancer Sci.* 2009;100:2115–25.

Nylandsted J, Brand K, Jaattela M: Heat shock protein 70 is required for thesurvival of cancer cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 926, 122-5.

Nozaki M. et al. Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:2328–33.

Ornellas, A.A.. et al. Surgical treatment of invasive squamous cell carcinoma of the penis. Retrospective analysis of 350 cases. *J.Urol.* 1994; 155: 1244-9.

Ornellas, AA. et al. Surgical treatment of invasive squamous cell carcinoma of the penis: Brazilian National Cancer Institute longterm experience. *J Surg Oncol* 2008; 97:487–95.

Ornellas, P. et al. Downregulation of C3 and C4A/B complement factor fragments in plasma from patients with squamous cell carcinoma of the penis. *Int Braz J Urol* 2012; 38 (6), 739-49.

Ornellas P, et al. Experimental validation of the complement protein C3a down expression in the plasma of patients with squamous cell carcinoma of the penis. *Urol Oncol.* 2017 Sep;35(9):545.e13-545.e18. doi: 10.1016/j.urolonc.2017.05.002. Epub 2017 May 25.

Ornellas P, Ornellaas AA. HPV vaccination is fundamental for reducing or eradicate penile cancer | Opinion: NO. *International Brazilian Journal of Urology.* Vol. 44 (5): 862-864, September - October, 2018 doi: 10.1590/S1677-5538.IBJU.2018.05.03

Ostrand-Rosenberg, S. Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. *Curr Opin Genet Dev.*, 2008;18: 11–8.

Palumbo JS. et al. Fibrinogen is an important determinant of the metastatic potential of circulating tumor cells. *Blood.* 2000; 96:3302-3309.

Palumbo JS. et al. Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. *Blood.* 2005; 105:178-185.

Pardoll D. Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol* 2003;21:807–39.

Parekh DJ. et al. A multiinstitutionalprospective trial in the USA confirms that the 4Kscoreaccurately identifies men with high-grade prostate cancer. *Eur Urol.* 2015;68:464–70.

Pow-Sang MR. et al. Epidemiology and natural history of penile cancer. *Urology* 2010;76:S26.

Polterauer S. et al. Plasma fibrinogen levels and prognosis in patients with ovarian cancer: a multicenter study. *Oncologist.* 2009; 14:979-985.

Rabinovich, G.A.; Gabrilovich, D.; Sotomayor, E.M. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol.* vol. 25, p. 267-96, 2007.

Ravi R. Correlation between the extent of nodal involvement and survival following groin dissection for carcinoma of the penis .*Br J Urol* 1993;72:817–9.

Reis E.S., et al., Complement in cancer: untangling an intricate relationship, *Nat. Rev. Immunol.* 18 (2018) 5–18.

Reis, FJC. Rastreamento e diagnóstico das neoplasias de ovário: papel dos marcadores tumorais. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2005;27(4):222-27.

Ricklin D, Lambris Jd. Complement-targeted therapeutics. *Nat Biotechnol.*, 2007; 25: 1265–75.

Ricklin D. et al. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 2010;11:785–97

Robb MA, McInnes PM, Calif RM. Biomarkers and surrogate end points developing common terminology and definitions. *J Am Med Assoc* 2016; 315:1107–8.

- Rosa, GD. et al. Marcadores tumorais em urologia. *Acta Médica (Porto Alegre)*. 2005;26:155-65.
- Rutkowski, M. et al. Cancer and the Complement Cascade. *Mol Cancer Res*. 2010; 8: 1453-65.
- Scheiner, A.M. et al. Human Papillomavirus and Penile Cancers in Rio de Janeiro, Brazil: HPV Typing and Clinical Features. *Int.Braz.J.Urol.* 2008; 34 (4): 467-76.
- Shen, Y. et al.: Blood peptidome-degradome profile of breast cancer. *PLoS One*. 2010; 5(10) : e13133. doi: 10.1371/journal.pone.0013133.
- Silveira AS. Câncer ginecológico: Diagnóstico e tratamento. In: Gil RA. Fatores prognósticos, preditivos e marcadores tumorais no câncer ginecológico. Florianópolis: UFSC; 2005:135-52.
- Smyth, MJ.; Godfrey DI; Trapani JA: A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* 2001; 2,293-299.
- Smyth, MJ.; Dunn, G.P.; Schreiber, R.D. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol*. 2006; 90: 1-50.
- Sufrin, G.; Huben R. Benign and malignant lesion of the penis. In: Gillenwater JY. (Ed.). Adult and pediatric urology. 2nd ed. Chicago: YearBook, 1991. p. 1997-2042
- Soria, J.C. et al. Squamous cell carcinoma of the penis: multivariate analysis of prognostic factors and natural history in monocentric study with a conservative policy. *Ann Oncol.*, 1997; 8: 1089-98.
- Son HJ. et al. Preoperative plasma hyperfibrinogenemia is predictive of poor prognosis in patients with nonmetastatic colon cancer. *Ann Surg Oncol*. 2013; 20:2908-2913.
- Shreyas SJ. et al. Treatment Trends and Outcomes for Patients With Lymph Node-Positive Cancer of the Penis. *JAMA Oncol*. doi:10.1001/jamaoncol.2017.5608 Published online March 1, 2018.
- Tang L. et al. High preoperative plasma fibrinogen levels are associated with distant metastases and impaired prognosis after curative resection in patients with colorectal cancer. *J Surg Oncol*. 2010; 102:428-432.
- Voog E. Genital viral infections. Studies on human papillomavirus and Epstein-Barr virus. *Acta Derm Venereol (Stockh)*. 1996;198:1-55.
- Voris BR , Visintin CN, Reis LO. HPV vaccination is fundamental for reducing or eradicating penile cancer | Opinion: YES. *international Brazilian Journal of Urology* Vol. 44 (5): 859-861, September - October, 2018doi: 10.1590/S1677-5538.IBJU.2018.05.02
- Wang H. et al. Serum peptidome profiling for the diagnosis of colorectal cancer: discovery and validation in two independent cohorts. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, (No. 35)

Yamashita H. et al. Effect of preoperative hyperfibrinogenemia on recurrence of colorectal cancer without a systemic inflammatory response. *World J Surg.* 2009; 33:1298-1305.

Yamashita H. et al. Hyperfibrinogenemia is associated with lymphatic as well as hematogenous metastasis and worse clinical outcome in T2 gastric cancer. *BMC Cancer.* 2006; 6:147.

Ye, J. et al. Prognostic Significance of Preoperative and Postoperative Complement C3 Depletion in Gastric Cancer: A Three-Year Survival Investigation. *BioMed Research International* Volume 2017, Article ID 2161840, 9 pages

Ytting H., et al. Increased activity of the mannan-binding lectin complement activation pathway in patients with colorectal cancer, *Scand. J. Gastroenterol.* 39 (7) (2004) 674–679.

Zitvogel, L.; Tesniere, A.; Kroemer, G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6: 715-27.

APÊNDICES

ARTIGOS PUBLICADOS

APÊNDICE A - “Downregulation of C3 and C4A/B complement factor fragments in plasma from patients with squamous cell carcinoma of the penis” (f. 57)

Neste artigo, o objetivo principal foi identificar marcadores de câncer no plasma de pacientes portadores de carcinomas de pênis e compreender os mecanismos de oncogênese visando a melhoria no tratamento desses pacientes.

APÊNDICE B - “Experimental validation of the complement protein C3a down expression in the plasma of patients with squamous cell carcinoma of the penis” (f. 68)

Neste artigo, o objetivo principal foi validar experimentalmente o C3a como biomarcador em pacientes com câncer de pênis através de ensaio imunoenzimático comercial.

APÊNDICE C - “Proteomics analysis of tissue samples from patients with squamous cell carcinoma of the penis and positive to human papillomavirus” (f. 74)

Neste artigo, o objetivo principal foi identificar possíveis biomarcadores protéicos e / ou candidatos a alvos terapêuticos em tecidos de pacientes com câncer de pênis.

APÊNDICE D - “HPV vaccination is fundamental for reducing or erradicate penile cancer | Opinion: NO” (f. 87)

Nesse artigo, o objetivo foi rever na literatura se a vacinação contra o HPV na população masculina poderia reduzir ou erradicar o câncer de pênis.



Downregulation of C3 and C4A/B complement factor fragments in plasma from patients with squamous cell carcinoma of the penis

Paulo Ornellas, Antonio Augusto Ornellas, Clizia Chinello, Erica Gianazza, Veronica Mainini, Marta Cazzaniga, Denise Abreu Pereira, Vanessa Sandim, Ana Sheila Cypriano, Leandro Koifman, Paulo Cesar Barbosa da Silva, Gilda Alves, Fulvio Magni

Laboratory of Applied Genetics, Hematology Service (PO, DAP, VS, ASC, GA) and Department of Urology, Brazilian National Cancer Institute (AAO,PCBS); Urology Service, Mário Kröeff Hospital (AAO,LK), Rio de Janeiro, Brazil and Department of Experimental Medicine, University of Milano-Bicocca (CC,EG,VM,MC,FM), Milan, Italy

ABSTRACT

Purpose: To investigate the use of ClinProt technique to identify cancer markers in plasma of patients suffering from squamous cell carcinoma of the penis (SCCP).

Materials and Methods: Plasma of 36 healthy subjects and 25 patients with penile carcinoma who underwent surgical treatment between June 2010 and June 2011 was collected and analyzed by the ClinProt/MALDI/ToF technique. Then the peptides were identified from the C8 MB eluted fraction of patients' and control subjects' plasma by LIFT MS/MS.

Results: A cluster of 2 peptides (A=m/z 1897.22 ± 9 Da and B=m/z 2021.99 ± 9 Da) was able to discriminate patients from control subjects. Cross validation analysis using the whole casuistic showed 62.5% and 86.76% sensitivity and specificity, respectively. The cluster also showed very high sensitivity (100%) and specificity (97%) for SCCP patients that died due to the disease. Furthermore, patients with lymph node involvement presented sensitivity and specificity of 80% and 97%, respectively. These two peptides were identified by the proteomic approach based on a MALDI-TOF/TOF as fragments of C3 (m/z 1896.17) and C4a/b (m/z 2021.26) complement proteins.

Conclusions: The results showed that as the disease progresses, the fragments C3 and C4 A/B are less expressed in comparison with healthy subjects. These results may be useful as prognostic tools.

ARTICLE INFO

Key words:

Penis; Penis Cancer;
Carcinoma, Squamous Cell;
Plasma; Proteomics;
Complement C3b Inactivator
Proteins

Int Braz J Urol. 2012; 38: 1-11

Submitted for publication:
August 02, 2012

Accepted after revision:
October 16, 2012

INTRODUCTION

Squamous cell carcinoma of the penis (SCCP) is a rare disease in developed countries, but in emergent countries it can account for 10% of male neoplasms (1,2). Its etiology is not fully understood, but there is a strong association with poor hygienic conditions, phimosis and human

papillomavirus (HPV) infection (2,3). Metastases from penile carcinoma usually spread through penile lymphatic vessels to regional nodes, especially the superficial and deep inguinal nodes, and subsequently to the iliac nodes within the pelvis. Tumor involvement of inguinal lymph nodes is the best indicator of long-term survival in patients with invasive SCCP (1). Twenty to fifty percent of

patients with penile carcinoma present inguinal involvement at diagnosis and physical examination is not a reliable predictor or lymph nodes status (2). Therefore, reliable staging information can only be acquired through surgical procedures with subsequent histologic examination of the inguinal lymph nodes. The pathologic factors with known prognostic value, other than the presence of lymph node metastasis, include tumor thickness, grade, histologic type, lymphovascular embolization, presence of koiocytosis and stage (4-6). On the clinical nodal status there is a dilemma: a significant number of patients with palpable lymph nodes do not have metastasis, in the other hand, 20% of patients with clinically non-suspicious nodes present micrometastasis at pathological examination. Thus, prophylactic bilateral inguinal lymph node dissection is considered unnecessary in up to 80% of penile carcinoma patients with clinically negative regional lymph nodes (7).

While DNA is the information archive, proteins do the work for the cell. It has been shown that direct gene expression is only responsible for a small part of the complexity of a living organism (8). Proteomics is the large-scale study of proteins, and is associated traditionally with displaying a large number of proteins from a given cell line or organism. Curiously, there is no strict linear relationship between genes and the protein complement or 'proteome' of a cell. Proteomics is complementary to genomics, because it focuses on the gene products, which are the active agents in cells. There are two strategies for finding protein biomarkers in tissues or in biological fluids. Several possible biomarkers have been identified using a gel-based approach in bi-dimensional electrophoresis (with and without stable isotopic labeling) and mass spectrometry (9,10). However, since this approach is very laborious and time-consuming, it is not practicable in clinical chemistry laboratories. Other methods based on the biological fluid proteome prefractionation have been recently made available (11,12). The successful discovery of a proteomic profile correlated to an altered state by the ClinProt method has been reported in various human diseases, such as oral, bladder, nasopharyngeal and neck cancer (13-15). Recently, we have used this approach to find possible ccRCC

biomarkers in urine and serum (16,17). In view of these results, we investigated the possibility of using the ClinProt technique to find possible plasma diagnostic markers that can better distinguish healthy subjects from patients affected by SCCP.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals

The C8-Hydrophobic kit, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) and Protmix1 were purchased from Bruker Daltonics, GmbH (Bremen, Germany), acetonitrile from Merck KGaA (Darmstadt, Germany) and methanol from Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO).

Patients and Blood Sample Collection

Twenty-five patients with penile cancer being treated by the National Cancer Institute and Mário Kröeff Hospital were enrolled in this study after permission of the hospital's ethic committee. In addition, we used blood samples from thirty-six healthy subjects (blood donor volunteers) who underwent circumcision in Santa Veronica Hospital. Informed consent was obtained from all patients. After diagnosis of penile cancer, 5 ml of blood was collected before surgery and stored in a BD vacutainer with EDTA. About 2.5 ml of plasma was obtained after centrifugation at 1500 g for 10 min. within 4 hours of collection. The samples were frozen on dry ice and sent to Milano Bicocca University in Italy. All the samples were stored at -80 °C until being sent to Italy.

The mean age of the patients and controls was 63.56 (range, 38-90) and 60 years (range, 23-83), respectively. Follow-up was evaluated in all patients. Median follow-up was 9 months (range 1 to 36). The data collected from the patients' medical records are shown in Table-1. Due to the small number of patients, no stratification according to risk factors for penile cancer was performed.

Study Design

The entire data set, composed of 36 controls and 25 penile cancer patients, was randomly split into two groups. The first group (training data set: 28 controls and 17 penile cancer patients) was

used for the identification of signals related to peptides expressed differentially in penile cancer patients compared with controls (pattern recognition). The second group (test data set: 8 controls and 8 penile cancer patients) was used for preliminary pattern validation of the cluster.

Sample Purification

ClintProt was applied to analyze the plasma samples collected from SCCP patients. Healthy subjects and SCCP patients were randomly split into two groups for the training and the test experiments. Because of the high complexity of spectrum profiles, two algorithms were tested for biomarker discovery. After the basic statistical analysis, the two algorithms were used for the selection of a signal cluster that was able to differentiate patients from controls. Peptides were extracted from the plasma by ClintProt C8 magnetic beads according to the kit instructions. Plasma aliquots (40 µL each) were mixed with 5 µL of magnetic beads and 40 µL of the kit buffer, allowing peptides and proteins to bind to hydrophobic C8 surface of the magnetic micro particles. The supernatant was removed after 1 minute of incubation and the beads were washed twice with 45 µL and once with 15 µL of the recommend washing solution. Peptides were then eluted with 10 µL of 50% acetonitrile. The procedure was automatically carried out using the ClintProt robot (Bruker Daltonics, GmbH, Bremen, Germany), thus reducing variability.

Mass Spectrometry Analysis

Aliquots of eluted peptides (5 µL) were mixed with 10 µL of HCCA matrix solution (6.2 g/L HCCA in methanol/acetonitrile/water 50/40/10). About 1 µL of this mixture was spotted four times onto a MALDI-ToF MTP 384 target plate ground steel F (Bruker Daltonics, GmbH, Bremen, Germany). All preparation steps were performed automatically by a robot (ClintProt robot, Bruker Daltonics, GmbH, Bremen, Germany). Mass spectra were acquired by an UltrafleXtreme MALDI TOF/TOF MS instrument (Bruker Daltonics, GmbH, Bremen, Germany) operated in positive-ion linear or reflectron mode, recording m/z values from 1000-10000 Da. External calibration was per-

formed using a set of peptide/protein standards (ProtMix1). MALDI-TOF acquisition parameters were as follows: total of 1200 shots (200 x 6), laser power about 70% (linear mode) and 40% (reflectron mode), laser movement hexagonal.

Data Analysis

Data analysis was performed using the ClinProtTools 2.1 software package (18) (Bruker Daltonics, GmbH, Bremen, Germany). ClinProtTools was used for multiple spectra comparison and protein pattern identification with the following workflow: (i) spectra normalization to their total ion current; (ii) spectra recalibration using the prominent peaks; (iii) baseline subtraction and peak detection; and (iv) calculation of peak areas for each spectrum. Peak detection was done with signal-to-noise ratio of 5 and peak areas were calculated using endpoint level integration type. Spectra were also “top hat” baseline subtracted with a minimum baseline width of 10% and processed in a range of 1-10KDa. Only 1 of the 8 spectra obtained from the plasma of each subject by MALDI-TOF was used for the next statistical analysis, with the help of “Support Spectra Grouping” and “Enable Similarity Selection” options. The program, after calculation of the mean spectrum of each subject’s data set, selects the spectrum that is most similar to the average for subsequent statistical analysis. Basic statistical analysis, genetic algorithm (GA) (19), and Support Vector Machine (SVM) (20) were then used for the selection of signal clusters that were able to differentiate controls from penile cancer patients. These signals were preliminarily tested for their diagnostic capability using the two different data sets separately. The receiver operating characteristic curve analysis and area under curve (AUC) calculation were performed by the ClinProtTools 2.1 software to determine the diagnostic efficacy of each marker. The cut-off value ($P < 0.001$) corresponding to the highest accuracy (the lowest false negative and false positive results) was also calculated, along with specificity and sensitivity.

Peptide Identification by MALDI-TOF/TOF

The peptides were identified from the C8 MB eluted fraction of patients’ and control sub-

Table 1 - Patient characteristics, histopathologic findings, pathologic staging, type of surgery and follow-up.

Pts.	Age	Race *	Grade	Vascular Invasion	Stage TNM	Surgery	Follow-up (months)	Deaths by Disease (months)
1	41	mulatto	MD***	negative	pT2N2MX	Partial amputation + bilateral inguinal lymphadenectomy	12	
2	41	mulatto	MD	negative	pT3N0Mx	Partial amputation + bilateral inguinal lymphadenectomy	12	
3	62	black	MD	negative	pT2N0Mx	Total amputation + bilateral inguinal lymphadenectomy	36	
4	62	white	MD	negative	pT1N0Mx	Partial amputation.	2	
5	38	white	WD**	negative	pT1N2MX	Partial amputation + bilateral inguinal lymphadenectomy	1	
6	45	white	MD	negative	pT1N1Mx	Partial amputation + bilateral inguinal lymphadenectomy	12	
7	51	white	MD	negative	pT2N0M0	Partial amputation + bilateral inguinal lymphadenectomy	24	
8	57	black	WD	negative	pT3N2MX	Partial amputation + bilateral inguinal lymphadenectomy	18	
9	54	mulatto	MD	negative	pT2N0Mx	Partial amputation + bilateral inguinal lymphadenectomy	30	
10	73	white	WD	positive	pT2N3Mx	Partial amputation + right inguinal lymphadenectomy	11	11
11	76	black	MD	negative	pT2N0Mx	Partial amputation + bilateral inguinal lymphadenectomy	5	5
12	57	white	MD	negative	pT3N0Mx	Partial amputation + bilateral inguinal lymphadenectomy	7	

13	80	white	WD	negative	pT2N0Mx	Partial amputation + bilateral inguinal lymphadenectomy	24	
14	84	white	MD	negative	pT2NxMx	Partial amputation.	3	
15	86	white	MD	negative	pT3NxMx	Total amputation.	8	
16	64	white	MD	negative	pT3N3Mx	Partial amputation + bilateral inguinal lymphadenectomy	5	
						Emasculation	8	
17	80	white	MD	positive	pT4NxMx	Partial amputation.	1	
18	90	white	PD****	negative	pT1NxMx	Partial amputation + bilateral inguinal lymphadenectomy	8	
19	83	white	WD	negative	pT2N3Mx		8	
						Emasculation + bilateral inguinal lymphadenectomy	4	
20	55	mulatto	MD	negative	pT3N2Mx	Total amputation + bilateral inguinal lymphadenectomy	9	
5	21	61	mulatto	MD	negative	pT2N0Mx	Partial amputation + bilateral inguinal lymphadenectomy	1
						Partial amputation + bilateral inguinal lymphadenectomy	4	
22	71	white	MD	positive	pT2N0Mx	Partial amputation + bilateral inguinal lymphadenectomy		
						Partial amputation + bilateral inguinal lymphadenectomy		
23	56	mulatto	WD	negative	pT2N0Mx	Partial amputation + bilateral inguinal lymphadenectomy		
						Total amputation.	1	
						Partial amputation + bilateral inguinal lymphadenectomy	24	
24	60	black	WD	negative	pT2NxMx			
25	62	white	WD	negative	pT2N3Mx			

* In Brazil, race definition is not accurate due to miscegenation. The column represents the self defined skin color of the patients

** WD: well differentiated

*** MD: moderately differentiated

**** PD: poorly differentiated

jects' plasma by LIFT MS/MS. For peptide identification, the LIFT-TOF/TOF spectra were recorded in the UltrafleXtremeTM MALDI-TOF/TOF MS instrument. The fragment masses were analyzed after their ion reflector detection. Analyses were performed using the following acquisition settings: ion source 1, 7.5 kV; ion source 2, 6.7 kV; lens 3.6 kV; reflector, 29.5 kV; reflector 2, 13.95 kV; lift 1, 19 kV; lift 2, 3.15 kV; pulsed ion extraction 80 ns.

Raw MS/MS data were processed with the FlexAnalysisTM 3.3 software (Bruker Daltonics, Germany). Database searching was performed by an in-house Mascot search engine (Version: 2.3.02) using the following parameters: human Swissprot (accessed Feb. 2012- 20,317 sequences) database, no enzyme and fixed and variable modifications. MS and MS/MS tolerances were generally set at 1 Da. Only identifications with a score higher than Mascot identity thresholds were accepted.

RESULTS

The pathological findings of the SCCP are shown in **Table-1**. Most of the patients ($n = 14$) were at pT2 level, whereas the remaining were at pT1 ($n = 4$), pT3 ($n = 6$) and pT4 ($n = 1$) levels. Histopathology confirmed invasive SCCP in all patients. Of the 25 cases, 8 (32%) were well differentiated, 16 (64%) moderately differentiated and 1 (4%) poorly differentiated. Amputation and inguinal lymphadenectomy was performed in 20 patients. Of these patients, 11 (55%) were N0, 1 (5%) was N1, 4 (20%) were N2 and 4 (20%) were N3.

ClintProt was applied to analyze the plasma samples collected from SCCP patients and a cluster of two peaks was identified. Comparison of spectrum profiles obtained from the data set used in the training phase showed several ions differentially expressed in the two studied populations (**Table-2**). On the basis of the GA and SVM results, a cluster of two statistically different signals ($P < 0.05$), at $m/z 2021.99 \pm 9$, 1897.22 ± 9 , were identified as able to differentiate the populations. Preliminary statistical analysis was carried out for each marker and for the cluster of signals by the receiver operating characteristic curve analysis. The AUC of peak A at $m/z 1897.22$ ($P < 0.0001$)

was 0.85, which corresponds to a moderately accurate test, according to the criteria suggested by Swets (21). The AUC of peak B at $m/z 2021.99$ ($P < 0.0001$) was 0.91, which corresponds to a highly accurate test. The combination of the two peaks indicated an improvement in the performance compared to the single signals, with specificity and sensitivity of 100% and 80%, respectively. This pattern was subsequently tested for its ability to differentiate SCCP patients from controls by external validation using data obtained from a second group of normal subjects and patients. Sensitivity and specificity were at 63.6% and 100%, respectively. Cross-validation analysis using the whole casuistic showed 62.5% and 86.76% sensitivity and specificity, respectively. The cluster of signals was also evaluated using the entire set of patient data grouped according to deaths due to disease and lymph node involvement. The results showed 100% sensitivity and 97% specificity for patients who had died of disease. Among patients with lymph node involvement, the sensitivity and specificity was 80% and 97%, respectively. Patients without lymph node involvement showed 54% sensitivity and 97% specificity (**Table-3**). Both peaks A and B, included in the diagnostic cluster, were under-expressed ($p < 0.05$) in patients compared with healthy subjects (**Figure-1**). Some of the peaks observed in the plasma protein profile could be identified by LIFT MS/MS (**Table-4**). In particular, signals at $m/z 1897.22$ ($m/z 1896.17$ in reflector mode) and at $m/z 2021.99$ ($m/z 2021.26$ in reflector mode) were identified by the proteomic approach based on MALDI-TOF/TOF as fragments of C3 ($m/z 1896.17$) and C4a/b ($m/z 2021.26$) complement proteins (**Table-4**).

Preliminary evaluation of the diagnostic efficacy was determined with an internal validation. The cluster showed a very high specificity value in an external validation test with plasma samples collected from different patients and controls (**Table-3**).

DISCUSSION

The area of proteomics has begun to revolutionize the study of medicine in the post genomic era, by allowing researchers to study the

Table 2 - Selection of peaks differently expressed ($P < 0.05$) between controls ($n = 28$) and penile cancer patients ($n = 17$) used for the training phase.

Mass	P^*	$P†$	Ave 1‡	Ave 2§	Std D1¶	Std D2
6430.52	0.0195	0.00859	50.6	10.16	47.79	13.46
1897.14**	0.0283	0.00859	23.23	5.38	24.34	4.23
1865.76	0.165	0.246	8.89	1.56	13.01	1.71
6628.81	0.28	0.246	129.73	55.2	138.31	41.66
1016.3	0.422	0.546	486.1	391.81	153.1	123.32
2021.91**	0.422	0.000456	70.76	1.09	164.61	4.08
1112.17	0.422	0.0747	17.16	37.25	8.67	30.63
9420.36	0.422	0.395	23.38	14.85	13.94	10.8
1211.9	0.422	0.0423	4.53	-0.18	11.52	1.01
1229.15	0.422	0.246	6.18	10.52	5.46	5.43
3216.09	0.422	0.57	11.2	6.93	8.58	4.44
9377.51	0.422	0.5	8.02	5.25	5.81	2.94
7763.75	0.491	0.615	17.25	12.1	11.69	6.12
4100.59	0.491	0.184	2.33	-0.66	8.87	1.32
3315.24	0.518	0.71	22.33	15.47	16.59	8.47
1767.61	0.518	0.948	24.21	4.21	65.65	2.97
8764.21	0.518	0.684	6.15	2.64	7.19	5.36

* P value by t test and ANOVA; values lower than .05 indicate statistical relevance.

† P value calculated with the Wilcoxon/Kruskal-Wallis test; values lower than 0.05 suggest statistical relevance.

‡ Average area of peaks for control subjects.

§ Average area of peaks for SCCP patients.

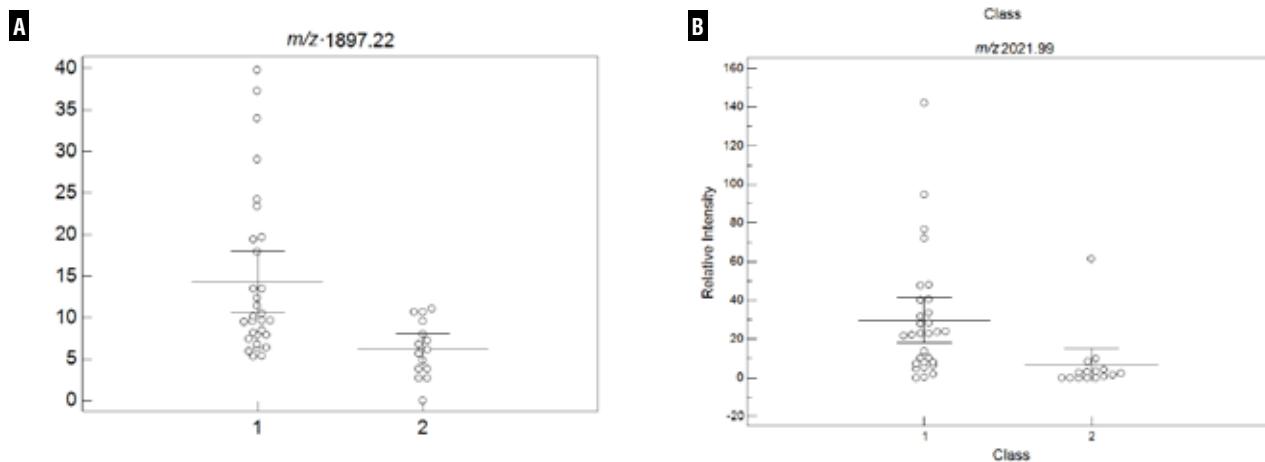
¶ Standard deviation of peaks for control subjects.

|| Standard deviation of peaks for SCCP patients.

** Marked peaks represent signals selected for the diagnostic model

Table 3 - Cluster evaluation: diagnostic efficacy of pattern based on deaths from disease and lymph node involvement.

Group	Sensitivity	Specificity
6 patients dead by disease	100%	97%
9 patients with positive lymph nodes	80%	97%
11 patients with negative lymph nodes	57%	97%

Figure 1 - Signal intensity of 2 peaks (1897.22 and 2021.99 m/z) discriminating control (class 1) and tumor (class 2).**Table 4 - Identified peptides in the C8 MB eluted fraction of patients' and control subjects' plasma by LIFT MS/MS. All peptide identification scores were above Mascot identity threshold. Table reports the m/z values of the ions observed in MALDI linear and reflectron mode.**

Reflectron mode m/z	Linear mode m/z	Calc. mass (Da) in all pre-fractionated plasma samples	Peptide sequence	Accession (UNIPROT)	Description	Peptide score
1896.17	1897.22	1895.024	NGFKSHALQLNNRQIR	CO4A_HUMAN CO4B_HUMAN	Complement C4-A OS=Homo sapiens GN=C4A PE=1 SV=1 Complement C4-B OS=Homo sapiens GN=C4B PE=1 SV=1	61
2021.26	2021.99	2020.097	SSKITHRIHWESASLLR	CO3_HUMAN	Complement C3 OS=Homo sapiens GN=C3 PE=1 SV=2	72

role that proteins plays in health and disease. By applying this knowledge, innovative discoveries in early cancer detection have been made, including kidney, prostate, ovarian, and bladder cancer. To our knowledge, this is the first study of penile cancer proteomics.

Although several markers have been evaluated, currently the clinical application of these markers is limited. HPV positive tumors show a variable prognostic outcome. In a previous article we reported the analysis of 80 consecutive cases of patients with penile cancers and HPV status was not significantly associated with the presence of re-

gional metastases (22). Up to now, P53 status may correlate with survival in T1 disease but further studies are required to establish the link to lymph node spread (23). Therefore, it is still necessary to find biomarkers for early detection of metastases, prognosis and follow-up of this disease (23).

Before the use of proteomics in penile carcinoma, a critical assessment of its diagnostic and prognostic value will be required. There is a controversy about whether and when patients should undergo lymphadenectomy. The presence and the extent of metastasis to the inguinal region is the most powerful prognostic factor for survi-

val in patients with SCCP. The principal aim in the management of this disease is correct staging of patients without invasive procedures, since a presence of metastatic lymph nodes is an independent prognostic factor for survival (6). Therefore, research into potential biomarkers and biological targets is very important.

The C3, C4a and C4b complement fragments are involved in the classic and the alternative complement cascade pathway. These peptides were under-expressed ($p < 0.05$) in SCCP patients compared with healthy subjects. During disease progress, under-expression of C3, C4a/b fragments become more evident. More interestingly, we have found very high sensitivity (100%) and specificity (97%) for under-expression of these fragments in SCCP patients that have succumbed to the disease. Besides this, patients with lymph node involvement present sensitivity and specificity of 80% and 97%, respectively. In the case of patients without lymph node involvement, we obtained a sensitivity rate of 57% and specificity of 97%.

Degradation of complement system convertases was observed for patients with breast cancer (BCP). For C3, the degradation was solely on the C3d, C3g, C3 α '1 and C3 β . Convertases C3, which occupies a central position in the system, displays differential degradation in the BCP (5-fold more peptides than in the healthy subjects). For C4, the degradation was solely on the C4b and C4 β . The degradation of the front portion of the C4b fragment was observed solely for the tested BCP (24).

The contribution of the complement system to the control of tumor growth has been neglected for a long time, since the main emphasis has been put on cell-mediated immune response against cancer (25). The innate immune system is the first line of defense, comprised of cells and mechanisms that defend the host from infection in a non-specific manner. Taneja et al. (26) studied the plasma protein profile in patients with hepatitis E. In that study, the levels of complement proteins C3, C3f, C4, and bradykinin and kininogen were found to be lower in the plasma of hepatitis E patients compared to healthy controls. Any perturbation, such as a viral infection in the liver,

should trigger a strong innate response as the first line of host defense, but the opposite was found to occur, with these proteins being in downregulation. The exact mechanism of this reduction is not understood at this time.

In our patients, the downregulation of C3 and C4 could be caused by HPV and/or EBV infection, viruses that are highly prevalent in SCCP lesions (27). Viral proteins counteract the immune response (28). This could explain the progression of the disease along with C3 and C4a/b under-expression. It is a hypothesis to be tested in the future.

The over-expression of C regulatory proteins (CRPs) in tumor cells is one way these cells protect themselves from C attack. CD46, CD55 and CD59 are thought to be the most important membrane C regulatory proteins (mCRPs), expressed both on normal and tumor cells. Tumor cells can also evade C attack by binding soluble C inhibitors from serum such as factor H (fH). It is also interesting to note that fH or a related protein is a marker for bladder cancer, suggesting a link between C resistance and escape from immune surveillance (29). CD55 has been identified as a tumor-associated antigen and a high expression level of CD55 in colorectal cancer tissue is correlated with a significant decrease in survival (30). Also, lower CD46 has been found to be inversely related with high levels of C3 deposited in renal and cervical cancer tissue (31).

In addition, in a previous study (32) we detected lower activity of natural killer cells (NK) in patients with cancer of the penis. NK cells are also part of the innate immune response and were first identified for their ability to kill tumor cells without deliberate immunization or activation. Subsequently, they were also found to be able to kill cells that are infected with certain viruses and to attack preferentially cells that lack expression of major histocompatibility complex (MHC) class I antigens. The innate immune response of patients to cancer therefore may be involved, since natural killer (NK) cell activity can be significantly decreased in SCCP patients compared to control groups (32).

Despite increasing evidence suggesting that a variety of mechanisms are responsible for tumor-related tolerance and suppression, little is

known about the timeline and reciprocal connection between these processes. The widely accepted theory of immuno-editing describes a rational, time-structured evolution of the relationship that occurs between tumor and host immune system (33,34). Tumor escape in cancer patients appears to be a cumulative process that involves tumor-derived soluble factors (TDSFs), induction of regulatory elements of various cell lineages and different anatomical environments (35). In a simplified view, tumor-induced immune subversion results from two main activities, namely the induction of tolerance toward tumor antigens and the functional suppression of the effector lymphocytes that normally counteract tumor growth (33-37).

CONCLUSIONS

Our results suggest that a proteomic approach based on magnetic beads is a useful method to discover possible clinical biomarkers. We demonstrated the capability of selected signals to differentiate SCCP patients from normal subjects. The peptides identified from the C8 MB eluted fraction of patients' and control subjects' plasma correspond to fragments of the C3 (m/z 1896.17) and C4 (m/z 2021.26) complement protein. The results showed that when the disease progresses, they are more under-expressed. These fragments are mainly downregulated in patients with metastatic involvement. The innate immune response of patients could be suppressed. Downregulation of C3 and C4A/B represents a promising prognostic tool for SCCP.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Italian Ministry of Universities and Research: PRIN 2006 (no. 69373), FIRB 2007 (Rete nazionale per lo studio del proteoma umano, no.RBRN07BMCT_11), FAR 2006-2011 (ex 60%), from the Italian Institute of Technology (IIT), Project SEED: "IPG-CHIP", by "FONDO PER LA PROMOZIONE DI ACCORDI ISTITUZIONALI" Regione Lombardia DGR N. 5200/2007, project no. 14546: "Network Enabled Drug Design (NEDD)" The work was also suppor-

ted by grants from Programa de Oncobiologia and FAPERJ (APQ1-E26/110.812/2009), Brazil.

CONFLICT OF INTEREST

None declared.

REFERENCES

1. Misra S, Chaturvedi A, Misra NC: Penile carcinoma: a challenge for the developing world. *Lancet Oncol.* 2004; 5: 240-7.
2. Ornellas AA, Kinchin EW, Nóbrega BL, Wisnesky A, Koifman N, Quirino R: Surgical treatment of invasive squamous cell carcinoma of the penis: Brazilian National Cancer Institute long-term experience. *J Surg Oncol.* 2008; 97: 487-95.
3. Ravi R: Correlation between the extent of nodal involvement and survival following groin dissection for carcinoma of the penis. *Br J Urol.* 1993; 72: 817-9.
4. Soria JC, Fizazi K, Piron D, Kramar A, Gerbaulet A, Haie-Meder C, et al.: Squamous cell carcinoma of the penis: multivariate analysis of prognostic factors and natural history in monocentric study with a conservative policy. *Ann Oncol.* 1997; 8: 1089-98.
5. Lopes A, Bezerra AL, Pinto CA, Serrano SV, de Mello CA, Villa LL: p53 as a new prognostic factor for lymph node metastasis in penile carcinoma: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy. *J Urol.* 2002; 168: 81-6.
6. Ornellas AA, Nóbrega BL, Wei Kin Chin E, Wisnesky A, da Silva PC, de Santos Schwindt AB: Prognostic factors in invasive squamous cell carcinoma of the penis: analysis of 196 patients treated at the Brazilian National Cancer Institute. *J Urol.* 2008; 180: 1354-9.
7. Abi-Aad AS, deKernion JB: Controversies in ilioinguinal lymphadenectomy for cancer of the penis. *Urol Clin North Am.* 1992; 19: 319-24.
8. Alpantaki K, Tsiridis E, Pape HC, Giannoudis PV: Application of clinical proteomics in diagnosis and management of trauma patients. *Injury.* 2007; 38: 263-71.
9. Rempelakos A, Bastas E, Lymerakis CH, Thanos A: Carcinoma of the penis: experience from 360 cases. *J BUON.* 2004; 9: 51-5.
10. Theodorescu D, Wittke S, Ross MM, Walden M, Conaway M, Just I, et al.: Discovery and validation of new protein biomarkers for urothelial cancer: a prospective analysis. *Lancet Oncol.* 2006; 7: 230-40.
11. Sarto C, Proserpio V, Magni F: Insight on renal cell carcinoma proteome D.S. Sayed (ed.), *Cancer Proteomics From Bench to Bedside*, Humana Press, Totowa, NJ. 2008; pp. 121-37.

12. Petricoin EF, Liotta LA: SELDI-TOF-based serum proteomic pattern diagnostics for early detection of cancer. *Curr Opin Biotechnol.* 2004; 15: 24-30.
13. Bosso N, Chinello C, Picozzi SC, Gianazza E, Mainini V, Galbusera C, et al.: Human urine biomarkers of renal cell carcinoma evaluated by ClinProt. *Proteomics Clin Appl.* 2008; 2: 1036-46.
14. Tolson JP, Flad T, Gnau V, Dihazi H, Hennenlotter J, Beck A, et al.: Differential detection of S100A8 in transitional cell carcinoma of the bladder by pair wise tissue proteomic and immunohistochemical analysis. *Proteomics.* 2006; 6: 697-708.
15. Chang JT, Chen LC, Wei SY, Chen YJ, Wang HM, Liao CT, et al.: Increase diagnostic efficacy by combined use of finger print markers in mass spectrometry--plasma peptidomes from nasopharyngeal cancer patients for example. *Clin Biochem.* 2006; 39: 1144-51.
16. Freed GL, Cazares LH, Fichandler CE, Fuller TW, Sawyer CA, Stack BC Jr, et al.: Differential capture of serum proteins for expression profiling and biomarker discovery in pre- and posttreatment head and neck cancer samples. *Laryngoscope.* 2008; 118: 61-8.
17. Chinello C, Gianazza E, Zoppis I, Mainini V, Galbusera C, Picozzi S, et al.: Serum biomarkers of renal cell carcinoma assessed using a protein profiling approach based on ClinProt technique. *Urology.* 2010; 75: 842-7.
18. Ketterlinus R, Hsieh SY, Teng SH, Lee H, Pusch W: Fishing for biomarkers: analyzing mass spectrometry data with the new ClinProTools software. *Biotechniques.* 2005; (Suppl): 37-40.
19. Holland JH: Adaptation in Natural and Artificial Systems. Ann Arbor, MI: University of Michigan Press. 1975.
20. Vapnik V: Statistical Learning Theory. New York, NY, Wiley. 1998; pp. 1-736.
21. Swets JA: Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science.* 1988; 240: 1285-93.
22. Scheiner MA, Campos MM, Ornellas AA, Chin EW, Ornellas MH, Andrade-Serpa MJ: Human papillomavirus and penile cancers in Rio de Janeiro, Brazil: HPV typing and clinical features. *Int Braz J Urol.* 2008; 34: 467-74; discussion 475-6.
23. Muneer A, Kayes O, Ahmed HU, Arya M, Minhas S: Molecular prognostic factors in penile cancer. *World J Urol.* 2009; 27: 161-7.
24. Shen Y, Tolić N, Liu T, Zhao R, Petritis BO, Gritsenko MA, et al.: Blood peptidome-degradome profile of breast cancer. *PLoS One.* 2010; 5: e13133.
25. Macor P, Tedesco F: Complement as effector system in cancer immunotherapy. *Immunol Lett.* 2007; 111: 6-13.
26. Taneja S, Ahmad I, Sen S, Kumar S, Arora R, Gupta VK, et al.: Plasma peptidome profiling of acute hepatitis E patients by MALDI-TOF/TOF. *Proteome Sci.* 2011; 9: 5.
27. Afonso LA, Moyses N, Alves G, Ornellas AA, Passos MR, Oliveira Ldo H, et al.: Prevalence of human papillomavirus and Epstein-Barr virus DNA in penile cancer cases from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012; 107: 18-23.
28. Campo MS, Graham SV, Cortese MS, Ashrafi GH, Araibi EH, Dornan ES, et al.: HPV-16 E5 down-regulates expression of surface HLA class I and reduces recognition by CD8 T cells. *Virology.* 2010; 407: 137-42.
29. Fedarko NS, Fohr B, Robey PG, Young MF, Fisher LW: Factor H binding to bone sialoprotein and osteopontin enables tumor cell evasion of complement-mediated attack. *J Biol Chem.* 2000; 275: 16666-72.
30. Durrant LG, Chapman MA, Buckley DJ, Spendlove I, Robbins RA, Armitage NC: Enhanced expression of the complement regulatory protein CD55 predicts a poor prognosis in colorectal cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2003; 52: 638-42.
31. Blok VT, Daha MR, Tijsma OM, Weissglas MG, van den Broek LJ, Gorter A: A possible role of CD46 for the protection in vivo of human renal tumor cells from complement-mediated damage. *Lab Invest.* 2000; 80: 335-44.
32. Campos MM, de Souza MH, Pires V, Scheiner MA, Esteves EB, Ornellas AA: Clinical implications of natural killer cytotoxicity in patients with squamous cell carcinoma of the penis. *Nat Immun.* 1998; 16: 256-62.
33. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD: Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* 2002; 3: 991-8.
34. Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD: Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol.* 2006; 90: 1-50.
35. Bronte V, Cingarlini S, Marigo I, De Santo C, Gallina G, Dolcetti L, et al.: Leukocyte infiltration in cancer creates an unfavorable environment for antitumor immune responses: a novel target for therapeutic intervention. *Immunol Invest.* 2006; 35: 327-57.
36. Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM: Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol.* 2007; 25: 267-96.
37. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G: Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6: 715-27.

Correspondence address:

Dr. Antonio Augusto Ornellas
 Department of Urology
 Instituto Nacional de Câncer
 Praça da Cruz Vermelha, 23
 Rio de Janeiro, RJ, 20230-130, Brazil
 E-mail: ornellasa@hotmail.com



Original article

Experimental validation of the complement protein C3a down expression in the plasma of patients with squamous cell carcinoma of the penis

Paulo Ornellas, M.D.^{a,b,c}, Marilza de M. Ribeiro-Carvalho, Ph.D.^c,
 Antonio Augusto Ornellas, Ph.D., M.D.^{a,b,d,*}, Luciano Scherrer, M.S.^e, Leandro Koifman, M.D.^b,
 Fulvio Magni, Ph.D.^f, Maria Helena Ornellas, M.D., Ph.D.^c, Gilda Alves, Ph.D.^{c,g}

^a Department of Urology, Mário Kröeff Hospital, Rio de Janeiro, Brazil^b Department of Urology, Souza Aguiar Hospital, Rio de Janeiro, Brazil^c Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Circulating Biomarkers Laboratory, Department of Pathology, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil^d Department of Urology, Brazilian National Cancer Institute, Rio de Janeiro, Brazil^e Department of Engineering and Production, Faculdades Kennedy, Belo Horizonte, Brazil^f Department of Medicine and Surgery, University of Milano-Bicocca, Milan, Italy^g Research Coordination, Brazilian National Cancer Institute, Rio de Janeiro, Brazil

Received 11 January 2017; received in revised form 15 February 2017; accepted 2 May 2017

Abstract

Objectives: We have previously shown the importance of the complement system in differentiating between patients with squamous cell carcinoma of the penis (SCCP) and controls. These patients had low expression of C3a and C4 fragments. Therefore, in this study, we investigated the complement protein C3a as a potential circulating biomarker in these patients by a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test.

Patients and methods: Plasma samples from 39 patients with SCCP, 15 patients with prostate cancer, and 50 healthy male subjects were evaluated using the ELISA—Biobase OptEIA Kit human anti-C3a (BD). The nonparametric Mann-Whitney test was used for comparison of means among the groups.

Results: The complement protein C3a was found down expressed in patients with SCCP ($P < 0.05$) in comparison to either subjects with good health or subjects with prostate cancer.

Conclusion: Experimental validation of the down expression of C3a was well succeeded using a commercial ELISA kit. Complement system fragment C3a is down expressed in patients with SCCP. Besides, C3a is also low expressed in the plasma of patients with initial prostate cancer when compared to healthy subjects. These results suggest that the innate immune response might be suppressed in patients with these malignancies. © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Circulating biomarker; Plasma; Tumor microenvironment; Penile cancer; Human complement C3a-desArg/C4a-desArg; Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

1. Introduction

Squamous cell carcinoma of the penis (SCCP) represents 95% of the penile cancers. SCCP is considered a rare disease

in developed countries. On the contrary, in underdeveloped and emerging countries, SCCP is a neglected type of cancer, reaching up to 10% of male neoplasms in some areas [1,2]. The incidence of carcinoma of the penis varies according to circumcision practice, hygienic standard, phimosis, number of sexual partners, human papillomavirus infections, exposure to tobacco products, and other factors [2,3]. Thus, inflammatory processes can be directly associated with this type of cancer [4].

This work was financially supported by Programa de Oncobiologia and FAPERJ (APQ1 E-26/111.336/2013), Rio de Janeiro, Brazil.

* Corresponding author.

E-mail address: ornellasa@hotmail.com (A.A.Ornellas).

Metastases from penile carcinoma usually spread through penile lymphatic vessels to regional nodes. Recently, our group identified, applying the proteomic approach based on ClinProt platform, 2 differentially expressed peptides comparing the C8 MB eluted fraction of patients' vs. control subjects' plasma, that corresponded to the fragments of the C3a (*m/z* 1896.17) and C4 (*m/z* 2021.26) complement protein. Our results demonstrated that when the disease progresses, the fragments of C3a and C4 become more underexpressed [5]. These fragments seem to be mainly down-regulated in patients with metastatic involvement, and the innate immune response of patients could be suppressed [6]. Given these results, we decided to experimentally validate the expression of C3a in plasma of patients with SCCP comparing with results of plasma levels from patients with prostate cancer (PC) and from control cancer-free subjects, using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), which is a more affordable and low-cost test compared to the proteomic approach (mass spectrometry) used in discovery phase. Validation by the ELISA method is important because none of the proteomics methods are 100% safe and deviations may occur. In addition, the method that was used in the previous article is an expensive experimental method that does not apply to the laboratory examination routine. If the intention is to use C3a as routine marker, it must be validated using a routine method such as ELISA.

2. Patients and methods

2.1. Study population

The study involved a total of 104 human plasma specimens. First, we tested samples from 39 patients with penile cancer comparing them with 50 samples from healthy cancer-free male volunteers. In addition, 15 samples from patients with PC were also tested comparing them with samples from patients with penile cancer and samples from healthy controls. The mean age was 63 for patients with penile cancer and 67 for patients with PC. The mean age of healthy controls was 60 years. Patients and controls with active infections or autoimmune disorders were excluded. No patient received any form of systemic chemotherapy or any other neoadjuvant treatment before sample collection for the study.

Patients with SCCP were classified according to the 2002 Tumor, nodes, and metastasis system (TNM). The distribution of T category in all 39 cases included 6 (15%) with stage T1, 19 (48%) with stage T2, 11 (28%) with stage T3, and 3 (7.6%) with stage T4. The distribution of N category in all 39 cases included 20 (51%) with N0 stage, none with N1 stage, 5 (13%) with N2 stage, and 12 (31%) with N3. The remaining 2 patients (5%) were staged as NX because they refused lymphadenectomy. We defined stage stratification into group I (T1N0, T1N1, and T2N0–1), II

(T1N2, T2N2, and T3N0–2), and III (T1–3N3, T4 N0–3, and T4NX). Of the 39 cases, 15 (38%) were included in group I, 10 (25%) in group II, and 14 (36%) in group III. All tumors were classified according to the Broder's grading system. Overall, tumors from 10 (25%) patients were well differentiated, 27 (55%) were moderately differentiated, and 2 (5%) were poorly differentiated.

In 2006, Hungerhuber et al. [7] proposed a risk stratification based on clinical examination findings, stage, and grade. According to the histopathological results from 39 patients, the risk stratification group were separated into low-risk (T1G1 and T1G2), intermediate-risk (T2G1, T2G2, T3G1, and T3G2), and high-risk tumors (T1–3G3 and T4G1–3). Risk stratification revealed 6 cases (15%) with low risk, 28 (72%) with intermediate risk, and 5 (13%) with high risk.

Patients with PC were evaluated according to age, prostate-specific antigen level, Gleason score, and TNM stage. The main characteristics of patients with SCCP and PC are shown in Tables 1 and 2.

2.2. Ethics

This research was approved by the Ethical Committees of the Instituto Nacional de Câncer (#38/05) and from Hospital Universitário Pedro Ernesto, Universidade do

Table 1
Study population of patients with SCCP

Variables	No. (% or range)
Age, mean	63 (38–92)
Grade	
Well differentiated	10 (25%)
Moderately differentiated	27 (55%)
Poorly differentiated	2 (5%)
TNM: T—tumor; N—nodes; M—metastasis	
pT	
pT1	6 (15%)
pT2	19 (49%)
pT3	11 (28%)
pT4	3 (7.6%)
pN	
pN0	20 (51%)
pN1	0 (0%)
pN2	5 (13%)
pN3	12 (31%)
pNX (not available)	2 (5%)
M	
M0	39 (100%)
M1	0 (0%)
Risk classification	
I (T1G1, T1G2)	6 (15%)
II (T2G1, T2G2, T3G1 T3G2)	28 (72%)
III (T1–3G3 T4G1–3)	5 (13%)
Staging system classification	
I (T1N0, T1N1,T2 N0–1)	15 (38%)
II (T1N2, T2N2,T3 N0–2)	10 (23%)
III (T1–3N3, T4 N0–3, T4NX)	14 (36%)
Total	39 (100%)

Table 2
Study population of patients with prostate cancer

Variable	No. (% or range)
Age, mean	66 (54–74)
Gleason, median	7 (6–9)
PSA, mean	6.7 (0.9–18)
TNM: T—tumor; N—nodes; M—metastasis	
pT	
pT2c	5 (33%)
pT3a	9 (60%)
pT3c	1 (6%)
pN	
pN0	15 (100%)
M	
M0	15 (100%)
Total N	15

PSA = prostate-specific antigen.

Estado do Rio de Janeiro (CAAE: 46751515.2.0000.5259), including patients of these institutions and also patients from Mário Kröeff Hospital and Souza Aguiar Hospital. All 4 institutions are located in Rio de Janeiro city (Brazil). Informed consent was obtained from all patients and controls.

2.3. Sample collection

Patients' blood samples were collected before they underwent penile surgery or radical prostatectomy. Approximately 5 ml of blood was collected using BD vacutainer with Ethylenediamine tetraacetic acid, and approximately 2.5 ml of the plasma was obtained after centrifugation at 1500g for 10 minutes within 4 hours of collection. Plasma was immediately collected, aliquoted, and accordingly stored at –80°C until analysis.

2.4. Measurements of plasma levels of C3a complement by commercial ELISA

Plasma levels of C3a were measured using a commercially available solid phase sandwich ELISA, according to the protocols provided by the manufacturer (C3a ELISA kit, BD OptEIA; Catalog no. 550499; BD Biosciences, San Jose, CA). All samples were tested in duplicate, in accordance with the manufacturer's recommendations. Furthermore, all samples and controls were randomly assigned to wells for each test. Assays have no significant cross-reactivity with other complement component proteins.

In brief, 50 µl of ELISA diluent was added to each well of plate. Then added 100 µl of assay standard and diluted (1:500) test sample and then incubated at room temperature (20°C–25°C) for 2 hours. Plates were then washed with ELISA wash buffer for 5 times, and each well was incubated in 100 µl prepared working detection for 1 hour at room temperature. Then plates were washed with ELISA wash buffer for 7 times. Finally, plates remained in the dark with 100 µl of 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine substrate

solution reagent for 30 minutes, at room temperature. After this time, 50 µl of stop solution was added. Optical density was measured at 450 nm with correction at 570 nm using an automated microplate reader (BioTek—Software KC4 version 3.01). C3a levels were normalized to plasma protein levels patient and were reported in nanograms units per milliliter (ng/mL).

2.5. Statistical analysis

To evaluate differences in the concentration of circulating C3a among groups of patients with SCCP (classified by risk and by stage), healthy donors, and patients with PC, a nonparametric test was used because the normality assumption for these bases has been violated. As comparisons have only 2 categories, the nonparametric Mann-Whitney test was used for the comparison of core values among the categories. The survey data were treated in the statistical program PASW, version 18. In all statistical tests used, it was considered a 5% significance level. Thus, statistically significant associations are considered in those whose $P < 0.05$.

3. Results

Our results showed that the C3a plasma levels concentration (ng/ml) of the control group showed statistically significant difference when compared with plasma from patients with SCCP with Mann-Whitney test. When these patients were stratified into 3 stage groups, the concentrations also showed significant difference (Table 3).

Control group showed a higher median protein concentration (11.93 ng/ml) than that of the 3 stage groups (2.63, 3.04, and 2.69, respectively). Although the comparison between healthy controls and patients with SCCP were significant in this assay, we did not significantly correlate our results to distinguish the different stages. Table 4 shows that C3a plasma concentration (ng/ml) is also lower in patients with SCCP after stratification by the 3 different risk groups. Independently if it were a high risk or a low risk, C3a plasma concentration revealed to be down expressed in patients with SCCP. Although in this assay, we did not

Table 3
Comparison of C3a concentration (ng/ml) between controls and patients with SCCP stratified into 3 stage groups

C3a concentration (ng/ml)	N	Mean	Standard deviation	P25	Median	P75	P value
Control	50	11.43	4.63	8.22	11.93	15.81	<0.001
Total SCCP	39	3.71	2.22	2.20	2.68	5.97	
Stage 1 SCCP	15	3.76	2.46	2.20	2.63	5.97	<0.001
Stage 2 SCCP	10	4.10	2.55	2.12	3.04	6.33	<0.001
Stage 3 SCCP	14	3.38	1.77	2.43	2.69	3.82	<0.001

Table 4

Comparison of C3a concentration (ng/ml) between controls and patients with SCCP stratified into risk groups

C3a concentration (ng/ml)	N	Mean	Standard deviation	P25	Median	P75	P value
Control	50	11.43	4.63	8.22	11.93	15.81	<0.001
Total SCCP	39	3.71	2.22	2.20	2.68	5.97	
Risk 1 SCCP	6	3.66	2.37	1.89	2.50	6.59	0.001
Risk 2 SCCP	28	3.77	2.33	2.24	2.65	5.91	<0.001
Risk 3 SCCP	5	3.44	1.67	2.63	2.75	4.59	0.002

significantly correlate our results to distinguish the different risk groups.

Our results showed either a lower C3a plasma concentration in patients with PC when we compared with healthy subjects ($P < 0.001$). However, C3a levels plasma concentrations in patients with SCCP were lower when compared with PC patients group ($P = 0.003$) (Table 5).

4. Discussion

The link between cancer and inflammation was first proposed by Rudolf Virchow in the 19th century [8]. Virchow observed that long-term inflammation established an environment that promoted the initiation and growth of malignancy [9]. Complement is a central part of the innate immunity that serves as a first line of defense against foreign and altered host cells [10]. The complement system is composed of plasma proteins produced mainly by the liver or membrane proteins expressed on cell surface. Complement operates in plasma, in tissues, or within cells [11]. These proteins react between them to opsonize pathogens and induce a series of inflammatory responses that help to fight invading microorganisms. Complement system can be initiated depending on the context by 3 distinct pathways—classical, lectin, and alternative, each leading to a common terminal pathway. In a healthy individual, the alternative pathway is permanently active at low levels to survey for the presence of pathogens. This complement activation is tightly regulated to eliminate dying cells without further activation of other innate or adaptive immune components [12]. Complement is

only fully activated in cases of pathogen infection. During complement activation, soluble active fragments are released from C3a and C5. These bioactive peptides, C3a and C5a, were called anaphylatoxins because they were found to be potent multifunctional proinflammatory molecules, acting as chemotaxins and leukocyte activators [13].

The complement system proteins play a dual role in the tumor microenvironment. Their products, such as C1q, C3, C3a, C4, C5, and the membrane attack complex, are prominent features of the inflammatory status of the tumor microenvironment [14]. Classically, the complement system proteins play an important role in protecting against cancer through its direct and indirect cytotoxicity mediated by antibodies [15]. Unfortunately, neoplastic cells express a wide variety of defenses against the attack mediated by complement. The regulatory proteins bound to the membrane and complement inhibitors, including CD21, CD35, and CD46, inhibit the cytotoxic power of the complement system [16]. The interaction between the proteins of the complement system and the cancer cells in the tumor evasion is partly facilitated by neutralization of the complement attack. Evidence suggests that the improvement of lytic properties of complement proteins, such as the membrane attack complex, is an effective therapy against cancer [15]. At the same time, the complement protein such as C3a exhibited anti-inflammatory properties, which inhibit the subsequent amplification products of complement required for the cytotoxicity. Lately, numerous studies have explored the role of therapies mediated by complement proteins in fighting cancer [17–19]. There is a particular interest in the development of monoclonal antibodies against soluble inhibitors of the proteins from complement system expressed by various tumors. This strategy aims to improve the antitumor cytotoxicity and complement-mediated antibody. Although some studies show promising results [20], this strategy ignores the fact that the complement system also promotes, on occasion, progression and neoplastic development. Given this current scenario complex, there is a demand for more studies on the interaction of the complement system with cancer.

The inguinal lymphadenopathy is present in 50% of cases of penile cancer. However, only half of these patients have lymph node metastasis. Thus, there is a risk of 50% of patients being operated unnecessarily when all undergo a routine lymphadenectomy. At the same time, 20% of patients without lymph nodes at clinical examination present micrometastases. Given these facts, prophylactic bilateral inguinal lymphadenectomy is considered unnecessary in more than 80% of patients with SCCP and impalpable lymph nodes [2]. However, a reliable staging can only be obtained by performing lymphadenectomy and sending the lymph nodes for histopathologic analysis. The 10-year disease-free survival rate is 71% for patients who underwent immediate lymphadenectomy, whereas this percentage decrease to 30% for those who underwent delayed

Table 5

Comparison of C3a concentration of patients between the controls and patients with PC, and PC vs. SCCP

C3a concentration (ng/ml)	N	Mean	Standard deviation	P25	Median	P75	P value
Control	50	11.43	4.63	8.22	11.93	15.81	<0.001
PC	15	5.46	2.57	2.86	6.73	7.88	
PC	15	5.46	2.57	2.86	6.73	7.88	0.003
SCCP	39	3.71	2.22	2.20	2.68	5.97	

lymphadenectomy [2]. We need to find reliable noninvasive methods to predict the prognosis of the disease and establish fewer aggressive interventions for those patients at low risk for metastasis.

Low concentration of C3a could serve as a biomarker of new therapies that are emerging as targeted therapies and immunotherapy, or at least the cancer treatments should take into account the low immunity of these patients. Low concentration of C3a is probably a consequence of poor immunity in these patients.

It is now possible to measure an enormous number of biomarkers, but each must be investigated sufficiently to define its operating characteristics for diagnostic or prognostic predictions. Ultimately, clear definitions and better public access to information will enable the appropriate evaluation of biomarkers, reduce or eliminate redundant efforts, and focus attention on research capable of answering critical questions [21]. In our previous study, we demonstrated the down-regulation of C3a and C4 in plasma of patients with SCCP when compared with healthy subjects [5]. Patients with more aggressive disease presented lower levels of C3a and C4. In our present study, we experimentally validated the down expression of C3a in the plasma of patients with SCCP using a commercial ELISA. Patients with SCCP were also separated according to risk stratification. However, in our analysis, there was no difference between patients with SCCP with more aggressive disease and those with milder disease. Although the mean concentration of C3a is inferior in patients with SCCP presenting with more advanced tumors, these results were not statistically significant. The intention of this study was to validate our previous results. Maybe after future studies with a larger number of samples of patients with penile cancer in several stages, the objective of differentiating patients according to the stage could be achieved. Although biomarkers have to be predictive or prognostic or both, we tend to believe that in the future the low expression of C3a can be used as a useful marker for penile cancer and perhaps for other types of cancer. Validation of our previous results by a commercial method was a necessary first step before further studies. In future, there is a need for a larger prospective study to test whether there is a correlation between tumor burden, extensive lymph node involvement, and metastatic disease with low expression of C3a fragment, and whether this low expression is important for monitoring treatment control and early detection of recurrence after treatment.

In our previous study [5], we noticed that the combination of C3a and C4 fragments were able to discriminate patients with different stages of cancer. This study suggests that even C3 is a marker of the presence of the SCCP, and it alone did not allow distinguishing the different clinical situations. However, it was possible to confirm the down expression of C3a in the plasma of patients with SCCP and also in PC. In fact, C3a was down expressed in patients with penile cancer and PC when compared with healthy

subjects ($P < 0.001$ in both cases). In addition, C3a levels were significantly lower in SCCP ($P = 0.003$), when they were compared with the levels in patients who had initial PC, turning C3a a promising biomarker. Down expression of C3a may be important in other types of cancer, and this hypothesis deserve to be tested in futures studies. Patients with PC were not included to validate the results of patients with penile cancer but because we were curious to know whether lower expression of C3a would occur in other types of cancer. For this, we did a pilot study with patients who would undergo radical prostatectomy. As the results were expressive in relation to the decrease in C3a, we were obliged to include these results in our study. Thus, the decreased C3a levels may not be reflective only of SCCP, but generalized immune compromise. This may be due to the cancer, or the cancer may be as a consequence of diminished immune status. What was seen in the patients with PC may support this; patients with initial PC may have less diminished immune system than patients with SCCP. It has been clear for years that the immune system is down-regulated in cancer patients. However, our results open the possibility for immunological treatments, that is, to activate the immune system in patients with penile cancer. Of course, this has not yet been done, but it could be tried, as immunological treatments have given results with other types of tumors.

5. Conclusion

Experimental validation of the down expression of C3a was well succeeded using a commercial ELISA kit. C3a is truly down-regulated in the plasma of patients with SCCP, being a strong circulating biomarker candidate. Besides, C3a is also low expressed in the plasma of patients with PC when compared to healthy subjects. These results suggest that the innate immune response might be suppressed in patients with these malignancies. Down expression of C3a may be important in other types of cancer, and this hypothesis deserve to be tested in futures studies.

References

- [1] Misra S, Chaturvedi A, Misra NC. Penile carcinoma: a challenge for the developing world. *Lancet Oncol* 2004;5:240–7.
- [2] Ornellas AA, Kinchin EW, Nóbrega BL, et al. Surgical treatment of invasive squamous cell carcinoma of the penis: Brazilian National Cancer Institute long-term experience. *J Surg Oncol* 2008;97:487–95.
- [3] Ravi R. Correlation between the extent of nodal involvement and survival following groin dissection for carcinoma of the penis. *Br J Urol* 1993;72:817–9.
- [4] Mosconi AM, Roila F, Gatta G, et al. Cancer of the penis. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005;53:165–77.
- [5] Ornellas P, Ornellas AA, Chinello C, et al. Downregulation of C3 and C4A/B complement factor fragments in plasma from patients with squamous cell carcinoma of the penis. *Int Braz J Urol* 2012;38:739–749.
- [6] Pardoll D. Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol* 2003;21:807–39.

- [7] Hungerhuber E, Schlenker B, Karl A, et al. Risk stratification in penile carcinoma: 25-year experience with surgical inguinal lymph node staging. *Urology* 2006;68:621–5.
- [8] Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010;140:883–99.
- [9] Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001;357:539–45.
- [10] Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, et al. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 2010;11:785–97.
- [11] Kolev M, Le Friec G, Kemper C. Complement—tapping into new sites and effector systems. *Nat Rev Immunol* 2014;14:811–20.
- [12] Merle NS, Church SE, Fremaux-Bacchi V, et al. Complement system Part I—molecular mechanisms of activation and regulation. *Front Immunol* 2015;6:262, <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2015.00262>;[eCollection 2015].
- [13] Kohl J. Anaphylatoxins and infectious and non-infectious inflammatory diseases. *Mol Immunol* 2001;38:175–87.
- [14] Niculescu F, Rus HG, Retegan M, et al. Persistent complement activation on tumor cells in breast cancer. *Am J Pathol* 1992;140:1039–43.
- [15] Gelderman KA, Tomlinson S, Ross GD, et al. Complement function in mAb-mediated cancer immunotherapy. *Trends Immunol* 2004;25:158–64.
- [16] Fishelson Z, Donin N, Zell S, et al. Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors. *Mol Immunol* 2003;40:109–23.
- [17] Blok VT, Daha MR, Tijssma OM, et al. A possible role of CD46 for the protection in vivo of human renal tumor cells from complement mediated damage. *Lab Invest* 2000;80:335–44.
- [18] Campos MM, de Souza MH, Pires V, et al. Clinical implications of natural killer cytotoxicity in patients with squamous cell carcinoma of the penis. *Nat Immun* 1998;6:256–62.
- [19] Pio R, Corrales L, Lambris JD. The role of complement in tumor growth. *Adv Exp Med Biol* 2014;772:229–62.
- [20] Gelderman KA, Kuppen PJ, Bruin W, et al. Enhancement of the complement activating capacity of 17-1A mAb to overcome the effect of membrane-bound complement regulatory proteins on colorectal carcinoma. *Eur J Immunol* 2002;32:128–35.
- [21] Robb MA, McInnes PM, Calif RM. Biomarkers and surrogate endpoints developing common terminology and definitions. *J Am Med Assoc* 2016;315:1107–8.



Proteomics analysis of tissue samples from patients with squamous cell carcinoma of the penis and positive to human papillomavirus

Leandro Koifman^{1,2,3}, Paulo Ornellas^{3,4}, Antonio Augusto Ornellas^{2,5}, Denise de Abreu Pereira^{3,6,7}, Benedeta Russolina Zingali⁷, Silvia Maria Baeta Cavalcanti⁸, Larissa Alves Afonso⁸, Vanessa Sandim^{3,7}, Gilda Alves³

¹Serviço de Urologia, Hospital Municipal Souza Aguiar, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil; ²Serviço de Urologia, Hospital Mário Kröeff, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil; ³Serviço de Hematologia, Instituto Nacional de Câncer - Laboratório de Genética Aplicada, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil;

⁴Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas (PGCM), Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil; ⁵Departamento de Urologia, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brasil;

⁶Instituto Nacional de Câncer - Programa de Carcinogênese Molecular, Coordenação Geral de Ensino e Pesquisa, Rio de Janeiro, Brasil; ⁷Universidade Federal do Rio de Janeiro - Instituto de Bioquímica Médica, Unidade de Espectrometria de Massas e Proteômica, Instituto Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem (INBEB), Rio de Janeiro, Brasil; ⁸Universidade Federal Fluminense - Laboratório de Diagnóstico Virológico, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto Biomédico, Rio de Janeiro, Brasil

ABSTRACT

Purpose: The aim of this study was to identify possible protein biomarkers and/or candidates for therapeutic targets in tissues of patients with SCCP, infected by HPV, applying one dimensional electrophoresis (1DE), followed by direct mass spectrometry (MS) analysis.

Materials and Methods: Tissues from 10 HPV positive patients with SCCP and from 10 patients with HPV negative non-tumorous penile foreskins were analyzed applying 1D electrophoresis, followed by analysis with direct mass spectrometry (MS).

Results: Sixty-three different proteins were identified in the first group and 50 in the second group. Recognition was possible for 28 proteins exclusively detected in Group 1 and 21 proteins presented only in Group 2.

Conclusion: Some proteins in the first group are directly involved in the development of other types of cancer, and therefore, suitable for analysis. Complement C3 protein is a strong candidate for evaluating SCCP patients.

ARTICLE INFO

Key words:

Carcinoma, Squamous Cell; Penis; Human papillomavirus

Int Braz J Urol. 2014; 41: 642-54

Submitted for publication:
January 31, 2014

Accepted after revision:
June 25, 2014

INTRODUCTION

Cancer of the penis is a rare neoplasm with a high incidence in developing countries. This fact clearly indicates the disease's association with local

economic conditions (1). Penile cancer has a low overall incidence, representing approximately 0.4% of malignancies in the United States. In Brazil, despite the high incidence in some regions, this disease accounts for about 2.1% of malignancies (2, 3). A

recent Brazilian epidemiologic study on penile carcinoma revealed the profile of these patients (4).

The etiology of penile cancer has not been fully elucidated. However, its incidence varies according to the practice of circumcision, personal hygiene, presence of phimosis, human papillomavirus (HPV) infection, and tobacco use (5-9). The mechanism of tumor induction and promotion related to HPV infection is not completely understood. It is believed that the incorporation of viral DNA to the human genome leads to hyper-expression of viral genes E6 and E7 and inactivates the host cell's tumor suppressor gene products p53 and pRb (10).

The presence and extent of inguinal metastases are the most important prognostic factor related to the survival of patients with penile carcinoma. At the time of its initial presentation, 50% of patients with SCCP have inguinal lymphadenopathy; however, only half of these actually show metastatic lymph node involvement. Furthermore, 20% of patients with clinically negative inguinal lymph nodes have micro-metastases that will only be diagnosed by histopathologic examination of surgical specimens obtained from lymphadenectomy, a procedure associated with a significant morbidity (1, 4). Therefore, SCCP remains a challenge for the urologist, because there is no consensus for an appropriate therapy for all forms of disease presentation. The possibility of using reliable biomarkers to predict disease prognosis and to establish procedures less aggressive for patients at low risk for metastasis becomes necessary. In this sense, the development of more accurate molecular diagnostic methods and prognostic value tumor markers is essential.

Proteomics is the large-scale identification of proteins. Proteomics technologies are currently under development and several methodological approaches can be applied depending on the objectives. The great advantage of proteomics over genomics or transcriptomics studies is that the real functional molecules of the cell are being studied. Therefore, in this study, the aim was to identify possible protein biomarkers and/or candidates for therapeutic targets in tissues of patients with SCCP, infected by HPV, applying

one dimensional electrophoresis (1DE), followed by direct mass spectrometry (MS) analysis.

MATERIALS AND METHODS

Patients and controls

Between January 2009 and December 2011, 20 patients treated at three health institutions in the state of Rio de Janeiro were recruited and divided into two groups for prospective tissue proteomic analysis. Group 1 was composed of 10 patients with positive HPV malignant SCCP treated at the Brazilian National Cancer Institute (INCA) and Mario Kröeff Hospital. Group 2 (control group) was composed of 10 patients with HPV negative non-tumorous penile foreskins collected at Santa Veronica Hospital after circumcision procedures. HPV typing was performed as previously published (11, 12) and reported (13).

Pathological material was reviewed in both groups and all tumors were histologically classified based on Broders' system. Only two pathologists were responsible for reviewing the specimens. The clinical and pathological staging for Group 1 was done according to the 2002 TNM classification system. Patients' treatment varied according to primary tumor presentation. The distribution of T and N categories is shown in Table-1. The criterion for performing a radical inguinal lymphadenectomy (RIL) in all cases was the stage, grade and/or presence of lymphovascular invasion. Two patients with stage T1 underwent lymphadenectomy. The first presented unilateral inguinal lymphadenopathy and the second presented grade 2 tumor. In our services, we only do not perform RIL in patients with stage T1N0M0 grade 1 tumor without lymphovascular invasion ages ranged from 38 to 90 years (mean, 63.56) for Group 1 and 23 to 83 years (mean, 60) for Group 2. The pathological variables studied were histological type, grade of tumor differentiation, corpus spongiosum and/or infiltration of the corpora cavernosa, urethral infiltration, and inguinal lymph nodes involvement. Patient recruitment did not take into account any criteria of poor prognosis, and the tissue specimens were randomly selected respecting the number of pre-established patients for the study. All patients involved in the current study gave their

Table 1 - Histopathologic findings, pathologic staging and treatment option for patients from group 1.

Pts	Histology	Grade	Stage TNM	HPV type	Surgery
1	Squamous cell carcinoma	G2	T4N2Mx	MY-/16+	Total Amputation + Bilateral RIL
2	Squamous cell carcinoma	G1	T2N3Mx	MY-/18+	Partial Amputation + Bilateral RIL
3	Squamous cell carcinoma	G2	T2N0Mx	16+;45+	Partial Amputation + Bilateral RIL
4	Squamous cell carcinoma	G2	T2N0Mx	MY-/18+	Partial Amputation + Bilateral RIL
5	Squamous cell carcinoma	G1	T1N1Mx	MY-/45+	Partial Amputation + Bilateral RIL
6	Squamous cell carcinoma	G2	T1N0Mx	45+	Partial Amputation + Bilateral RIL
7	Squamous cell carcinoma	G1	T2N0Mx	MY-/16+ 45+	Partial Amputation + Bilateral RIL
8	Squamous cell carcinoma	G2	T2N1Mx	MY+/45+	Partial Amputation + Bilateral RIL
9	Squamous cell carcinoma	G2	T2N1Mx	MY+/16+	Partial Amputation + Bilateral RIL
10	Squamous cell carcinoma	G2	T2N0Mx	MY-/45+	Partial Amputation + Bilateral RIL

RIL = Radical Inguinal Lymphadenectomy; MY-MY09/11 Consensus Primers

informed consent. This study was approved by the Brazilian National Cancer Institute Ethical Board (registrations # 38/05 and 67/07). Because this was a pilot study and unprecedented in literature the number of patients was pre-established in both groups in the design of work, aiming preliminary results for further investigation. The only exclusion criterion was positivity for HPV in the control group. Our study aimed qualitative detection of proteins in the 2 groups not being our objective to quantify the identified proteins. All tests in tumor samples from patients revealed the presence of HPV. Because of the rarity of HPV-negative patients, a second study with HPV-negative patients will be necessary.

Tissue protein extraction and quantification

Tissues were macerated in 200µL of lysis buffer (7 M urea, 2 M Thiourea, 4% CHAPS and

1% DTT) with the addition of 0.2-mM PMSF. This mixture was stirred for 1 hour at room temperature and then centrifuged at 14.000g for 15 minutes. The supernatant was collected and stored at -80°C (14) until experimentation.

The protein extracts were quantified by 2D Quant Kit (GE Healthcare, Cat #. 80-6483-56), according to the manufacturer's instructions. Measurement was performed at 650 nm in Elisa Spectra Max 190 device from Molecular Devices. The analysis of quantification was performed by the program SOFT® Pro 4.3 max, Life Sciences Edition.

Gel 1D

After quantification, two protein pools were formed with 10 SCCP tissues and with 10 control tissues, separately. Each pool contained 3.3µg of proteins from each sample, a total of

33 μ g. The CCP and control pools were applied on a 12% SDS-PAGE gel. Proteins were separated in Tris-Glycine buffer (25-mM Tris and 250-mM Glycine pH 8,3) and 0.1% SDS at 80 V and 50 mA (15). The proteins were visualized with Coomassie blue G-250. The gels were scanned on Image ScannerTM (GE Healthcare) using the program Labscan™ (GE Healthcare) for protein lanes reading.

Mass spectrometry analysis

The lanes were fractioned in approximately 2-5 mm slices. The bands in the slices were destained in a solution of 25-mM ammonium bicarbonate (NH_4HCO_3) pH 8.8/50% and acetonitrile (ACN) overnight on a shaker, at room temperature. To reduce proteins, the gel was incubated with 10-mM DTT in 25-mM NH_4HCO_3 at 56°C for 1 hour. The supernatant was discarded and the gel was washed in a solution of 25-mM NH_4HCO_3 twice. After protein disulfide bonds were reduced, cysteines were alkylated with iodoacetamide 55 mM for 45 minutes at room temperature in the dark. The supernatant was discarded and the gel was washed with 25-mM NH_4HCO_3 solution in 50% ACN. The supernatant was removed again and gel slices were dehydrated with 100% ACN for 5 minutes and posteriorly in a vacuum centrifuge. Proteins were digested with trypsin (Promega) 10ng/ μ L dilution, overnight, at 37°C. After digestion with trypsin, peptides were extracted from gels by adding a solution containing 0.1% formic acid/50% ACN for 30 minutes. This solution was transferred to another tube and the procedure was repeated twice. The samples were completely dried in a vacuum centrifuge. The pellets were resuspended in water and purified through Ziptip Perfect Pure C18 (Eppendorf, cat # 0030.008.405) and then dried in a vacuum centrifuge.

For mass spectrometry analysis, the peptides were resuspended in 20 μ L of acetonitrile 3% and acid formic 0.1% solution. The peptides were analyzed by mass spectrometer ESI-Q/TOF Micro (Waters) linked to a nanoACQUITYUPLC® (Waters). The peptides were loaded on symmetric C18 trap column (Waters) followed by fraction in a nanoEase BEH 130 C18 100 mm × 100 μ m column (Waters) at a flow rate of 0.5 μ L/min and eluted with a linear acetonitrile gradient (from 10 to 50%) of

0.1% formic acid. Spectrometer analysis was performed on positive mode. Acquisition parameters on mass spectrometer was: cone voltage 30 V, capillary voltage 3500 V, source temperature 80°C, scanning a mass-to-charge ratio (m/z) MS mode 400-2000 and MS/MS mode 50-2000. The three ions with more intensity with charge states of +2, +3, or +4 were selected for MS/MS fragmentation. The reference ion used was the monocharged ion m/z 588.8692 of phosphoric acid. The data acquisition was performed by MassLynx 4.0 software (Micromass/Waters) and the process data by proteinLynx Global Service (PLGS 2.4, Waters).

Proteins were identified by correlation of tandem mass spectra to the NCBInr proteins database, using Mascot on-line (Matrix Science, London, UK - http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS) with restricted taxonomy Homo sapiens. The NCBI (National Center for Biotechnology Information) protein database is an on line collection of sequences from several sources, including translations from annotated coding regions in GenBank, RefSeq and TPA, as well as records from Swiss-Prot, PIR, PRF, and PDB; "nr" refers to non-redundant protein sequences. The NCBI is a division of the National Library of Medicine (NLM) at the National Institutes of Health (NIH), USA. The parameters were as follows: MS and MS/MS tolerance of 0.1 Da, tryptic specificity allowing for one missed cleavage, fixed modification of carbamidomethylation of cysteine residues, and variable modification of oxidation of methionine, phosphorylation of tyrosine, serine and threonine residues and propionamide. Positive protein identification was accepted with at least two peptides with a Mascot peptide score ≥35.

RESULTS

The pathological features of the primary tumor and inguinal lymph nodes, the type of treatment instituted, and the HPV type (13) for each patient from Group 1 are described in Table-1.

The protein extracts obtained from Groups 1 and 2 were separated by electrophoresis in a 12% SDS-PAGE gel. The protein bands of each group were identified and compared for differen-

ces. Twenty-six protein spots from Group 1 and 21 from Group 2 were identified, sliced out from the gel and analyzed through mass spectrometry (Figure-1). Sixty-three different proteins were identified in Group 1 and 50 in Group 2. After a comparative analysis of both groups, it was possible to recognize 28 proteins exclusively detected in Group 1 and 21 proteins presented only in Group 2 (Tables 2 and 3).

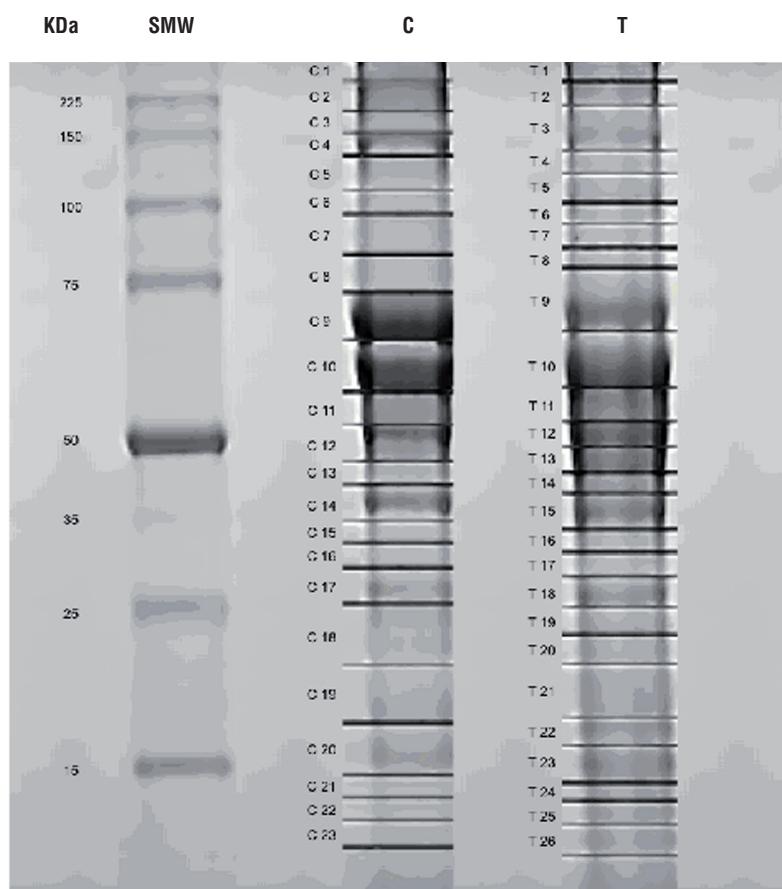
DISCUSSION

A large number of proteins were identified in both Groups 1 and 2. Some of these proteins

found in Group 1 are also directly involved in the development of other types of cancers and therefore, suitable for analysis.

The major stress-inducible heat shock protein, Hsp70, that is a chaperone protein abundantly and preferentially expressed in tumors, was detected in Group 1. Owing to the ability of Hsp70 to protect cells from a wide range of apoptotic and necrotic stimuli, it has been assumed that Hsp70 may confer survival advantage to tumor cell lines. Nylandsted et al. (16) demonstrated that the depletion of Hsp70 by an adenovirus expressing antisense Hsp70 resulted in a massive cell death of tumorigenic cell lines of breast, colon, prosta-

Figure 1 - 1DE analysis of tissue samples from SCCP HPV patients and control group. Each pool contained 3.3 μ g of proteins from each sample, a total of 33 μ g. The SCCP and control pools were applied on a 12% SDS-PAGE gel. The gel was stained with Coomassie blue G. The markers and numbers in gel represent the sections that were excised for mass spectrometry analysis.



T=penile cancer SCCP; C=control group; SMW=Standard Molecular Weight

Table 2 - Proteins identified in pool of patients with SCCP (Group 1)

Gel Slice	NCBI ID	Proteins	Score	Representative Peptides	KEGG	Function	Cell Compartment
T1	gi 179212	Na+ K+ ATPase alpha subunit	41	R.SPDFTNENPLETR.N K.ALELDSNLRY.R.I K.HSQAVEELAEQLEQTKR.V	hsa:476	ATP biosynthesis	Cell membrane
T2; 3	gi 189036	Nonmuscle myosin heavy chain (Myosin 9)	78		hsa:4627	Cell communication	Cytosol
T2	gi 1296662	Plectin	74	R.SQVEEEFLFSVR.V K.VLALFEPSPAAPTLL.R.S	hsa:5339	Apoptosis	Cytosol, cytoskeletal
T2	gi 93141049	Collagen alpha-1 (XII) chain short isoform precursor	60	R.WVSPVDTGPSESVVPGNTR.M	hsa:1303	Cell adhesion	Extracellular matrix
T5	gi 4507677	Endoplasmic	44	K.SILFVPTSAAPR.G	hsa:7184	Proteins processing	Cytosol
T6	gi 223170	Fibrinogen gamma	58	K.EFGFGLHSPTGTTTFLWLGNEK.I K.MLEEIMKYEASILTHDSSIR.Y K.AIQLTYNPDESSKPNMIDAATLK.S	hsa:2266	Blood coagulation	Secreted
T9	gi 5729877	Heat Shock cognate 71-kDa protein isoform 1	41	K.DAGTAGLNIVRL.I (U)	hsa:3312	Stress response, transcription regulation	Cytosol, nucleus, cell surface
T11	gi 2982019	Chain B, Fab Fragment of engineered Human Monoclonal Antibody A5b7	47	K.GPSVPLAPCSR.S / R.STSESTAALGCLVK.D / E.VQLLESGGGGVQPGGSLR.L	Unknown	Cell defense	Secreted
T11; 12	gi 178375	Aldehyde dehydrogenase	44	K.LPEWAADEPVEKT.T / R.SLEEAIQFINQR.E	hsa:218	Glycolysis, metabolism of amino acids and xenobiotics	Cytosol
T13	gi 4503571	Alpha-enolase isoform 1		R.GNPTVEVLFTSK.G / R.YISPDLQIADLYK.S / K.VNQIGSVTESLQACK.L / K.YNQLRIEEELGSKA / K.LAMQEFMILPVGAANFR.E + 2 Oxidation (M) / R.EIFDSRGNPVTVEVLFTSK.G / K.DATNVGDEGGFAPNILENKEGLELLIK.T	hsa:2023	Glycolysis; glconeogenesis	Cytosol

T13	gi 1710248	Protein disulfide isomerase-related protein 5	55	R.TGEAVDAAALSALR.Q / K.LAAVADATVNQVLASR.Y	hsa:10130	Proteins processing	Endoplasmatic reticulum
T13	gi 31170	Chain A, Crystal Structure Of Human Beta Enolase Enob	44	K.VNQIGSVTESIQACK.L	hsa:2027	Glicolysis	Cytosol,fosfopiruvat hydratase complex
T13	gi 40068518	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	42	K.IISYAQQGFMLLR.Q + Oxidation (M) / K.GILFVGSGVSGGEEGAR.Y	hsa:5226	Pentose pathways	Cytosol
T14	gi 4505763	Phosphoglycerate kinase 1	39	K.ITLPVDFVTADKFDENAK.T	hsa:5230	Glicolysis	Cytosol
T14	gi 306882	Haptoglobin precursor	36	K.VTSIQDWVQK.T / K.SPVGVQPILNETHFCAGMSK.Y + Oxidation (M)	hsa:3240	Defense	Secreted
T15	gi 35222	70-kDa heat shock protein	43	R.TTPSYVAFTDTER.L (U)	hsa:3312	Regulation of cell cycle; cellular membrane organization	Cytosol; plasma membrane
T16	gi 63252913	Macrophage-capping protein	44	R.QAAALQVAEGFISR.M	hsa:822	Actin filament organization	Cytosol
T17	gi 5174391	Alcohol dehydrogenase [NADP+]	44	K.GLVQALGLSNFNFSR.Q / R.GLEVTAYSPLGSSDR.A	hsa:10327	Glicolysis, glicerolipids metabolism	Cytosol
T17	gi 31397	Fibronectin precursor	40	R.VPGTSTSATITGLIR.G	hsa:2335	Angiogenesis, cell adhesion, platelet activation and degranulation	Secreted, extracellular matrix
T18	gi 31645	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	46	R.GALQNIIPASTGAAK.A / R.VPTANVSVDLTCR.L / K.LISWYDNEFGYSNR.V / K.LTGMAFRVPTANVSVDLTCR.L + Oxidation (M) / K.IKWGDAGAEYYWESTGVFTTMEKA + Oxidation (M) / K.VIHDNFGIVEGLMTTVHATATQK.T + Oxidation (M)	hsa:2597	Glycolysis	Cytosol, plasma membrane

T19; 20	gi 809185	Chain A, The Effect Of Metal Binding On The Structure Of Annexin V And Implications For Membrane Binding	52	RSEIDLNFNIRK / KGLGTDEESILLLTTRS / KWGTDEEKFITIFGTR / RGTVTDFFGFDERADAEATLRK	hsa:308	Blood coagulation	Cytosol
T19	gi 2906146	Malate dehydrogenase precursor	46	K.IFGVTTLDIVR.A / K.VDFPQDQLTALTGR.I	hsa:4191	Citric acid cycle	Mitochondria
T19	gi 4826643	Annexin A3	37	K.MLISLTER.S + Oxidation (M) / K.GAGTNEDALIEILTTR.T	hsa:306	Defense response	Phagocytic vesicle
T19	gi 4929769	Glyoxalase domain-containing protein 4 (CGI-150 protein)	36	K.LTPLYSLDTPGKA (U)	hsa:51031	Unknown	Mitochondria
T20	gi 4502599	Carboxyl reductase [NADPH] 1	46	R.LFGSDWMLTAR.D / R.VVNSSMSVR.A / R.GQAAV/QQLQAEGLSPR.F / K.VADPTPFHIIQAEVTMK.T + Oxidation	hsa:873	Lipid metabolism – arachidonic acid	Cytosol
T23	gi 9844110	cAMP-specific phosphodiesterase 4D	42	K.LSPVISPR.N	hsa:5144	Smooth muscle contraction; regulation of receptor activity	Cytosol
T24	gi 2204207	Glutathione S-transferase	75	M.PPYTVVYFPVVR.G - M.PPYTVVYFPVVR.G + Oxidation (M) M.PPYTVVYFPVVR.G K.EEVVTVETWQEGSLKA K.FQDGDLTLYSQSNTLRL.H K.ALPGQQLKPFFETLISQNQQGGKT K.YISLIYTNYEAGKDDYVK.A	hsa:2940	Amino acids metabolism	Cytosol
T26	gi 181250	Cyclophilin	20	K.TVDNFVALATGEK.G	hsa:5480	Signal transduction	Cytosol

te, and liver. The authors advocate that Hsp70 is a prerequisite for the survival of human cancer cells. Similarly, Aghdassi et al. (17) demonstrated that the depletion of Hsp70 by short interfering RNA treatment induced apoptosis in pancreatic adenocarcinoma.

Plectin is a cytolinker protein of the plakin family. Plakins connect intermediate filaments to desmosomes and hemidesmosomes, stabilize cells mechanically, regulate cytoskeleton dynamics, and serve as a scaffolding platform for signaling molecules. Niwa et al. (18) reported that Plectin misexpression leads to displacement of the centrosome, therefore contributing to genomic instability and cancer development. Nevertheless, plectin is not expressed by most normal tissues, with the exception of the skin and genitourinary tract. Interestingly, we have detected plectin solely in Group 1. Complement plays a central part of the innate immune system, providing a highly effective means for destruction of invading microorganisms: clearance of immune complexes; and elimination of dead, apoptotic, and tumor cells. During the evolution of a cancer cell, neo-antigens are produced. These elements distinguish cancer cells from their normal counterparts and may well be recognized by the immune system, eliminating many or most tumors (19, 20). Although most *in vivo* observations support that many cancers activate the autologous complement system, it is also well-known that the efficiency of complement-mediated tumor cytotoxicity is hampered by various protective mechanisms (21). In this work, human complement C3 was detected only in Group 2. A possible explanation for these findings lies on the theory that patients with malignancies have a poorer immune response. Our result corroborates the study of Ornellas et al. (22), in which the authors have demonstrated that human complement fragments C3 and C4A/B were downregulated in plasma of patients with SCCP. In the present series, all patients from Group 1 were HPV positive and this could explain the absence of complement C3 because viral proteins counteract the immune response (23).

Enolase is a key glycolytic enzyme that has been used as a diagnostic marker to identify human lung cancers (24). Higher α -enolase plasma

levels were also identified in patients with renal cell carcinoma (25). In cancer cells, enolase is overexpressed and localizes on their surface, where it acts as a key protein in tumor metastasis, promoting cellular metabolism in anaerobic conditions and driving tumor invasion through plasminogen activation and extracellular matrix degradation. It also displays a characteristic pattern of acetylation, methylation, and phosphorylation that regulates protein functions and immunogenicity. In the present study, alfa and beta enolase isoforms were identified exclusively in Group 1. This finding may suggest that in the future, enolase can be used as a possible clinical biomarker. Nevertheless, further studies are needed to corroborate these findings and to determine the usefulness of this protein in clinical scope.

Prohibitin is a potential tumor suppressor, which was originally identified because of its anti-proliferative activities. The human prohibitin gene was identified and cloned in 1991, as a result of a search for potential tumor suppressors, on the basis of its anti-proliferative activities (26). Furthermore, prohibitin is capable of inhibiting cell proliferation by repressing the transcriptional activity mediated by E2F which regulates many genes involved in the transition G1/S and DNA synthesis (27). In addition to transcriptional repression, prohibitin can induce p53-mediated transcription, indicating that prohibitin may have dual functions in modulating transcription (28).

In a study conducted by Joshi et al. (29), the authors supported this theory by demonstrating that prohibitin can differentially regulate the Yin-Yang 1 and caspase 7 gene promoter activities. Additional functions related to prohibitin were linked to cell apoptosis (30). In this series, prohibitin was exclusively presented in Group 2, supporting its potential tumor suppressor activity. The critical functions of prohibitin in growth control and transcriptional regulation clearly indicate the need for further investigations to elucidate its importance in SCCP development.

To our knowledge this is the first study that analyzed penile tumors through proteomics technologies. Unfortunately, as all samples in our analysis were typed as HPV +, it was not possible to perform a comparison concerning HPV status

Table 3 - Proteins identified in pool of patients with non-tumor tissue (Group 2).

Gel Slice	NCBI ID	Proteins	Score	Representative Peptides	KEGG	Function	Cell Compartment
C1	gi 78101267	Chain A, Human Complement Component C3	57	K.TIYTFGSTVLYR.I R.IPIEDGSGEVLRSR.K R.LVAYYTLIGASGQR.E R.IANLQTDLSGFL.R.L R.SAGQQGEVLYVEDPAGHQEEAK.V K.LDVQFSGLT.K.G K.SPFVSVAVSPSLDLSK.I R.EGPYSISIVLYGDEEVPR.R.S R.FGGEHVNPNSPFGVATLAGDQPSV/QPPLR.S	hsa:718	Inflammatory response; innate immunity; lipid metabolism	Secreted
C2	gi 28243	Filamin A	49	R.SAGQQGEVLYVEDPAGHQEEAK.V K.LDVQFSGLT.K.G K.SPFVSVAVSPSLDLSK.I R.EGPYSISIVLYGDEEVPR.R.S R.FGGEHVNPNSPFGVATLAGDQPSV/QPPLR.S	hsa:2316	Actin coupler	Cytosol
C3	gi 2104553	Myosin heavy chain (MHY11) (5'partial)	59	K.HAQAVEEELTEQLEQFK.R.A R.ALEEALAEAKEELER.T K.IAQLEEQVEQEAREK.Q R.VAVEEVDEEGKFVR.L	hsa:4629	Vascular muscle contraction; cell communication	Extracellular matrix
C7	gi 34228	Pretamin-A/C isoform 1 precursor; lamin A protein; progenin	56	R.VAVEEVDEEGKFVR.L	hsa:4000	Intermediate filament	Nucleus
C7	gi 386758	GRP78 (Glucose-regulated protein 78) precursor	45	R.ITPSYVVAFTPEGER.L R.IINEPTAAAIAYGLDKR.E	hsa:3309	Anti-apoptosis	Endoplasmic reticulum
C7	gi 23200154	Chain A, NMR Structures Of The C-Terminal Globular Domain Of Human Lamin AC	43	R.VAVEEVDEEGKFVR.L	hsa:4000	Structural molecule activity	Nucleus
C8	gi 762885	Plakoglobin	72	K.SAIVHLINYQDDAELAT.R.A R.ALMGSPQLVAAVVR.T Oxidation (M) R.LVQNCWLWTLR.N R.NEGTATYAAAVLFR.I K.SLEYLDLSFNQIAR.L	hsa:3728	Cell adhesion, cell migration	Cytosol; plasmatic membrane
C8	gi 642534	Lumican	42	K.FYLGYEVTAIR.N	hsa:4060	Collagen fibrils organization	Extracellular matrix
C8	gi 110590597	Chain A, Apo-Human Serum Transferrin (Non-Glycosylated)	36	K.FYLGYEVTAIR.N	hsa:7018	Mineral absorption	Secreted
C10	gi 35505	Pyruvate kinase	39	R.TATESFASDPILYRPVAV/ALDTKGPEIR.T R.EEAIAIYHQLFFELRR.L	hsa:5315	Glycolysis	Cytosol; plasmatic membrane

C11; 13; 15, 16	gi 3411130	Mutant Desmin	48	R.FLEQQNAALAAEVNRL	hsa:1674	Cytoskeleton structural protein activity	Intermediate filament
C13	gi 340219	Vimentin	60	K.ILLAELEQLKG K.ILLAELEQLKGQQKS	hsa:7431	Apoptosis; cell mobility	Cytosol
				K.LQEEMLQREEAENTLQSER.Q Oxidation (M) R.QVQSLTCEVDALKGTNESLER.Q R.EYDILLNVK.M			
C13	gi 704416	Elongation factor Tu	45	K.LLDAVDTYIPVPAR.D	hsa:7284	Oxidative phosphorylation	Mitochondria
C15	gi 34234	Laminin-binding protein	75	R.AIVAIENPADVSVISPR.N R.FTPGTFITNQIAAAREPR.L	hsa:3921	Ribosome	Cytosol
C16	gi 47519616	Tropomyosin beta chain isoform 2	73	R.IQLVEEELDR.A R.IQLVEEELDRQAER.L R.LATALQKLEFAEK.A	hsa:7169	Muscle contraction	Cytosol
C17	gi 31645	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	72	K.VIHDNFFIVEGLMTTVHAITATQK.T Oxidation (M) R.DGRGALQNIIPASTGAAK.A R.VPTANWSVDLTGR.L K.LISWYDNEFGYSNR.V	hsa:2597	Glycolysis	Cytosol; plasmatic membrane
C19	gi 4505773	Prohibitin	91	R.IFTSIGEDYDER.V R.FDAGELTQR.E	hsa:5245	DNA synthesis	Mitochondrial membrane
C19	gi 66473265	Beta globin chain	50	K.VNVDEVGGEALGR._R.LLVVYPWTKRF	hsa:5245	Oxygen transport	Hemoglobin
C21	gi 494066	Chain A, Three-Dimensional Structure Of Class Pi Glutathione S-Transferase From Human Placenta In Complex With S-Hexylglutathione At2.8 Angstroms Resolution	36	.PPYTYYFPVRGR.C K.FQDGDDITLYQSNTILRH	hsa:2940	Amino acids metabolism	Cytosol

in the group with tumor. As the selected patients were positive for HPV DNA, this fact can cause false negative for complement proteins. The variability could have been better analyzed if there were compared to patients with cancer of the penis, whose tests did not reveal the presence of HPV. The proteomic consequences of HPV infection in penile carcinoma are not known. Analysis of differentially expressed proteins by HPV status revealed enrichment of proteins involved in epithelial cell development, keratinization and extracellular matrix organization in HPV– oropharyngeal carcinoma (OPC), whereas enrichment of proteins in DNA initiation and replication and cell cycle control was found for HPV+ (OPC) (31). Due to the rarity of penile tumors and the high percentage of HPV positive in our samples (8, 13) it is difficult to compare the tumors according to HPV status. However, a second study is underway to compare our results and identify the presence or absence of complement in tissue of SCCP patients negative for HPV.

CONCLUSIONS

We identified a large number of proteins in patients with penile cancer and in the control group. Some of these proteins, found in the first group, are also directly involved in the development of other types of cancers and therefore, suitable for analysis. Further studies are needed to corroborate these findings and to determine the usefulness of each discussed protein in the clinical scope of SCCP patients. Remarkably, this work reinforces that the C3 complement protein is a strong biomarker candidate for evaluating SCCP patients. Further studies should be conducted comparing samples positive for HPV with other HPV negative.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by FAPERJ (APQ1 E-26/110.812/2009 and E-26/111.336/2013) and Programa de Oncobiologia (Brazil).

CONFLICT OF INTEREST

None declared.

REFERENCES

1. Solsona E, Algaba F, Horenblas S, Pizzocaro G, Windahl T; European Association of Urology. EAU Guidelines on Penile Cancer. *Eur Urol*. 2004;46:1-8.
2. Brunini R: Câncer no Brasil: Dados histopatológicos: 1976-80. In: Resultados. Ministério da Saúde - Campanha Nacional de Combate ao Câncer, Rio de Janeiro, RJ, 1982; 118.
3. Parkin DM, Muir CS. Cancer Incidence in Five Continents. Comparability and quality of data. IARC Sci Publ. 1992;120:45-173.
4. Koifman L, Vides AJ, Koifman N, Carvalho JP, Ornellaas AA. Epidemiological aspects of penile cancer in Rio de Janeiro: evaluation of 230 cases. *Int Braz J Urol*. 2011;37:231-40; discussion 240-3.
5. Barrasso R, De Brux J, Croissant O, Orth G. High prevalence of papillomavirus-associated penile intraepithelial neoplasia in sexual partners of women with cervical intraepithelial neoplasia. *N Engl J Med*. 1987;317:916-23.
6. Maiche AG. Epidemiological aspects of cancer of the penis in Finland. *Eur J Cancer Prev*. 1992;1:153-8.
7. Maden C, Sherman KJ, Beckmann AM, Hislop TG, Teh CZ, Ashley RL, et al. History of circumcision, medical conditions, and sexual activity and risk of penile cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1993;85:19-24.
8. Scheiner MA, Campos MM, Ornellaas AA, Chin EW, Ornellaas MH, Andrada-Serpa MJ. Human papillomavirus and penile cancers in Rio de Janeiro, Brazil: HPV typing and clinical features. *Int Braz J Urol*. 2008;34:467-74; discussion 475-6.
9. McCance DJ, Kalache A, Ashdown K, Andrade L, Menezes F, Smith P, et al. Human papillomavirus types 16 and 18 in carcinomas of the penis from Brazil. *Int J Cancer*. 1986;37:55-9.
10. Peclat de Paula AA, Neto JCA, Cruz AD, de Freitas Jr R: Carcinoma epidermóide do pênis: considerações epidemiológicas, histopatológicas, influência viral e tratamento cirúrgico. *Rev Bras Cancer*. 2005;51:243-52.
11. Silva KC, Rosa ML, Moyse N, Afonso LA, Oliveira LH, Cavalcanti SM. Risk factors associated with human papillomavirus infection in two populations from Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104:885-91.
12. Melgaço FG, Rosa ML, Augusto EF, Haimuri JG, Jacintho C, Santos LS, et al. Human papillomavirus genotypes distribution in cervical samples from women living with human immunodeficiency virus. *Arch Gynecol Obstet*. 2011;283:809-17.

13. Afonso LA, Moyses N, Alves G, Ornellas AA, Passos MR, Oliveira Ldo H, et al. Prevalence of human papillomavirus and Epstein-Barr virus DNA in penile cancer cases from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012;107:18-23.
14. Ericsson C, Franzén B, Nistér M. Frozen tissue biobanks. Tissue handling, cryopreservation, extraction, and use for proteomic analysis. *Acta Oncol.* 2006;45:643-61.
15. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;15:227:680-5.
16. Nylandsted J, Brand K, Jäättelä M. Heat shock protein 70 is required for the survival of cancer cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;926:122-5.
17. Aghdassi A, Phillips P, Dudeja V, Dhaulakhandi D, Sharif R, Dawra R, et al. Heat shock protein 70 increases tumorigenicity and inhibits apoptosis in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2007;15:67:616-25.
18. Niwa T, Saito H, Imajoh-ohmi S, Kaminishi M, Seto Y, Miki Y, et al. BRCA2 interacts with the cytoskeletal linker protein plectin to form a complex controlling centrosome localization. *Cancer Sci.* 2009;100:2115-25.
19. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100:57-70.
20. Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol.* 2001;2:293-9.
21. Jurianz K, Ziegler S, Garcia-Schüler H, Kraus S, Bohana-Kashtan O, Fishelson Z, et al. Complement resistance of tumor cells: basal and induced mechanisms. *Mol Immunol.* 1999;36:929-39.
22. Ornellas P, Ornellas AA, Chinello C, Gianazza E, Mainini V, Cazzaniga M, et al. Downregulation of C3 and C4A/B complement factor fragments in plasma from patients with squamous cell carcinoma of the penis. *Int Braz J Urol.* 2012;38:739-49.
23. Campo MS, Graham SV, Cortese MS, Ashrafi GH, Araibi EH, Dornan ES, et al. HPV-16 E5 down-regulates expression of surface HLA class I and reduces recognition by CD8 T cells. *Virology.* 2010;407:137-42.
24. He P, Naka T, Serada S, Fujimoto M, Tanaka T, Hashimoto S, et al. Proteomics-based identification of alpha-enolase as a tumor antigen in non-small lung cancer. *Cancer Sci.* 2007;98:1234-40.
25. Kaneko N, Gotoh A, Okamura N, Matsuo E, Terao S, Watanabe M, et al. Potential tumor markers of renal cell carcinoma: α-enolase for postoperative follow up, and galectin-1 and galectin-3 for primary detection. *Int J Urol.* 2013;20:530-5.
26. Nuell MJ, Stewart DA, Walker L, Friedman V, Wood CM, Owens GA, et al. Prohibitin, an evolutionarily conserved intracellular protein that blocks DNA synthesis in normal fibroblasts and HeLa cells. *Mol Cell Biol.* 1991;11:1372-81.
27. Wang S, Nath N, Adlam M, Chellappan S. Prohibitin, a potential tumor suppressor, interacts with RB and regulates E2F function. *Oncogene.* 1999;18:3501-10.
28. Fusaro G, Dasgupta P, Rastogi S, Joshi B, Chellappan S. Prohibitin induces the transcriptional activity of p53 and is exported from the nucleus upon apoptotic signaling. *J Biol Chem.* 2003;278:47853-61.
29. Joshi B, Rastogi S, Morris M, Carastro LM, DeCook C, Seto E, et al. Differential regulation of human YY1 and caspase 7 promoters by prohibitin through E2F1 and p53 binding sites. *Biochem J.* 2007;401:155-66.
30. Chowdhury I, Xu W, Stiles JK, Zeleznik A, Yao X, Matthews R, et al. Apoptosis of rat granulosa cells after staurosporine and serum withdrawal is suppressed by adenovirus-directed overexpression of prohibitin. *Endocrinology.* 2007;148:206-17.
31. Slebos RJ, Jehnlich N, Brown B, Yin Z, Chung CH, Yarbrough WG, et al. Proteomic analysis of oropharyngeal carcinomas reveals novel HPV-associated biological pathways. *Int J Cancer.* 2013;132:568-79.

Correspondence address:

Antonio Augusto Ornellas, MD, PhD
 Instituto Nacional de Câncer - Department of Urology
 Praça da Cruz Vermelha 23 Centro
 Rio de Janeiro, RJ, 20230-130, Brazil
 E-mail: ornellasa@hotmail.com

HPV vaccination is fundamental for reducing or erradicate penile cancer | *Opinion: NO*

Paulo Ornellas¹, Antonio Augusto Ornellas^{2,3}

¹Departamento de Patologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; ²Departamento de Urologia, Instituto Nacional do Câncer (INCA), Rio de Janeiro, RJ, Brasil; Instituto de Pós-Graduação Médica Carlos Chagas, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Keywords: Human papillomavirus; Penile Neoplasms; Vaccination, Male

Human papillomavirus (HPV) is a DNA virus that presents tropism for epithelial cells, causing infections of the skin and mucous membranes. It is transmitted by direct contact of a healthy skin or mucosa with an affected skin or mucosa. Until now, more than 200 types of HPVs have been discovered (1). Approximately 30 types infect the anal and genital mucosa. Types that can also be detected in the oral mucosa are classified according to risk of causing lesions or their potential for malignancy. Such as “low risk” are included types 6 and 11 (more incidents) and as “high risk” the types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 and 66 (2). Human papillomavirus (HPV), a sexually transmitted infection, is responsible for 99.7% of cases of cervical cancer (3) and 530,000 new cases of cervical cancer globally every year (4). In addition, HPV is also responsible for some head and neck cancers, penile cancers and the majority of anal cancers (5). The incidence of these cancers is on the rise. Globally, HPV types 16 and 18 are responsible for 38,000 (85%) new cases of head and neck cancers and 35,000 (87%) cases of anal cancers (4).

The main focus of global vaccine programs has been prevention of cervical cancer, through prevention of oncogenic HPV infection, the necessary cause of squamous and glandular cervical carcinomas (6, 7). The most robust available data regarding HPV vaccines regards cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. A recent 10-year review and meta-analysis of several randomized controlled trials (RCT) cited efficacy from 89.8-100% in a follow-up of 34.9 months to 9.4 years (8). The most common adverse event was pain at the injection site and any serious adverse events were not determined to be vaccine-related (8). Another 10-year review found similar efficacy, specifically of the bivalent and 9-valent vaccines, again, in CIN2+ lesions (9). However, regarding male HPV cases, a significant concern is the low rate of seroconversion after natural infection (10). In addition, it has been suggested that HPV antibody seropositivity does not provide significant immunity to future infections like it does in women (11). Fortunately, the quadrivalent HPV vaccine has been shown to be highly immunogenic in men age 16 to 26, with seroconversion by month 7, remaining elevated even at 36 months, with titers comparable to those in women (12). In Sweden, the current HPV Immunization Program includes only young females, and coverages above 50% in such programs are suggested to give herd immunity (13, 14). Since the introduction of the HPV vaccine in Sweden, the incidence of anogenital warts has decreased among both the vaccinated female population and the unvaccinated male population, suggesting that herd immunity has been achieved (15, 16). However, among males having sex with males, herd immunity has not yet been proven, which is

why a recent modeling study recommended targeted prevention strategies to reach this population (17).

Penile cancer is a heterogeneous disease with respect to HPV infection, with the association with penile infection dependent on the histology (18, 19). It is uncertain whether cancers involving HPV infection have better survival profiles than cancers without HPV infection. In a study with 82 penile cancer patients, 30.5% of tumors had HPV DNA, with HPV 16 being the most prevalent. This study demonstrated no association between HPV negative and positive patients when considering lymph node metastasis ($P=0.386$) and 10-year survival rate (68.4% vs. 69.1%; $P=0.83$) (20). In another study with 29 patients with invasive squamous cell carcinoma of penis (SCCP), 31% of tumors had either HPV-16 or HPV-18 DNA. This study found no difference between HPV negative and positive patients in terms of nodal metastasis or survival even after adjustment control for tumor stage (21). However, these results differ from another which examined HPV status as a prognostic indicator in 171 penile cancer patients. In this study, high-risk HPV DNA was found in 29% of tumors, with 76% containing HPV-16. High-risk HPV was associated with improved 5-year disease-specific survival (78% vs. 93%; $P=0.03$). Additionally, high-risk HPV was an independent predictor of disease specific mortality in multivariate analysis [hazard ratio (HR), 0.14; 95% CI, 0.03–0.63; $P=0.01$] (22). Regarding all these studies, we can notice that the presence HPV DNA in SCCP is not much higher than 30 %. It means that approxima-

tely 70% of patients with SCCP will still have the disease even if all males received the vaccine. SCCP have a low association with HPV, whereas warty/basaloid cancers are strongly associated with HPV (23). In addition, preliminary data indicate a prevalence of 54.6% of HPV cases among the Brazilian population aged 16 to 25 years, 38.4% of which are of high risk for the development of cancer (24). The infection can manifest itself in two ways: clinical and subclinical and it is estimated that only about 5% of people infected with HPV will develop some form of manifestation (25). As penile cancer accounts for only 2.7% of male malignancies in Brazil (26), we can roughly estimate that few patients with HPV will develop penile cancer. Among HPV positive patients, those with high-risk HPV would be more likely to develop penile cancer.

Therefore, the male public HPV vaccination is a good measure to prevent not just cervical cancer but some head and neck cancers, some penile warts and the majority of anal cancers. However, it is not clear if it will be enough to eradicate or reduce the prevalence of penile cancer. Increased patient education along with prevention strategies such as condom use, hygienic measures, smoking cessation, and avoidance of chronic inflammatory states can have considerable impact on pathogenesis of pre-cancerous lesions of the penis. Although, the adoption of HPV vaccination has led to some success in female HPV-related cancers, the results are yet to be elucidated in the male population. It is necessary further long-term studies to declare that HPV vaccination is effective against SCCP.

REFERENCES

1. Haedicke J, Iftner T. Human papillomaviruses and cancer. *Radiother Oncol*. 2013;108:397-402.
2. Bocardo, E, Villa, L.L. Vírus e Câncer, capítulo 13; em Oncologia Molecular; Carlos Gil Ferreira e José Cláudio Casali da Rocha (editores), Rio de Janeiro: Atheneu; ed. 2. 2010; p. 183-4.
3. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, ET AL. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999;189:12-9.
4. [No authors]. Human papillomavirus vaccines: WHO position paper, May 2017. *Wkly Epidemiol Rec*. 2017;92:241-68.
5. Parkin DM, Bray F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine*. 2006;24 (Suppl 3):S311-25.
6. Koutsky L. The epidemiology behind the HPV vaccine discovery. *Ann Epidemiol*. 2009;19:239-44.
7. Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, ET AL. WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *Lancet Oncol*. 2009;10:321-2.

8. Angioli R, Lopez S, Aloisi A, Terranova C, De Cicco C, Scaletta G, et al. Ten years of HPV vaccines: State of art and controversies. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016;102:65-72.
9. Harper DM, DeMars LR. HPV vaccines - A review of the first decade. *Gynecol Oncol.* 2017;146:196-204. Erratum in: *Gynecol Oncol.* 2017;147:489.
10. Giuliano AR, Viscidi R, Torres BN, Ingles DJ, Sudenga SL, Villa LL, et al. Seroconversion Following Anal and Genital HPV Infection in Men: The HIM Study. *Papillomavirus Res.* 2015;1:109-115.
11. Lu B, Viscidi RP, Wu Y, Lee JH, Nyitray AG, Villa LL, et al. Prevalent serum antibody is not a marker of immune protection against acquisition of oncogenic HPV16 in men. *Cancer Res.* 2012;72:676-85.
12. Hillman RJ, Giuliano AR, Palefsky JM, Goldstone S, Moreira ED Jr, Vardas E, et al. Immunogenicity of the quadrivalent human papillomavirus (type 6/11/16/18) vaccine in males 16 to 26 years old. *Clin Vaccine Immunol.* 2012;19:261-7.
13. Östensson E, Silfverschiöld M, Greiff L, Asciutto C, Wennerberg J, Lydryp ML, et al. The economic burden of human papillomavirus-related precancers and cancers in Sweden. *PLoS One.* 2017;12:e0179520.
14. Drolet M, Bénard É, Boily MC, Ali H, Baandrup L, Bauer H, et al. Population-level impact and herd effects following human papillomavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2015;15:565-80.
15. Herweijer E, Leval A, Ploner A, Eloranta S, Simard JF, Dillner J, et al. Association of varying number of doses of quadrivalent human papillomavirus vaccine with incidence of condyloma. *JAMA.* 2014;311:597-603.
16. Herweijer E, Sundström K, Ploner A, Uhnoo I, Sparén P, Arnheim-Dahlström L. Quadrivalent HPV vaccine effectiveness against high-grade cervical lesions by age at vaccination: A population-based study. *Int J Cancer.* 2016;138:2867-74. Erratum in: *Int J Cancer.* 2017;141:E1-E4.
17. Bogaards JA, Wallinga J, Brakenhoff RH, Meijer CJ, Berkhof J. Direct benefit of vaccinating boys along with girls against oncogenic human papillomavirus: bayesian evidence synthesis. *BMJ.* 2015;350:h2016.
18. [No Authors]. World Health Organization. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2007. International Agency for Research on Cancer. Human papillomaviruses. 2007; p. 90.
19. Gross G, Pfister H. Role of human papillomavirus in penile cancer, penile intraepithelial squamous cell neoplasias and in genital warts. *Med Microbiol Immunol.* 2004;193:35-44.
20. Bezerra AL, Lopes A, Landman G, Alencar GN, Torloni H, Villa LL. Clinicopathologic features and human papillomavirus dna prevalence of warty and squamous cell carcinoma of the penis. *Am J Surg Pathol.* 2001;25:673-8.
21. Wiener JS, Effert PJ, Humphrey PA, Yu L, Liu ET, Walther PJ. Prevalence of human papillomavirus types 16 and 18 in squamous-cell carcinoma of the penis: a retrospective analysis of primary and metastatic lesions by differential polymerase chain reaction. *Int J Cancer.* 1992;50:694-701.
22. Lont AP, Kroon BK, Horenblas S, Gallee MP, Berkhof J, Meijer CJ, et al. Presence of high-risk human papillomavirus DNA in penile carcinoma predicts favorable outcome in survival. *Int J Cancer.* 2006;119:1078-81.
23. Palefsky JM. Human papillomavirus-related disease in men: not just a women's issue. *J Adolesc Health.* 2010;46(4 Suppl):S12-9. Erratum in: *J Adolesc Health.* 2010;46:614.
24. Estudo Epidemiológico sobre a Prevalência Nacional de Infecção pelo HPV (POP-Brasil): Resultados preliminares – Associação Hospitalar Moinhos de Vento – Porto Alegre, 2017 120 p. ISBN 978-85-98016-00-9
25. [No Authors]. HPV e câncer - Perguntas mais frequentes. INCA. Available at. <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_utero/hpv-cancer-perguntas-mais-frequentes>
26. Brunini R: Câncer no Brasil: Dados histopatológicos: 1976-80, Ministério da Saúde - Campanha Nacional de Combate ao Câncer, 1982.

Antonio Augusto Ornellas, MD

Departamento de Urologia,
Instituto Nacional do Câncer do Brasil (INCA)
Praça da Cruz Vermelha, 23
Rio de Janeiro, RJ, Brasil
E-mail: ornellasa@hotmail.com

ANEXO A- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER N° 451/2006

Registro CONEP: 12556 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Registro CEP: CCEC-38/05

Processo nº 25000.192252/2005-08

Projeto de Pesquisa: "Secretoma de Câncer de Rim e de Pênis". Termo de Consentimento de 08/11/05.

Pesquisador Responsável: Dr^a. Gilda Alves Brown.

Instituição: Instituto Nacional do Câncer- Rio de Janeiro/ RJ. (centro único)

Área Temática Especial: Gênética humana com cooperação estrangeira.

Ao se proceder à análise das respostas ao parecer CONEP nº 084/2006, relativo ao projeto em questão, considerou-se que:

- a) Foram atendidas/esclarecidas as solicitações do referido parecer concernentes a correções na Folha de Rosto nos campos 35 , 36 a 44, além de ter sido apresentada declaração do CEP de atua conforme Res. CNS 196/96 e suas complementares.
- b) O projeto preenche os requisitos fundamentais da Resolução CNS 196/96 e suas complementares, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos;
- c) O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição supracitada.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta – se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Projeto aprovado.

Brasília, 5 de maio de 2006.

W. Saad Hossne
 WILLIAM SAAD HOSSNE
 Coordenador CONEP/CNS/MS



A(o): Dr(a). Gilda Alves Brown
Investigador(a) Principal

Rio de Janeiro, 22 de junho de 2006

Registro CEP nº 38/05 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)
Título do Projeto: Secretoma de câncer de rim e de pênis

Prezado(a) Doutor(a),

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer após re-análise **aprovou** o Protocolo intitulado: Secretoma de câncer de rim e de pênis (versão de abril de 2005) bem como seus Termos de Consentimento Livre e Esclarecido para pacientes e doadores (versão de 8/11/05) em 10 de novembro de 2005.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Adriana Scheliga'.

Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa
CEP - INCA

c/c – Dra. Marisa Breitenbach
Coordenadora da CPQ

ANEXO B– Modelos de termos de consentimento livre e esclarecido

 <p>TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO AMOSTRA DE TECIDO NORMAL DE PELE PÊNIS PROJETO SECRETOMA DE CÂNCER DE RIM E DE PÊNIS</p> <p>Nome do Voluntário: _____</p> <p>Você em breve irá fazer uma Postectomia (cirurgia de fimose) para retirada do excesso de pele do prepúcio. Como precisamos de tecido normal de pênis para comparação, convidamos você a participar de um projeto de pesquisa sobre proteínas marcadoras do câncer de pênis. A única coisa que você precisa fazer é doar um pedaço da pele que já vai ser retirada em sua cirurgia e que normalmente iria para o lixo. Portanto nada irá acontecer com você alem da cirurgia a qual você já iria ser submetido.</p> <p>Para que você possa decidir se quer participar ou não deste estudo, precisa conhecer seus benefícios, riscos e implicações.</p> <p>OBJETIVO DO ESTUDO</p> <p>O objetivo deste estudo é identificar quais são as alterações que ocorrem no conjunto de proteínas existentes no tecido tumoral de pacientes com câncer de pênis em relação ao conjunto de proteínas presentes no tecido normal de doadores saudáveis.</p> <p>Sua participação é muito importante para formar um grupo controle que será comparado com os dados dos pacientes com câncer de pênis.</p> <p>PROCEDIMENTOS DO ESTUDO</p> <p>Se você concordar em participar deste estudo uma amostra do prepúcio a ser removido na cirurgia a qual você irá ser submetido (Postectomia) será guardada para esse estudo. Não será necessária retirada adicional de tecido do prepúcio para este estudo.</p> <p>RISCOS</p> <p>Somente a amostra de tecido do prepúcio retirada na Postectomia será utilizada nesse estudo, não havendo necessidade de nenhum procedimento adicional. Portanto, você não terá nenhum risco adicional além do risco normal de uma cirurgia a qual você já estará sendo submetido.</p>	 <p>INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER</p>
--	---

Prot 38/05 – Secretoma de Câncer de Rim e de Pênis – versão nº 3 – Aprovado em 16/04/2007

1


Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora



BENEFÍCIOS

Este estudo pode não trazer nenhum benefício imediato a você, entretanto as informações conseguidas com esse estudo podem contribuir para um melhor conhecimento sobre o câncer de pênis, e com isso beneficiar no futuro pacientes portadores desta doença.

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

Seus registros médicos poderão ser consultados pela equipe de pesquisadores envolvidos. Seu nome não será revelado ainda que informações de seu registro médico sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos.

TRATAMENTO MÉDICO EM CASO DE DANOS

Todo e qualquer dano decorrente do desenvolvimento deste estudo, e que necessite de atendimento médico, ficará a cargo do médico que fez a sua cirurgia, Dr. Paulo César Barbosa da Silva, CPF: 04346980759, CRM: 52-241233, Endereço do consultório: Rua Nossa Senhora de Copacabana, nº861, sala 402, Copacabana, Telefone 2257-1449.

CUSTOS

Não haverá qualquer custo ou forma de pagamento por sua participação no estudo.

BASES DA PARTICIPAÇÃO

É importante que você saiba que a sua participação neste estudo é completamente voluntária e que você pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento sem penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Em caso de você decidir interromper sua participação no estudo, a equipe assistente deve ser comunicada e a coleta de amostras para os exames relativos ao estudo será imediatamente interrompida.

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



GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Nós estimulamos você e seus familiares a fazer perguntas a qualquer momento do estudo. Neste caso, por favor, ligue para a pesquisadora principal deste estudo, Dra. Gilda Alves Brown, no telefone 2506-6622. Se você tiver perguntas com relação a seus direitos como participante do estudo clínico, também pode contar com uma terceira pessoa imparcial, a coordenadora do comitê de ética do Instituto Nacional de Câncer, Dra. Adriana Scheliga, a rua André Cavalcanti, 37, telefone 3233-1410.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA

Li as informações acima e entendi o propósito deste estudo assim como os benefícios e riscos potenciais da participação no mesmo. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar neste estudo.

Eu recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento.

_____/_____/_____
 (Assinatura do Doador) dia mês ano

 (Nome do Doador – letra de forma)
 _____ / ____ / ____
 (Assinatura de Testemunha, se necessário) dia mês ano

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste estudo ao doador.

_____/_____/_____
 (Assinatura do médico que obteve o consentimento) dia mês ano



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Instituto Nacional de Câncer
Comitê de Ética em Pesquisa-INCA
PROT 38/05 – Aprovado 08/ 11/ 2005

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Para doador do banco de sangue Secretoma de Câncer de Rim e de Pênis

Nome do Voluntário: _____

Você em breve será submetido ao procedimento normal de doação voluntária de sangue. Por isso está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa que envolve o estudo do Secretoma de Câncer de rim e de Pênis. O termo secretoma é utilizado para descrever o conjunto de todas as proteínas solúveis encontradas na urina ou no plasma do sangue. O estudo destas proteínas em câncer de rim e de pênis é importante para que possamos tentar encontrar na urina ou no plasma sanguíneo alguma proteína que possa ser utilizada como um marcador destes tipos de tumores.

Para que você possa decidir se quer participar ou não deste estudo, precisa conhecer seus benefícios, riscos e implicações.

OBJETIVO DO ESTUDO

O objetivo é identificar quais são as alterações que ocorrem no conjunto de proteínas existentes na urina e no plasma de pacientes com câncer de rim ou câncer de pênis em relação ao conjunto de proteínas presentes na urina e no plasma de doadores normais. Caso alguma proteína seja identificada como um possível marcador de câncer de rim ou de câncer de pênis, esta será investigada em amostras de tumor sólido de rim ou de pênis. Poderemos também verificar se existe alguma correlação entre estas proteínas e o prognóstico e a resposta ao tratamento destes pacientes.

Sua participação é importante para formar um grupo controle que será comparado com os dados dos pacientes com câncer de rim ou de pênis.



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Instituto Nacional de Câncer
Comitê de Ética em Pesquisa-INCA
PROT 38/05 – Aprovado 08/11/2005

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Se você concordar em participar deste estudo será coletada uma amostra de seu sangue de 5 mililitros ou o correspondente a uma colher de sobremesa e de 50 mL de urina, para serem submetidos a exames laboratoriais. Essas amostras poderão ser coletadas antes do procedimento de coleta da bolsa de sangue. A partir daí, essas amostras serão utilizadas para fazer exames de sangue e de urina para identificação de proteínas.

MÉTODOS ALTERNATIVOS

Não existem métodos alternativos.

RISCOS

O seu procedimento de doação de sangue será exatamente o mesmo caso você participe ou não desta pesquisa. A coleta de sangue para esta pesquisa coincidirá com a coleta de sangue para os exames rotineiros, de forma a não ser prevista punção venosa adicional. Estas punções venosas para exames laboratoriais, que são parte de seu procedimento regular, podem resultar em dor no local da punção ou manchas rochas transitórias chamadas de equimoses.

Para doar a amostra de urina é necessário urinar em frasco igual ao usado para exames normais de urina (EAS) e esse procedimento não tem risco.

BENEFÍCIOS

Este estudo pode não trazer melhora para a sua saúde, entretanto as informações obtidas neste estudo podem contribuir para um melhor conhecimento sobre o câncer de rim ou sobre o câncer de pênis.

ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

O seu acompanhamento será feito pelos Doutores Raul Quirino e Antonio Augusto Ornellas do Serviço de Urologia.

Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Instituto Nacional de Câncer
Comitê de Ética em Pesquisa-INCA
PROT 38/05 – Aprovado 08/ 11/ 2005

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

Seus registros médicos poderão ser consultados pelo Comitê de Ética do Hospital do Câncer I / INCA e equipe de pesquisadores envolvidos. Seu nome não será revelado ainda que informações de seu registro médico sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos.

TRATAMENTO MÉDICO EM CASO DE DANOS

Todo e qualquer dano decorrente do desenvolvimento deste projeto de pesquisa, e que necessite de atendimento médico, ficará a cargo da instituição.

CUSTOS

Não haverá qualquer custo ou forma de pagamento para o paciente pela sua participação no estudo.

BASES DA PARTICIPAÇÃO

É importante que você saiba que a sua participação neste estudo é completamente voluntária e que você pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento sem penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Em caso de você decidir interromper sua participação no estudo, a equipe assistente deve ser comunicada e a coleta de amostras para os exames relativos ao estudo será imediatamente interrompida.

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

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Nós estimulamos a você ou seus familiares a fazer perguntas a qualquer momento do estudo. Neste caso, por favor, ligue para Dra. Gilda Brown no telefone 2506 6622. Se você tiver perguntas com relação a seus direitos como participante do estudo clínico, também pode contar com uma terceira pessoa imparcial, a Coordenadora do Comitê de Ética do Instituto Nacional do Câncer Dra. Adriana Scheliga - Rua André Cavalcanti 37, telefone 21 – 3233-1410.

Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Instituto Nacional de Câncer
Comitê de Ética em Pesquisa-INCA
PROT 38/05 - Aprovado 08/11/2005

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA

Li as informações acima e entendi o propósito deste estudo assim como os benefícios e riscos potenciais da participação no mesmo. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar neste estudo.

Entendo que poderei ser submetido a exames de sangue adicionais aos necessários ao procedimento de doação de sangue e não receberei compensação monetária por minha participação nesta pesquisa.

Eu recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento.

_____/_____/_____
(Assinatura do Doador) dia mês ano

(Nome do Doador – letra de forma)

_____/_____/_____
(Assinatura de Testemunha, se necessário) dia mês ano

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste estudo ao doador.

_____/_____/_____
(Assinatura da pessoa que obteve o consentimento) dia mês ano

Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Instituto Nacional de Câncer
Comitê de Ética em Pesquisa-INCA
PROT 38/05 – Aprovado 08/ 11/ 2005

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Para Pacientes

Secretoma de Câncer de Rim e de Pênis

Nome do Voluntário: _____

Você em breve será submetido à cirurgia. Por isso está sendo convidado a participar, de um projeto de pesquisa que envolve o estudo do Secretoma de Câncer de rim ou de Câncer de Pênis. O termo secretoma é utilizado para descrever o conjunto de todas as proteínas solúveis encontradas na urina ou no plasma do sangue. O estudo destas proteínas em câncer de rim e de câncer de pênis é importante para que possamos tentar encontrar na urina ou no plasma sanguíneo alguma proteína que possa ser utilizada como um marcador destes tipos de tumores.

Para que você possa decidir se quer participar ou não deste estudo, precisa conhecer seus benefícios, riscos e implicações.

OBJETIVO DO ESTUDO

O objetivo é identificar quais são as alterações que ocorrem no conjunto de proteínas existentes na urina e no plasma de pacientes com câncer de rim ou câncer de pênis em relação ao conjunto de proteínas presentes na urina e no plasma de doadores normais. Caso alguma proteína seja identificada como um possível marcador de câncer de rim ou de câncer de pênis, esta será investigada em amostras de tumor. Poderemos também verificar se existe alguma correlação entre estas proteínas e o prognóstico e a resposta ao tratamento dos pacientes.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Se você concordar em participar deste estudo será necessária a doação voluntária de 5 mL de sangue e de 50 mL de urina os quais serão coletados normalmente para as análises de diagnóstico de rotina. Para a realização do estudo será necessária também à doação voluntária de uma pequena amostra do tecido tumoral que será extraído na cirurgia a qual você já estará sendo

Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Instituto Nacional de Câncer
Comitê de Ética em Pesquisa-INCA
PROT 38/05 - Aprovado 08/ 11/2005

submetido. A doação desta pequena amostra não afetará em nada os procedimentos normais de análises de diagnóstico que serão feitas.

MÉTODOS ALTERNATIVOS

Não método alternativo.

RISCOS

O seu tratamento será exatamente o mesmo caso você participe ou não deste estudo. A coleta de sangue para o estudo coincidirá com a coleta de sangue para os exames rotineiros, de forma a não ser prevista punção venosa adicional. Estas punções venosas para exames laboratoriais, que são parte de seu tratamento regular, podem resultar em dor no local da punção ou manchas rochas transitórias chamadas de equimoses. A coleta de urina não envolve procedimento invasivo adicional e se dá da mesma forma que a coleta para um exame de urina normal (EAS). E a doação de uma pequena amostra do tecido tumoral também não inclui procedimento adicional, pois você já estará sendo submetido à cirurgia.

BENEFÍCIOS

Em longo prazo, este tipo de estudo pode vir a contribuir não só para o diagnóstico como também para o tratamento de pacientes com câncer de rim ou com câncer de pênis

ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

O seu acompanhamento será feito pelos Doutores Raul Quirino e Antonio Augusto Ornellas do Serviço de Urologia.

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

Além da equipe de saúde que cuidará de você, seus registros médicos poderão ser consultados pelo Comitê de Ética do Hospital do Câncer I / INCA e equipe de pesquisadores envolvidos. Seu nome não será revelado ainda que informações de seu registro médico sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos.

Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Instituto Nacional de Câncer
Comitê de Ética em Pesquisa-INCA
PROT 38/05 – Aprovado 08/11/2005

TRATAMENTO MÉDICO EM CASO DE DANOS

Todo e qualquer dano decorrente do desenvolvimento deste projeto de pesquisa, e que necessite de atendimento médico, ficará a cargo da instituição. Seu tratamento e acompanhamento médico independem de sua participação neste estudo.

CUSTOS

Não haverá qualquer custo ou forma de pagamento para o paciente pela sua participação no estudo.

BASES DA PARTICIPAÇÃO

É importante que você saiba que a sua participação neste estudo é completamente voluntária e que você pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento sem penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Em caso de você decidir interromper sua participação no estudo, a equipe assistente deve ser comunicada e a coleta de amostras para os exames relativos ao estudo será imediatamente interrompida.

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

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Nós estimulamos a você ou seus familiares a fazer perguntas a qualquer momento do estudo. Neste caso, por favor, ligue para o Dra. Gilda Brown no telefone 2506 6622. Se você tiver perguntas com relação a seus direitos como participante do estudo clínico, também pode contar com uma terceira pessoa imparcial, a Coordenadora do Comitê de Ética do Instituto Nacional do Câncer Dra. Adriana Scheliga - Rua André Cavalcanti 37, telefone 21 – 3233-1410.



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Instituto Nacional de Câncer
Comitê de Ética em Pesquisa-INCA
PROT 38/05 – Aprovado 08/ 11/ 2005

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA

Li as informações acima e entendi o propósito deste estudo assim como os benefícios e riscos potenciais da participação no mesmo. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar neste estudo.

Entendo que poderei ser submetido a exames de sangue adicionais aos necessários a meu tratamento e não receberei compensação monetária por minha participação neste estudo.

Eu recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento.

(Assinatura do Paciente)

_____/_____/_____
dia mês ano

(Nome do Paciente – letra de forma)

(Assinatura de Testemunha, se necessário)

_____/_____/_____
dia mês ano

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste estudo ao paciente indicado acima e/ou pessoa autorizada para consentir pelo paciente.

(Assinatura da pessoa que obteve o consentimento)

_____/_____/_____
dia mês ano

Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora