



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

**Centro Biomédico**

**Faculdade de Ciências Médicas**

**Paulo Ornellas de Souza**

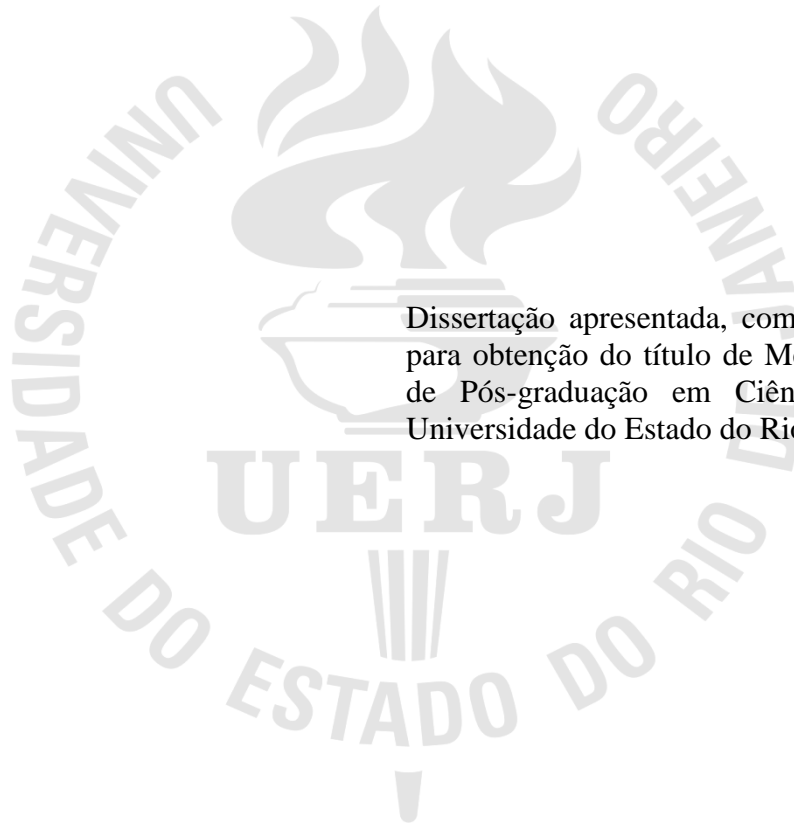
**Carcinoma epidermóide invasivo de pênis: subexpressão dos fragmentos C3  
e C4A/B do sistema complemento detectado no plasma pela plataforma  
proteômica ClinProt/MALDI/TOF**

Rio de Janeiro

2013

Paulo Ornellas de Souza

**Carcinoma epidermóide invasivo de pênis: subexpressão dos fragmentos C3 e C4A/B do sistema complemento detectada no plasma pela plataforma proteômica  
ClinProt/MALDI/TOF**



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

Orientadora: Dra. Gilda Alves Brown

Coorientadora: Dra. Denise de Abreu Pereira

Rio de Janeiro

2013

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

S729 Souza, Paulo Ornellas de.  
Carcinoma epidermóide invasivo de pênis: subexpressão dos fragmentos C3 e C4A/B do sistema complemento detectado no plasma pela plataforma proteômica ClinProt/MALDI/TOF / Paulo Ornellas de Souza. - 2013.  
87 f.

Orientadora: Gilda Alves Brown.  
Coorientadora: Denise de Abreu Pereira.

Dissertação (Mestrado) – 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. Excisão de Linfonodo. 4. Espectrometria de Massas - Instrumentação. I. Brown, Gilda Alves. II. Pereira, Denise de Abreu. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.66-006.6

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

---

Assinatura

---

Data

Paulo Ornellas de Souza

**Carcinoma epidermóide invasivo de pênis: subexpressão dos fragmentos C3 e C4A/B do sistema complemento detectada no plasma pela plataforma proteômica ClinProt/MALDI/TOF**

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

Aprovada em 28 de Agosto de 2013.

Orientadora: Dra. Gilda Alves Brown  
Instituto Nacional de Câncer

Coorientadora: Dra. Denise de Abreu Pereira  
Instituto Nacional de Câncer

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Ronaldo Damião  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Dra. Nathalie Henriques Silva Canedo  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Dr. Paulo Costa Carvalho  
Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2013

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente devo agradecer às minhas orientadoras Dra. Gilda Alves Brown e Dra Denise Abreu Pereira pela dedicação, atenção, paciência e confiança depositada em mim neste projeto.

Aos doutores, Fúlvio Magni, CliziaChinello, Erica Gianazza, Veronica Mainini e a MartaCazzaniga cujo acolhimento e ensinamentos no Departamento de Medicina Experimental da Universidade de Milano Bicocca foram fundamentais para realização desse projeto.

As minhas colegas, do laboratório de Genética Aplicada do INCA, Vanessa Sandin, Ana Sheila Cipriano e Mariana Chantre responsáveis pela minha inserção e adaptação no mundo da pesquisa básica.

À minha namorada Elaine Teixeira pela compreensão, apoio e carinho concedidos a mim, especialmente nesta fase de elaboração da dissertação que coincidiu com o primeiro ano de residência médica em Cirurgia Geral.

Aos meus pais Antonio Augusto Ornellas e Maria Helena F. Ornellas que sempre me ajudaram e me apoiaram nos momentos de maior adversidade. Ao meu irmão Agostinho Ornellas cuja aptidão artística proporcionou a melhoria na definição das imagens deste projeto. À minha avó Maria de Lourdes e minha irmã Maria Augusta pelo companheirismo e carinho que sempre me deram.

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. *Carcinoma epidermóide invasivo de pênis: subexpressão dos fragmentos C3 e C4A/B do sistema complemento detectado no plasma pela plataforma proteômica ClinProt/MALDI/TOF*. 2013. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

O carcinoma epidermóide de pênis (CEP) representa 95% das neoplasias penianas e afeta quase sempre pacientes não circuncidados estando muitas vezes associado à falta de higiene local adequada e à fimose. No Brasil a sua incidência é de 2,7 % porém em algumas áreas do país pode chegar a 17% dos casos diagnosticados por ano. O tumor pode ocorrer em qualquer parte do órgão sexual masculino e o tipo de estadiamento empregado é controverso. A classificação de Broders é a mais utilizada. Estudos sugerem a relação entre o desenvolvimento do carcinoma de pênis com a infecção por HPV (Papiloma Vírus Humano). O método de avaliação dos linfonodos inguinais permanece controverso sendo difícil a diferenciação entre linfadenomegalia inflamatória reacional e metastática. O exame físico não é um preditor confiável do comprometimento linfonodal pois pacientes com linfonodos palpáveis podem não apresentar metástases. Há poucas publicações sobre os mecanismos moleculares envolvidos na gênese e progressão do CEP. Apesar de vários marcadores terem sido avaliados, atualmente a aplicação clínica destes é limitada. A maior parte dos marcadores estudados requer procedimentos invasivos para obtenção do tecido tumoral. Existe a necessidade de encontrar através de uma técnica pouco invasiva marcadores tumorais circulantes capazes de diferenciar portadores de CEP com e sem envolvimento metastático. Neste tipo de neoplasia, a descoberta de biomarcadores que avaliem o prognóstico é relevante, pois o exame físico não é um indicador confiável do comprometimento linfonodal e da sobrevida. Os objetivos foram 1) revisar e discutir a epidemiologia, a etiologia, os diversos tipos de abordagem cirúrgica e as controvérsias no tratamento cirúrgico do câncer de pênis 2) investigar através da plataforma ClinProt/ MALDI / TOF a presença de marcadores plasmáticos capazes de discriminar indivíduos saudáveis de pacientes afetados por carcinoma epidermóide de pênis (CEP) 3) avaliar a importância destes marcadores na evolução da doença. Foram coletados e analisados pela plataforma ClinProt / MALDI / TOF o plasma de 36 indivíduos saudáveis e 25 pacientes com CEP invasivo, submetidos a tratamento cirúrgico entre junho de 2010 e junho de 2011, nos serviços de urologia do Instituto Nacional de Câncer e do Hospital Mário Kröeff (Rio de Janeiro). Nossos resultados apontaram para um conjunto de dois peptídeos ( $A = m / z 1897,22 + -9 Da$  e  $B = m / z 2021,99 + -9 Da$ ) que foram capazes de diferenciar pacientes com CEP de indivíduos controles. Esses peptídeos foram posteriormente identificados como fragmentos C3 e C4 A/B do sistema complemento. A validação cruzada, utilizando toda casuística apresentou 62,5% e 86,76% de sensibilidade e de especificidade, respectivamente, com uma alta sensibilidade (100%) e especificidade (97%) nos pacientes que morreram pela doença. Além disso, os pacientes com envolvimento ganglionar obtiveram uma sensibilidade e uma especificidade de 80 % e 97%, respectivamente. Ficou demonstrado que à medida que a doença progride mais subexpressos está o conjunto de peptídeos quando comparados com indivíduos saudáveis. Estes resultados podem ser úteis como ferramentas para a avaliação do prognóstico destes pacientes.

Palavras-chave: Câncer de pênis. Linfadenectomia. Subexpressão dos fragmentos C3 e C4A/B do sistema complemento. Proteômica. Plataforma ClinProt/MALDI/TOF

## ABSTRACT

SOUZA, Paulo Ornellas de. *Invasive squamous cell carcinoma of the penis: subexpression of the fragments C3 and C4A/B of the complement system detected in plasma by proteomic platform ClinProt / MALDI / TOF*. 2013. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Squamous cell carcinoma of the penis (SSCP) represents 95% of penile cancers. It affects mostly uncircumcised patients and is often associated with lack of adequate local hygiene and phimosis. In Brazil, the incidence is 2.7% but in some areas of the country can reach 17% of diagnosed cases of cancer per year. The tumor can occur in any part of the sexual organ and the type of staging to be used is controversial. The Broders classification is more often used to classify tumors. Studies suggest the relationship between the development of penile carcinoma and HPV infection (Human Papilloma Virus). The evaluation method of inguinal lymph nodes remains controversial and it is difficult to differentiate inflammatory reaction from metastatic lymphadenopathy. Physical examination is not a reliable predictor of lymph node involvement since patients with palpable lymph nodes can not present metastases. There are few publications about the molecular mechanisms involved in the genesis and progression of the SSCP. Although several markers have been evaluated, currently the clinical application of these is limited. Most of the markers studied require invasive procedures for obtaining tumor tissue. There is a need to find through a minimally invasive technique circulating tumor markers able to differentiate SSCP patients with and without metastatic involvement. In this type of malignancy the discovery of biomarkers that assess the prognosis is relevant since physical examination is not a reliable predictor of lymph node involvement and survival. The objectives of this study were: 1) to review and discuss the epidemiology, etiology, different types of surgical approach and controversies in the surgical treatment of penile cancer 2) to investigate via the platform ClinProt / MALDI / TOF presence of plasma markers able to discriminate healthy subjects from patients affected by squamous cell carcinoma of the penis (SCCP) 3) to evaluate the importance of these markers in disease progression. Between June 2010 and June 2011, plasma samples from 36 healthy subjects and 25 patients with penile carcinoma who underwent surgical treatment in the Urology Services of National Cancer Institute and Mario Kröeff Hospital were collected and analyzed by the ClinProt/MALDI/TOF platform. Our results found a cluster of 2 peptides (A=m/z 1897.22 +9 Da and B=m/z 2021.99 +9 Da) that was able to discriminate patients from control subjects. These peptides were further identified as C3 and C4 A/B fragments from the complement system. Cross validation analysis using the whole casuistic showed 62.5% and 86.76% of sensitivity and specificity, respectively with a very high sensitivity (100%) and specificity (97%) for SCCP patients that have died by disease. Moreover, patients with lymph node involvement present a sensitivity and specificity of 80% and 97%, respectively. The results showed that as the disease progresses more under expressed are the cluster comparing with healthy subjects. These results may be useful as a prognostic tool.

Keywords: Penile cancer. Lymphadenectomy. Subexpression of fragments C3 and C4A / B of the complement system. Proteomics. Platform ClinProt / MALDI / TOF



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Carcinoma epidermóide invasivo ocupando glândula e corpo do pênis.....	15
Figura 2 –	Amputação peniana parcial.....	16
Quadro 1 –	Sistema de estadiamento do câncer de pênis (TNM 2002) da União Internacional Contra o Câncer (UICC).....	17
Figura 3 –	Amputação peniana total.....	18
Figura 4 –	Linfocintilografia.....	21
Figura 5 –	Imagens de ressonância magnética de câncer de pênis em estágio avançado.....	22
Figura 6 –	Tumor metastático ulcerado na região inguinal direita.....	23
Figura 7 –	Grande defeito decorrente da ressecção de tumor metastático inguinal...	23
Figura 8 –	Correção do grande defeito inguinal.....	24
Figura 9 –	Esquema de tratamento para os diversos estágios do carcinoma epidermóide de pênis.....	25
Figura 10 –	Organograma Clint Prot.....	34
Figura 11 –	Robô da ClintProt.....	40
Figura 12 –	Espectrômetro de massas MALDI UltrafleXtreme TOF / TOF.....	40
Figura 13 –	Curva ROC com área sob a curva (AUC) calculada.....	44
Figura 14 –	Gel virtual mostrando a diferença de intensidade entre o grupo controle e o grupo tumor.....	44
Figura 15 –	Diferença de intensidade entre os 2 picos (1897 e 2021 m/z) entre grupos controle (class 1) e tumor (class2).....	46

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Complicações operatórias associadas à linfadenectomia inguinal segundo várias séries publicadas na literatura mundial. ....	20
Tabela 2 – Dados dos pacientes.....	37
Tabela 3 – Seleção dos picos diferentemente expressos na fase de treinamento ( $P < 0.05$ ) entre controles (n=28) e pacientes com carcinoma de pênis(n=17).....	45
Tabela 4 – Comparação dos grupos quanto a eficácia no diagnóstico.....	47
Tabela 5 – Peptídeos identificados na fração eluída do plasma de pacientes com CEP e controles pelo LIFT MS/MS.....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-DE	Eletroforese bidimensional
AFP	Alfafetoproteína
AUC	<i>Area under curve</i>
β-HCG	gonadotrofina coriônica humana
CEP	Carcinoma epidermóide de pênis
CA 15.3	Antígeno carboidratado 15.3
CA 19.9	Antígeno carboidratado 19.9
CA 72.4	Antígeno carboidratado 72.4
CA 125	Antígeno carboidratado 125
CEA	Antígeno carcinoembrionário
DPD	<i>Differentialpeptide display</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EBV	vírus Epstein Barr
E-caderina	Caderina epitelial
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FH	Fator H
HCCA	Ácido α-ciano-4-hidroxicinamínico
HGT	<i>Hemoglucotest</i>
HPV	Vírus do Papiloma Humano
HUPO	<i>The HumanProteomeOrganization</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer
MALDI-TOF-MS	<i>Matrix Assisted Laser DesorptionIonization – Time OfFlight – Mass Spectrometry</i>
MCA	Antígeno mucóide associado ao câncer
MHC	Complexo de histocompatibilidade
mCRPs	Proteínas de membrana reguladoras do sistema complemento
MMP	Matrix metaloprotease
NK	Natural killer
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
PRSC	Proteínas reguladoras do sistema complemento

PSA	Antígeno prostático específico
UICC	União Internacional Contra o Câncer
RNA	Ácido ribonucleico
SELDI-TOF	<i>Surface-Enhanced Laser desorption ionization – Time of Flight</i>
ROC	<i>Receiveroperatingcharacteristic curve</i>
TA-4	Antígeno do carcinoma epidermóide
TDSFs	Fatores solúveis derivadodo tumor
UFF	Universidade Federal Fluminense

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>1 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	14
1.1 <b>Tratamento Cirúrgico do Tumor Primário</b> .....	14
1.2 <b>Abordagem das Áreas de Disseminação Metastática</b> .....	14
1.3 <b>Marcadores Tumorais</b> .....	26
1.4 <b>Proteoma e Proteômica</b> .....	28
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	35
<b>3 DESENHO EXPERIMENTAL</b> .....	36
3.1 <b>Pacientes e amostras</b> .....	36
3.2 <b>Desenho do estudo</b> .....	38
3.3 <b>Purificação da Amostra e Análise Proteômica</b> .....	38
3.4 <b>Análise de dados</b> .....	41
3.5 <b>Identificação dos peptídeos pelo MALDI-TOF/TOF</b> .....	41
<b>4 RESULTADOS</b> .....	43
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	49
<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	57
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	58
<b>APÊNDICE</b> - Artigo científico publicado: Downregulation of C3 and C4A/BComplement factorfragments in plasma from patients with squamous cellcarcinoma of the penis.....	67
<b>ANEXO A</b> – Parecer do comitê de ética em pesquisa.....	78
<b>ANEXO B</b> – Modelos dos termos de consentimento livre e esclarecido.....	80

## INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermóide de pênis (CEP) representa 95% das neoplasias penianas. Os 5% restantes, decorrem de metástases originadas em tumores de outros órgãos e de lesões tumorais menos frequentes (GURSEL *et al.*, 1973). No Brasil a sua incidência é de 2,7 % porém em algumas áreas do país pode chegar a 17% dos casos diagnosticados de câncer por ano (BRUNINI *et al.*, 1982, ORNELLAS *et al.*, 1994).

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). Em ordem para estabelecer o diagnóstico do tumor peniano, o primeiro passo é a confirmação histológica da lesão primária por biópsia. No grupo dos carcinomas epidermóides, os tipos histológicos mais comuns são o carcinoma epidermóide invasivo (**figura 1**), uma variante deste, o carcinoma verrucoso e o carcinoma *in situ*. A eritroplasia de Queyrat e a doença de Bowen são dois tipos descritos de carcinoma *in situ* do pênis, que são formas não invasivas.

No que diz respeito ao estadiamento, há muitas controvérsias a respeito de qual seria o melhor sistema de estadiamento a ser utilizado. Nenhum sistema de estadiamento para o carcinoma peniano é universalmente aceito. Atualmente, o método de estadiamento para o carcinoma peniano mais utilizado é a classificação TNM 2002 (**Quadro 1**) 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.

Sob o ponto de vista histológico o CEP é graduado utilizando a classificação de Broders. Em 1991, MAICHE e colaboradores introduziram uma modificação a este sistema de forma a classificar os tumores penianos de forma mais objetiva. Este sistema modificado é baseado no grau de queratinização, número de mitoses, atipia celular e presença de células inflamatórias. Utilizando este sistema modificado, os autores foram capazes de identificar uma taxa de sobrevida de 80% para tumores grau I, 50% para tumores grau II e 3 e 30% para

tumores grau 4. No entanto a maioria dos tumores de pênis é de baixo grau histológico (MAICHE *et al*, 1991, STAUBITZ, 1955).

O carcinoma epidermóide invasivo afeta quase sempre pacientes não circuncidados estando muitas vezes associado à falta de higiene local adequada e à fimose. 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). Os papilomavírus são vírus 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 & 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 epissomal, fora dos cromossomas, e podem 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).

McCANCE *et al.* (1986), demonstraram que a incidência dos subtipos de alto risco HPV16 e HPV18 nos carcinomas malignos de pênis alcança 50% nos pacientes brasileiros.

## 1 REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 Tratamento Cirúrgico do Tumor Primário

Pacientes portadores de lesões penianas restritas ao prepúcio podem ser tratados com segurança através de postectomia. Lesões que acometem a glândula sem invasão de estruturas profundas (tumores T1) podem ser tratados conservadoramente através de técnicas ablativas como o laser. Pacientes com lesões superficiais extensas na glândula (tumores T1) podem ser submetidos à ressecção parcial ou total da glândula, com o objetivo de manter o máximo de tecido peniano saudável. Pacientes com lesões maiores que 4 cm ou que acometam mais da metade da glândula devem ser tratados com ressecção completa da glândula, uma vez que a ressecção exclusiva destas lesões pode acarretar sérias deformidades penianas, com importante prejuízo funcional.

A penectomia parcial (**figura 2A e B**) está indicada para pacientes portadores de lesões invasivas distais penianas, promovendo excelente controle local da doença com taxas de recorrência inferiores a 6%. (HORENBLAS S, 1992). A excisão cirúrgica deve respeitar uma margem de tecido saudável de 1,5 a 2,0 cm, o que normalmente permite ao paciente urinar em posição ereta e manter a capacidade de ereção e penetração vaginal. Biópsias de congelação das margens cirúrgicas proximais são mandatórias para confirmação da ressecção livre de neoplasia.

A penectomia total (**figura 3**) é reservada para pacientes com lesões tumorais invasivas cujo tamanho e localização impedem a ressecção adequada com um remanescente peniano funcional. Avaliação psiquiátrica pré e pós-operatória são recomendadas para confirmação da capacidade emocional do paciente em aceitar a cirurgia proposta e suas implicações futuras.

### 1.2 Abordagem das Áreas de Disseminação Metastática

Os vasos linfáticos do pênis drenam para ambas as regiões inguinais através de intercomunicações dos canais linfáticos do prepúcio, da glândula e do corpo do pênis. O CEP se dissemina predominantemente por difusão pelos canais linfáticos para os linfonodos inguinais superficiais e profundos e subsequentemente para os linfonodos pélvicos. A drenagem dos gânglios inguinais ocorre para os linfonodos pélvicos ipsilaterais. Vinte e cinco por cento dos pacientes com CEP apresentam acometimento de cadeia linfonodal inguinal no momento do

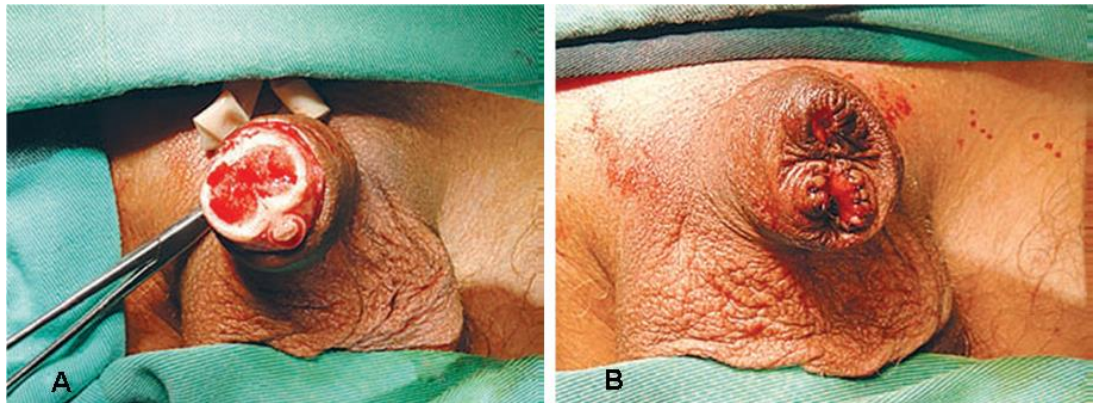


diagnóstico. O exame físico não é um preditor confiável do comprometimento linfonodal (ORNELLAS *et al.*, 2008) pois pacientes com linfonodos palpáveis podem não apresentar metástases. Por outro lado micrometástases podem estar presentes em até 39% dos linfonodos clinicamente negativos (ORNELLAS *et al.*, 1994). O método de avaliação dos linfonodos inguinais permanece controverso sendo difícil à diferenciação entre linfadenomegalia inflamatória reacional e metastática. A linfadenopatia inguinal está presente em 50% dos casos de câncer de pênis, porém isto necessariamente não quer dizer que os linfonodos estejam comprometidos pelo tumor já que não foram encontrados metástases linfonodais em 50% dos pacientes com linfonodos palpáveis na região inguinal.

Figura1: Carcinoma epidermóide invasivo ocupando glândula e corpo do pênis



Figura 2: Amputação peniana parcial



Legenda: (A) Amputação peniana parcial com exposição dos corpos cavernosos e individualização da uretra.

(B) Aspecto final da cirurgia.após sutura da uretra e da pele

Quadro 1: Sistema de estadiamento do câncer de pênis (TNM 2002) da União Internacional  
Contra o Câncer (UICC)

### **T TUMOR PRIMÁRIO**

Tx: Tumor primário não avaliado  
T0: Sem evidência de tumor  
Tis: Carcinoma in situ  
Ta: Tumor verrucoso  
T1: Tumor invade tecido conectivo subepitelial  
T2: Tumor invade corpo cavernoso e/ou esponjoso  
T3: Tumor invade uretra ou próstata  
T4: Tumor invade estruturas adjacentes

### **N LINFONODOS REGIONAIS**

Nx: Linfonodos não avaliados  
N0: Sem metástases em linfonodos  
N1: Metástase única em linfonodo inguinal superficial  
N2: Metástases múltiplas ou bilaterais em linfonodos inguinais superficiais  
N3: Metástases em linfonodos inguinais profundos e/ou ilíacos

### **M METÁSTASES A DISTÂNCIA**

Mx: Metástases não avaliadas  
M0: Ausência de metástases a distância  
M1: Metástases a distância

Figura 3: Amputação peniana total



Legenda: Os corpos cavernosos foram totalmente ressecados. A bolsa escrotal foi utilizada para fechar o defeito resultante da cirurgia. A uretra foi reimplantada de forma a permitir a micção do paciente em pé, direcionando o jato urinário com a bolsa escrotal.

Desta forma há o risco de pacientes serem operados desnecessariamente se submetermos todos à linfadenectomia rotineira. Ao mesmo tempo, 20% dos pacientes sem comprometimento linfonodal ao exame clínico apresentam micrometástases. Diante desses fatos, linfadenectomia inguinal bilateral profilática é considerada desnecessária em mais de 80% dos pacientes com CEP e linfonodos impalpáveis (ABI-AAD *et al.*, 1992).

A linfadenectomia inguinal e/ou pélvica tem sido associada com altas taxas de complicações (BEVAN-THOMAS *et al.*, 2002). Na **tabela 1** são mostradas as taxas de complicação de séries cirúrgicas contemporâneas. CABANAS (1977) recomenda a biópsia de linfonodos sentinelas que seriam os primeiros sítios de metástases do carcinoma de pênis na tentativa de identificar metástases para linfonodos inguinais sem submeter os pacientes portadores de carcinoma epidermóide invasivo à linfadenectomia.

A técnica de linfocintigrafia com injeção intradérmica peri-tumoral de tecnécio 99m (figura 4A,B,C,D,E) tenta melhorar a sensibilidade do método de detecção do linfonodo sentinela. A linfocintigrafia pré-operatória combinada com mapeamento linfático intra-operatório (com azul patente e manipulação com gama probe para detectar radiação) foi

associada, na experiência do Instituto Nacional de Câncer Holandês, com uma taxa de falso-negativos de 16% (6/37 pacientes), (KROON, 2005).

Outro aspecto a ser enfatizado é a evolução dos pacientes com metástases inguinais que não foram submetidos à linfadenectomia e apresentam lesões metastáticas avançadas (**figura 5 e 6**). Frequentemente o cirurgião é pressionado a resolver uma situação insolúvel. Ocasionalmente, porém, a ressecção da massa metastática (**figura 7**) aliado a técnicas de reconstrução promove algum grau de palição para pacientes com doença loco-regional avançada (**figuras 8A, B, C e D**). Os resultados, a curto prazo, com as cirurgias paliativas higiênicas são bons já que este tipo de tratamento é proposto senão para visar a cura, para proporcionar aos pacientes uma reintegração social. A maior parte dos pacientes volta ao convívio de seus familiares sem as feridas infectadas causadas por recidivas e metástases. A longo prazo os resultados não são bons quando analisamos a sobrevida dos pacientes.

Na **figura 9** mostramos um algoritmo utilizado no Instituto Nacional de Câncer e no Hospital Mário Kröeff para o tratamento do tumor primário e das regiões inguinais de pacientes portadores de câncer de pênis.

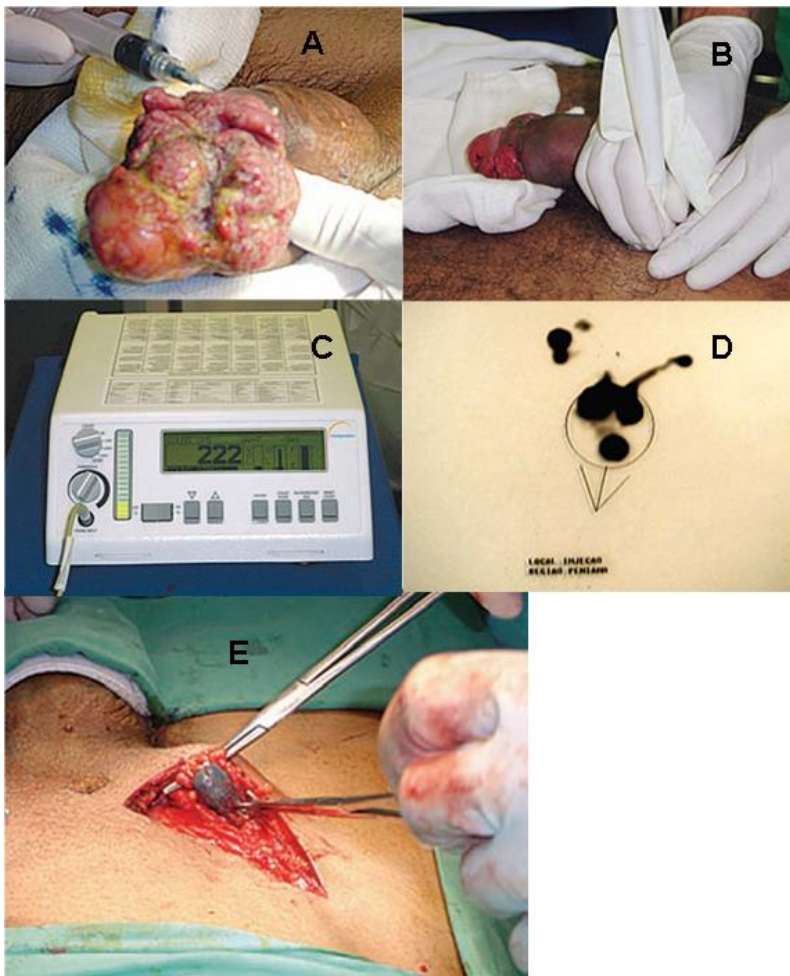
Tabela 1: Complicações operatórias associadas à linfadenectomia inguinal segundo várias séries publicadas na literatura mundial

Estudo	Ano	# de Pcs	Taxa de complicação (%)	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	1993	112	–	–	25	9	16
Kamat et al.	1993	31	87	–	–	–	–
Lopes et al.	1996	145	–	–	18	–	30
Darai et al.	1988	85	–	12	14	3	32 (severa)
Ayyappan et al.	1994	78	–	70	36	87	57 (severa)
Coblentz et al.	2002	22	45	9	9	27.2	0
Bevan-Thomas et al.	2002	53	57	10	8 (necrose)	–	23
Nelson et al.	2004	22	–	7.5 (menor)	2.5 (necrose)	15	15
Spiess 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

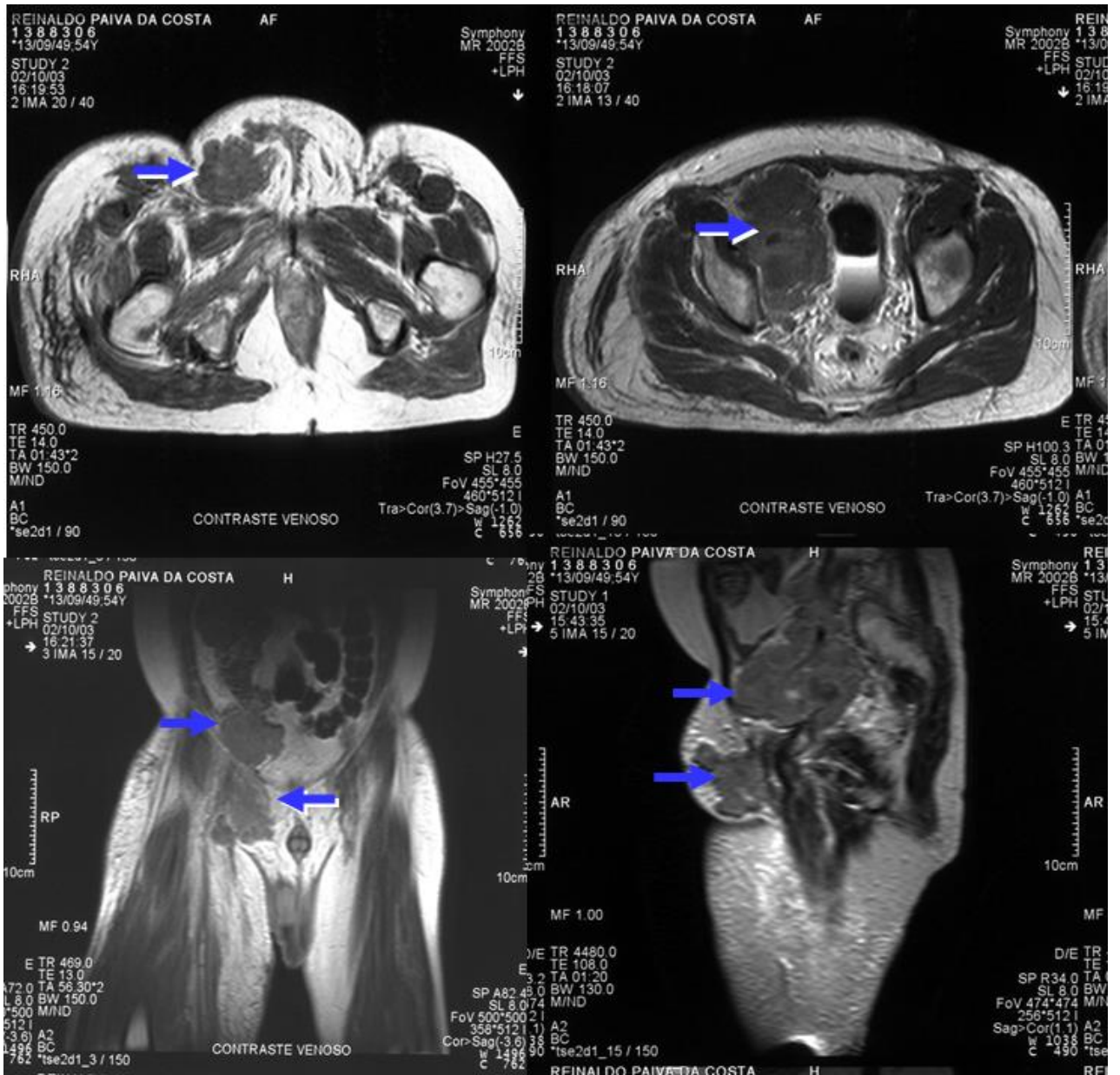
\* Incisão de Gibson

Figura 4: Linfocintilografia



**Legenda:** (A) Administração intradérmica de corante azul patenteado e de tecnécio-99 m ao redor do tumor primário. (B e C) Detecção do linfonodo sentinela através do transdutor de raios gama. (C) Linfocintilografia pré-operatória. (E) Identificação intraoperatória do linfonodo

Figura 5: Imagens de ressonância magnética de câncer de pênis em estágio avançado



Legenda: Imagens evidenciando grande massa na região inguinal direita compressão dos vasos íliacos e da bexiga. Além do comprometimento da região ilíaca há expansão da massa para o espaço retroperitoneal



Figura 6: Tumor metastático ulcerado na região inguinal direita



Figura 7: Grande defeito decorrente da ressecção de tumor metastático inguinal

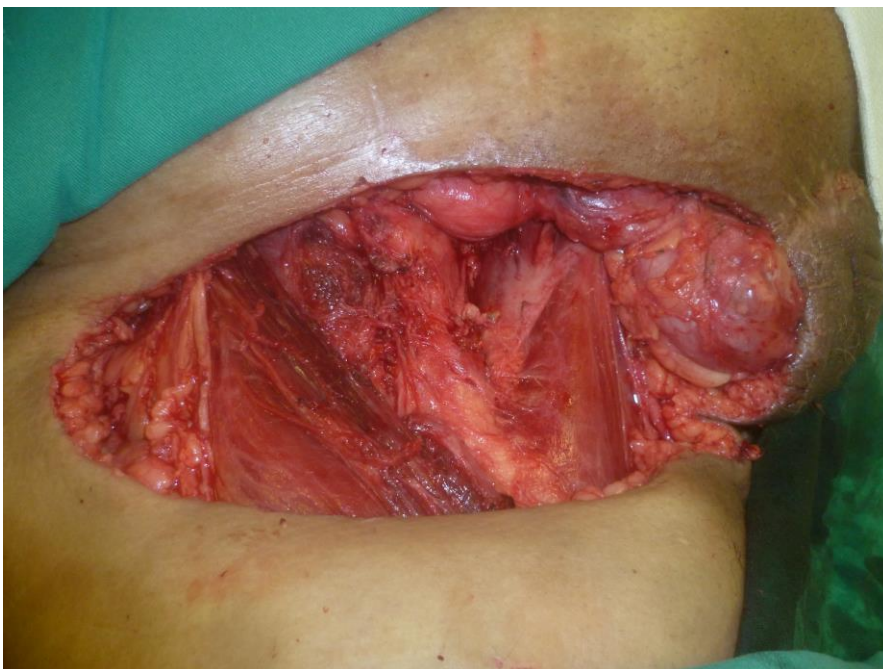
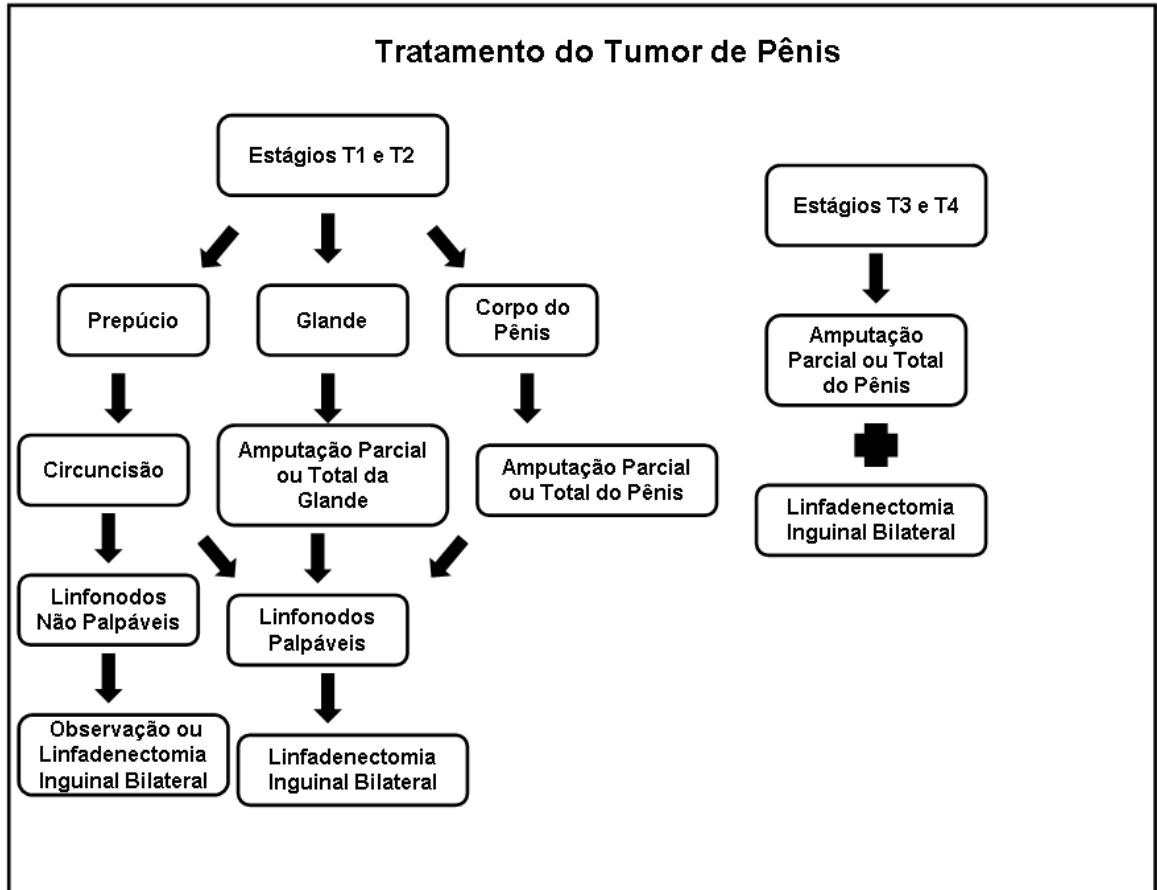


Figura 8: Correção do grande defeito inguinal



Legenda: (A) Marcação da área do enxerto que será utilizada. (B) Início da mobilização do retalho. (C) O retalho miocutâneo é liberado até a inserção dos seus vasos sanguíneos. (D) O retalho é girado na sua base de forma a cobrir o defeito inguinal, área exposta na coxa é coberta com enxerto livre de pele

Figura 9: Esquema de tratamento para os diversos estágios do carcinoma epidermóide de pênis



### 1.3 Marcadores Tumorais

Ao longo da História, foram descritos vários biomarcadores de neoplasias. Entre os principais marcadores tumorais estão: AFP (alfafetoproteína) que é usada na monitorização do carcinoma de testículo e no diagnóstico de hepatocarcinoma; MCA (antígeno mucóide associado ao carcinoma), utilizado na monitoração do carcinoma mamário; Cromogranina A (marcador de tumores endócrinos); Telomerase, usada como marcador nos tumores uroteliais da bexiga; CA 72.4, utilizado no acompanhamento de tumores gastrointestinais;  $\beta$ -HCG (gonadotrofina coriônica humana), utilizado no diagnóstico, monitoração e diagnóstico de tumores de células germinativas; CA 125, usado no seguimento do câncer de ovários; CA 15.3, marcador do câncer de mama; CA 19.9, indicado no auxílio ao estadiamento e à monitoração de tratamento no câncer de pâncreas e do trato biliar; CEA (antígeno carcinoembrionário), utilizado no seguimento de pacientes com câncer colorretal; PSA (antígeno prostático específico), usado no rastreamento e acompanhamento de pacientes com câncer de próstata. O marcador ideal reúne as seguintes características: ser de fácil acesso, possibilitar o diagnóstico precoce de neoplasias e a descoberta da sua origem, estabelecer a extensão da doença, monitorar a resposta terapêutica e detectar precocemente recidivas (REIS, 2005; ROSA *et al*, 2005; GOMES, 1997). Além disso, os biomarcadores ideais devem ser órgão-sítio específicos e terem meia-vida curta, permitindo acompanhar temporariamente as mudanças do tumor (SILVEIRA *et al*, 2005). Por ser uma doença rara, há poucas publicações sobre os mecanismos moleculares envolvidos na gênese e na progressão do CEP (PROTZEL *et al*, 2008). Apesar de vários marcadores terem sido avaliados, atualmente a aplicação clínica destes é limitada. A maior parte dos marcadores estudados é tecidual e requerem procedimentos invasivos para obtenção do tecido tumoral.

Vários marcadores têm diferentes funções biológicas que parecem ser úteis para avaliar o prognóstico de pacientes com CEP. Evidências recentes sugerem que a caderina epitelial (E-caderina), matrix metaloprotease (MMP-9), a p53, o Ki-67 e a proteína KAI1/CD82 podem ser indicadores promissores de metástase em câncer de pênis. As E-caderinas são moléculas de adesão celular cuja expressão diminuída está envolvida nos mecanismos de desenvolvimento de metástases. (BEHRENS, 1989). Uma imunoreatividade diminuída à E-caderina tem sido correlacionada ao risco de metástases em vários tipos de câncer (UMBAS, 1992; INADA, 1999; RODRIGO, 2002). Matrix metaloproteases (MMP-2 e MMP-9) fazem parte de um grupo de enzimas que degradam o colágeno tipo IV na membrana basal estando envolvidas no mecanismo de invasão e da instauração de metástases

(EGLEBAD, 2002). Campos e colaboradores (2006) em um estudo com 125 pacientes com tumor de pênis tratados com amputação e linfadenectomia bilateral mostraram que a baixa imunoreatividade de E-caderina estava relacionada com um maior risco para metástase linfonodal e que a imunoreatividade para MMP-9 era um fator de risco para recorrência da doença.

O gene supressor de tumor *TP53* (p53) está envolvido na apoptose celular e suas mutações, estão associadas com a progressão da doença de muitos tipos de tumores (GAO, 2000). O aumento da expressão imunohistoquímica de *TP53* nos carcinomas penianos varia de 26% a 40% havendo correlação com a infecção por vírus do papiloma humano (Levi, 1998; Lam, 1995). Martins e colaboradores (2002) em um estudo com 50 pacientes portadores de câncer de pênis, demonstraram que o aumento de expressão da proteína p53 estava associada à disseminação metastática e à recorrência, sendo causa de morte específica.

Ki-67 é uma proteína de matriz nuclear não-histona expressa em todas as fases do ciclo celular, exceto em G0. Uma avaliação da expressão da proteína Ki-67, por imunohistoquímica é um meio confiável de avaliar a proliferação celular tumoral. (SCHOLZEN, 2000). O percentual de marcação Ki-67 está relacionado com o grau do tumor no câncer de pênis e pode indicar um maior risco de metástase nodal (BERDJIS, 2005).

ZHU e colaboradores (2007) em um estudo com 73 pacientes submetidos à amputação de pênis e à linfadenectomia regional correlacionaram a expressão das proteínas p53, Ki-67 e E-caderina com metástases para linfonodos. Pela análise multivariada, a embolização tumoral e a expressão da p53 foram preditores independentes de metástase.

A proteína da membrana da célula KAI1 ("kang ai" em chinês igual a "anti-câncer"), também conhecida como CD82 foi originalmente descrita como supressor de metástase no câncer da próstata (DONG, 1995). A subexpressão desta proteína KAI1/CD82 se correlaciona com a ocorrência de metástase, com o prognóstico e com a presença de DNA do HPV em carcinoma epidermóide do pênis (PROTZEL, 2008).

Diferentemente dos marcadores acima citados o antígeno do carcinoma epidermóide é um antígeno circulante medido no soro do paciente através de uma técnica pouco invasiva. Este antígeno foi primeiramente isolado em pacientes com câncer de colo do útero sendo descrito em 1977 como TA-4 (Kato, 1977). O TA-4 é uma glicoproteína com o peso molecular de aproximadamente 48 kDa. No câncer de colo do útero, a carga tumoral e o padrão de crescimento infiltrativo têm sido associados com o aumento sorológico dos níveis de TA-4 (CROMBACH, 1989). Em dois estudos envolvendo pacientes com CEP, os níveis de TA-4 se apresentaram diretamente proporcionais com o estágio da doença (TAKAHASHI,

1987; WISHNOW, 1990). Quanto mais a doença progride com metástases para linfonodos, maiores são os níveis deste antígeno. Outro estudo realizado por HUNGERHUBER *et al* em 2007, revelou que o TA-4 apenas apresentou uma elevação expressiva em pacientes com metástases para outros órgãos ou em estágios avançados com envolvimento linfonodal maciço. Dessa forma, o nível deste antígeno parece não ser útil na detecção precoce de metástases linfonodais ocultas. No entanto, este marcador parece ser um parâmetro confiável para controle do tratamento porque os níveis de TA-4 se correlacionarem com a carga tumoral.

No entanto, novos biomarcadores ainda são necessários para a detecção de metástases precoces, prognóstico, seguimento da doença e melhor compreensão da doença ao nível molecular. Ainda existe um dilema no tratamento de pacientes com CEP. Especula-se sobre a necessidade de linfadenectomia em pacientes sem evidências clínicas de acometimento linfonodal já que metástase para região inguinal constitui um importante fator prognóstico para sobrevida em pacientes com CEP. Desse modo, na abordagem desses pacientes é importante que se faça o estadiamento linfonodal correto para que não sejam necessários para isto procedimentos invasivos (ORNELLAS *et al*, 2008).

Um estadiamento confiável só pode ser obtido mediante a realização de linfadenectomia e envio de peça para análise histopatológica. Além disto, devemos encontrar um meio de evitar operar pacientes quando já apresentem doença avançada fora de possibilidades cirúrgicas curativas. É necessário encontrar métodos não invasivos confiáveis para prever o prognóstico da doença e estabelecer condutas menos agressivas para aqueles pacientes com baixo risco para metástases. Portanto é muito importante a pesquisa de potenciais biomarcadores visando encontrar fatores de risco para metástases que influenciem no prognóstico e na abordagem cirúrgica dos pacientes assim como alvos terapêuticos que possam ser utilizados no tratamento do câncer de pênis.

#### **1.4 Proteoma e Proteômica**

A medição dos níveis de marcadores específicos em fluidos corporais como soro ou plasma, é o método mais comumente utilizado em diagnóstico de doenças. É relativamente pouco invasivo e, em certos casos, com treinamento e supervisão adequada, pode ser realizada pelos próprios pacientes. Por exemplo, pacientes diabéticos podem mensurar seu nível glicêmico através de um teste simples, o *hemoglucotest* (HGT). No entanto, a maioria dos biomarcadores sanguíneos atuais é inadequada em especificidade e sensibilidade para o

diagnóstico definitivo da doença. Um dos principais focos da pesquisa biomédica nas últimas décadas tem sido a de identificar biomarcadores nos fluidos corporais que tenham associação clara com a doença. A maioria dessas atividades está centrada na identificação de biomarcadores à base de proteínas, no entanto, o resultado destas pesquisas está longe de ser alcançado. O termo proteoma foi usado pela primeira vez em 1995 tendo sido definido como o “conjunto de proteínas expressas por um genoma, uma célula ou um tecido num dado momento” (WASINGER *et al.*, 1995). Já a proteômica é “a análise sistemática de proteínas e suas características, quantidades e funções”. Ou seja, a proteômica é uma metodologia da biologia molecular, a qual tem como objetivo documentar a distribuição geral de proteínas da célula, identificar e caracterizar proteínas individuais de interesse e principalmente elucidar as suas associações e funções. Sendo assim, proteômica fundamenta-se em princípios bioquímicos, biofísicos e de bioinformática para quantificar e identificar as proteínas expressas, pois elas se alteram conforme o desenvolvimento de um organismo assim como em resposta aos fatores do ambiente. A evolução da biotecnologia proteômica contribuiu para que o estudo do proteoma deixasse de ser uma análise isolada de química de proteínas para que se tornasse uma tecnologia de larga escala que pode ser aplicada às diversas áreas de pesquisas biomédicas e na clínica. A aplicação moderna da espectrometria de massas para identificação de sequências peptídicas fez com que a tecnologia proteômica tenha se tornado uma das melhores maneiras de analisar a expressão gênica.

A parte do proteoma que estuda os fluidos biológicos (urina, plasma, saliva, suor, líquido amniótico, lágrima, sêmen e liquor) é denominada de Secretoma. Este termo foi usado pela primeira vez por TJALSMA *et al* (2000) referindo-se as proteínas secretadas pela bactéria *Bacillus subtilis*. Em sua série clássica PUTNAM (1975- 1987) definiu proteínas plasmáticas verdadeiras como aquelas que realizam suas funções na circulação. Sendo excluídas assim, as proteínas que atuam como mensageiros (por exemplo hormônios) ou que são secretados para o sangue, como resultado de um dano tecidual (por exemplo, mioglobina cardíaca lançada no plasma, após um ataque cardíaco). Esta definição funcional enfatizou corretamente o fato de que proteínas podem aparecer no plasma para uma variedade de razões diferentes. Atualmente, esse termo tem sido aplicado mais amplamente referindo-se às proteínas encontradas nos fluidos biológicos associadas às patologias que são consideradas marcadores circulantes.

Na era pós genômica, é evidente que muitos processos biológicos não estão associados apenas ao DNA. Tem sido demonstrado que a expressão genética direta só é responsável por uma pequena parte da complexidade de um organismo vivo (ALPANTAKI *et al.*, 2007). A

taxa de transcrição, medida através de RNA mensageiro, nem sempre tem uma relação direta com a atividade biológica da proteína ou das proteínas, sua função ou a quantidade (BISCH, 2004). O fato de as células terem o mesmo genoma não implica em dizer que tais células apresentem a mesma função e morfologia. Isso acontece devido às diferentes composições de proteínas expressas por estas células nas mais variadas condições. Enquanto o DNA é o centro de informações da célula, as proteínas realizam o trabalho para a célula. A proteômica é o estudo em grande escala das proteínas, e é associada tradicionalmente com a exibição de um grande número de proteínas a partir de uma dada linhagem celular ou organismo. A proteômica é complementar à genômica, porque se concentra nos produtos dos genes, que são os agentes ativos na células.

A importância de se analisar o conjunto total de proteínas diferencialmente expressas entre grupo controle e o grupo de interesse, nos permite observar as proteínas que desempenham funções fisiológicas e patológicas. Além disso, estão sujeitas às modificações pós-traducionais, as quais vão influenciar o enovelamento correto para formação da estrutura tridimensional, a localização, a interação com outras proteínas. A tecnologia de proteômica ganhou mais importância por possibilitar o desenvolvimento de novas drogas (BISCH, 2004). Geralmente o alvo dos medicamentos são as proteínas e não os ácidos nucleicos. O desenvolvimento de drogas direcionadas para uma determinada proteína numa condição patológica poderia curar ou amenizar os sintomas com menos efeitos colaterais.

O plasma sanguíneo contém numerosas proteínas pouco abundantes que são importantes para as cascatas de sinalização e regulação de processos biológicos. O câncer pode ser acompanhado pela produção e liberação no sangue de um número substancial de proteínas. Essas proteínas podem servir como marcadores para avaliar o prognóstico, o acompanhamento do tratamento e a detecção precoce de doença maligna. A identificação de marcadores clinicamente úteis é um desafio fundamental.

Em fevereiro de 2001, *The Human Proteome Organization* (HUPO, <http://www.hupo.org/>) foi fundado para integrar projetos de pesquisas na proteômica, ampliando o conhecimento global e o suporte para a análise das proteínas em larga escala (HANASH et al., 2002). Um conselho formado por expertises no campo da proteômica foi oficialmente formado por acadêmicos e membros do governo. Estes defendem que a elucidação de padrões de produção de proteínas seja o elemento central para o entendimento das funções celulares. Diversas iniciativas já foram escolhidas incluindo o projeto proteoma do cérebro, pulmão e do fígado (TAYLOR et al, 2006).



A HUPO concluiu também, um estudo colaborativo para caracterizar o proteoma do soro e do plasma humano (STATES, 2006). Baseado neste banco de dados TANNEM e colaboradores (2005) comparou amostras de plasma e soro pela técnica peptidômica DPD (*differential peptide display*). A peptidômica resume tecnologias de visualização, quantificação e a identificação de proteínas de baixo peso molecular, o "peptidoma." A DPD é uma técnica peptidômica para gerar mapas de peptídeos a partir de qualquer amostra biológica cobrindo uma faixa de massa de 750-15000Da. Neste estudo um grande número de peptídeos, muitos deles de alto peso molecular, estavam apenas presentes no soro e no plasma não era detectável. Foi concluído assim, que o plasma era uma amostra preferida na análise de peptídeos e proteínas de baixo peso molecular (<20 kDa).

O processo de coagulação no preparo do soro é um processo proteolítico que libera grandes quantidades de peptídeos. Dessa forma, estes peptídeos são derivados de atividades enzimáticas ou da liberação de peptídeos do coágulo na coleta das amostras. A análise de proteínas de baixo peso molecular no soro tem sido corriqueiramente avaliada quanto ao seu potencial valor diagnóstico de cânceres em estágio inicial por vários estudos (PETRICOIN *et al.*, 2002; VILLANUEVA *et al.*, 2004). Os resultados desses estudos iniciaram um debate quanto ao seu conteúdo e sua interpretação (DIAMANDIS *et al.*, 2004., CHECK *et al.*, 2004). Ainda não está claro se esses peptídeos encontrados no soro refletem diretamente a atividade da doença ou se esses peptídeos são gerados devido a fatores secundários após o processamento do soro. Doenças malignas podem gerar distúrbios da coagulação e prejudicar a etapa de processamento do soro mascarando ou, às vezes, superestimando determinados marcadores. No entanto, o soro pode ser útil na validação de biomarcadores encontrados no plasma.

A abordagem proteômica clássica consiste de duas tecnologias principais: eletroforese bidimensional (2-DE) e a espectrometria de massas MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight – Mass Spectrometry). A tecnologia 2-DE pode simultaneamente separar e visualizar centenas a milhares de proteínas de acordo com o seu ponto isoelétrico e peso molecular. Já a tecnologia MALDI-TOF MS pode separar proteínas alvo com alta sensibilidade e precisão de acordo com as suas velocidades massa-dependentes ( $m/z$ ) (CHANG, 2006). Estas tecnologias encontram barreiras por serem trabalhosas, pouco reprodutíveis e não poderem detectar baixas concentrações de proteínas (LI *et al.*, 2002). Além disso, o uso de amostras como plasma/soro para a descoberta de novos biomarcadores, é uma tarefa desafiadora devido à larga gama de proteínas abundantes no plasma (com mais de 10 ordens de magnitude). Aproximadamente 99% do total de massa proteica é composta

por proteínas mais abundantes como albumina, fibrinogênio, anti-tripsina, alfa-2-macroglobulina, haptoglobina, tranferrina, imunoglobulina IgG e IgA. Com isso, um pré-fracionamento das amostras de plasma/soro, antes da realização dessas tecnologias, se faz necessário à medida que proteínas menos abundantes expressas em determinadas condições patológicas podem ser mascaradas pelas proteínas mais abundantes.

Uma das primeiras abordagens com pré-fracionamento de fluidos biológicos que utilizou como metodologia uma superfície (chip) ativada foi a *Surface-Enhanced Laser desorption ionization – Time of Flight* (SELDI-TOF). A metodologia SELDI-TOF é provavelmente uma das mais conhecidas e amplamente usada. Nesta abordagem, fluidos biológicos são aplicados diretamente a uma placa com superfície de propriedades físicoquímicas e depois introduzida em um espectrômetro de massa. Superfícies comuns incluem CM10 (troca de íons fracos positivos), H50 (superfície hidrofóbica, semelhante a cromatografia de fase inversa C6-C12), IMAC30 (superfície metálica de ligação), e Q10 (um forte permutador aniônico). Superfícies também podem ter uma função ativada com anticorpos, proteinases e por DNA. Essa tecnologia não é isenta de críticas. Em particular referentes a reprodutibilidade dos resultados que não é boa devido ao ruído ou ao uso de diferentes lotes de chips. Além disso, a identificação direta destes marcadores não pode ser realizada utilizando o sistema SELDI-TOF.

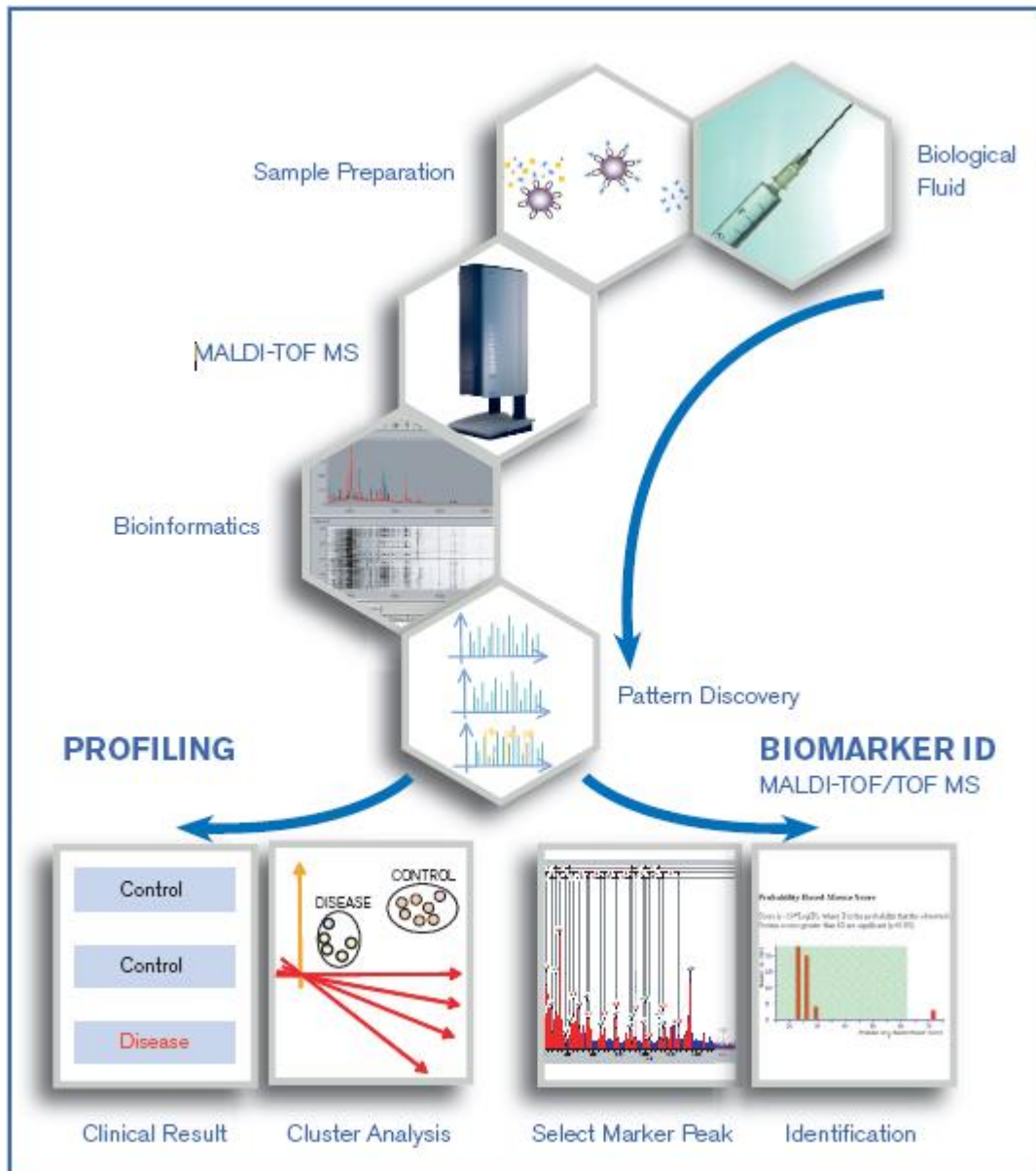
Uma alternativa à tecnologia de SELDI-TOF surgiu com o uso de esferas magnéticas (*magnetic beads*) com uma superfície ativada ou em cromatografia miniaturizada que permitem fracionamento das proteínas presentes nos fluidos antes da análise por espectrometria de massas. A seleção de proteínas ou peptídeos com esferas magnéticas combinadas com MALDI-TOF-MS tem se mostrado uma alternativa poderosa em relação ao SELDI-TOF. A superfície ativa de esferas magnéticas é muito maior do que o SELDI, resultando em uma maior capacidade de ligação (Magni *et al.*, 2010).

ClinProt (Bruker Daltonics, Alemanha) é um sistema comercial integrado para separação, preparação, medição e visualização de peptídeos e proteínas diretamente a partir de fluidos biológicos. Este sistema é composto por três partes: uma responsável pela preparação da amostra com esferas magnéticas; um espectrometro de massa MALDI-TOF para aquisição dos íons; e um software para a inspeção e comparação dos conjuntos de dados, bem como para a descoberta do padrão de biomarcadores complexos (**Figura 10**).

Além das esferas magnéticas, outras abordagens podem ser utilizadas para fracionar as proteínas antes da análise final por espectrometria de massas. Uma alternativa é o sistema recentemente desenvolvido *ProteoMiner* de pré-fracionamento usando uma combinação de

seis peptídeos ligantes acoplados a superfície externa das esferas magnéticas (BOSCHETTI *et al.*, 2008.). A lógica era de melhorar a capacidade de separação de proteínas a partir de fluidos usando não um único aminoácido mas um pequeno peptídeo. O kit *ProteoMiner* tem um estoque de peptídeos ligados a esferas (*bead-bound*), onde os peptídeos contêm combinações aleatórias de seis aminoácidos, fornecendo pontos de ligação para proteínas diferentes. Durante o período de incubação dos biofluidos com as esferas magnéticas, todas as proteínas competem por um vasto número de ligação em diferentes pontos. Ao mesmo tempo, há apenas um pequeno número de ligantes que se ligam a mesma proteína, limitando assim, o número de moléculas mais abundantes idênticas que podem se ligar a coluna com as esferas e enriquecendo as de menor abundância (BANDOW, 2010).

Figura 10: Organograma Clint Prot



Fonte: Bruker Applications Notes # MT-72 Disponível : [www.care-bdal.de](http://www.care-bdal.de) / [www.care-bdal.com](http://www.care-bdal.com)

## 2 OBJETIVOS

- Investigar através da plataforma ClinProt/ MALDI / TOF a presença de marcadores plasmáticos capazes de discriminar indivíduos saudáveis de pacientes afetados por carcinoma epidermóide de pênis (CEP)
- Avaliar a importância destes marcadores na evolução da doença.
- Comparar o proteoma de amostras de plasma de pacientes com carcinoma de pênis em relação ao plasma de homens adultos saudáveis utilizando a plataforma ClinProt.

### 3 DESENHO EXPERIMENTAL

#### 3.1 Pacientes e amostras

Vinte e cinco pacientes com câncer de pênis tratados no INCA e no Hospital Mário Kröeff foram incluídos neste estudo após autorização dos comitês de ética do hospital (registro CEP: CCEC-38/05). Além disso, utilizou-se amostras de sangue de 36 indivíduos saudáveis (doadores de sangue voluntários) que se submeteram à circuncisão no Hospital Santa Verônica. A idade média dos pacientes e controles foi de 63,53 (intervalo: 38-90) e 60 anos (intervalo: 23-83), respectivamente. A média do acompanhamento dos pacientes foi de 9 meses (intervalo: 1-36). Os dados coletados estão representados na **(tabela 2)**. Devido ao pequeno número de pacientes, não foi realizada a estratificação de acordo com os fatores de risco. A maior parte dos pacientes eram portadores de carcinomas bem e moderadamente diferenciados, sendo as lesões pouco diferenciadas bastante mais raras. As amostras de tecido tumoral foram submetidas à tipagem de HPV por PCR (Reação de Polimerização em Cadeia) no Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal Fluminense (UFF) sob orientação da Dra Silvia Cavalcanti (CAVALCANTI *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 2007). As amostras controle não foram tipadas pois os pacientes não apresentavam lesões clinicamente visíveis ou história de infecção prévia por HPV.

Após o diagnóstico de carcinoma de pênis, 5 mL de sangue foram coletados antes da cirurgia em um tubo com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). Em torno de 2,5 mL de plasma foram obtidos após centrifugação em 1500 g por 10 min. Os plasmas foram congelados a -80°C e enviados para Universidade de Milano Bicocca na Itália, em gelo seco. Um total de 25 amostras de plasma de pacientes com carcinoma de pênis, submetidos ao tratamento cirúrgico no Hospital Mário Kröeff ou no INCA, foi coletado após a aprovação do comitê de ética. Além disso, foram coletadas amostras de plasma de 36 pacientes saudáveis submetidos à circuncisão na clínica Santa Verônica. Todos os pacientes assinaram o consentimento informado. Os termos de consentimento dos pacientes e dos controles foram aprovados pelo comitê de ética do INCA pelos projetos “Secretoma de Câncer de Rim e de Pênis, registro 38/05” e “Detecção de oncovírus humanos em lesões malignas do trato genital masculino, registro 067/07).

Tabela 2: Dados dos pacientes

Pac	Idade	Raça *	Grau	Invasão vascular	Estadiament o	Cirurgia	Seguimento	Óbitos	HPV
1	41	Mulato	MD***	Negativo	pT2N2Mx	Amp Parcial. + linfadenectomia inguinal bilateral	12 meses		Negativo
2	41	Mulato	MD	Negativo	pT3N0Mx	Amp Parcial . + linfadenectomia inguinal bilateral	12 meses		positivo
3	62	Negro	MD	Negativo	pT2N0Mx	Amp. Total . + linfadenectomia inguinal bilateral	36 meses		16+
4	62	Branco	MD	Negativo	pT1N0Mx	Amp Parcial	2 meses		Positivo
5	38	Branco	BD**	Negativo	pT1N2Mx	Amp Parcial . + linfadenectomia inguinal bilateral	1 meses		6,45
6	45	Branco	MD	Negativo	pT1N1Mx	Amp Parcial . + linfadenectomia inguinal bilateral	12 meses		positivo 31
7	51	Branco	MD	Negativo	pT2N0M0	Amp Parcial . + linfadenectomia inguinal bilateral	24 meses		negativo my -
8	57	Negro	BD	Negativo	pT3N2Mx	Amp Parcial + linfadenectomia inguinal bilateral	18 meses		positivo
9	54	Mulato	MD	Negativo	pT2N0Mx	Amp Parcial + linfadenectomia inguinal bilateral	3 meses		Negativo
10	73	Branco	BD	Positivo	pT2N3Mx	Amp Parcial . + linfadenectomia inguinal direita	11 meses	11/08/2008	negativo my -
11	76	Negro	MD	Negativo	pT2N0Mx	Amp Parcial . + linfadenectomia inguinal bilateral	5 meses	03/05/2009	negativo my -
12	57	Branco	MD	Negativo	pT3N0Mx	Amp Parcial . + linfadenectomia inguinal bilateral	7 meses		Positivo
13	80	Branco	BD	Negativo	pT2N0Mx	Amp Parcial + linfadenectomia inguinal bilateral	24 meses		Sem DNA
14	84	Branco	MD	Negativo	pT2NxMx	Amp Parcial	3 meses	11/30/2008	positivo 6 / 18
15	86	Branco	MD	Negativo	pT3NxMx	Amp. Total .	8 meses		negativo
16	64	Branco	MD	Negativo	pT3N3Mx	Amp Parcial .+ linfadenectomia inguinal bilateral	5 meses	11/21/2007	45
17	80	Branco	MD	Positivo	pT4NxMx	Emasculação + linfadenectomia inguinal bilateral	8 meses	11/28/2009	45
18	90	Branco	PD****	Negativo	pT1NxMx	Amp Parcial	1 meses		Sem DNA
19	83	Branco	BD	Negativo	pT2N3Mx	Amp Parcial .+ linfadenectomia inguinal bilateral	8 meses	12/01/2009	Positivo
20	55	Mulato	MD	Negativo	pT3N2Mx	Emasculação + linfadenectomia inguinal bilateral	4 meses		Sem DNA
21	61	Mulato	MD	Negativo	pT2N0Mx	Amp. Total . + linfadenectomia inguinal bilateral	9 meses		positivo 58
22	71	Branco	MD	Negativo	pT2N0Mx	Amp Parcial .+ linfadenectomia inguinal bilateral	1 meses		Positivo
23	56	Mulato	BD	Negativo	pT2N0Mx	Amp Parcial + linfadenectomia inguinal bilateral	4 meses		Positivo
24	60	Negro	BD	Negativo	pT2NxMx	Amp. Total	1 meses		Sem DNA
25	62	Branco	BD	Negativo	pT2N3Mx	Amp Parcial .+ linfadenectomia inguinal bilateral	24 meses		Positivo

### 3.2 Desenho do estudo

As amostras de plasma dos controles (36) e dos pacientes (25) foram aleatoriamente divididas em dois grupos. O primeiro grupo (dados de treinamento: 28 controles e 17 pacientes com câncer de pênis) foi utilizado para a identificação de peptídeos diferencialmente expressos em pacientes com câncer de pênis em comparação com os controles. O segundo grupo (dados de teste: 8 controles e 8 pacientes com câncer do pênis) foi utilizado para a validação preliminar do padrão encontrado no primeiro grupo a fim de verificar se este seria capaz de diferenciar amostras de pacientes e controles.

### 3.3 Purificação da Amostra e Análise Proteômica

Os peptídeos foram extraídos do plasma por esferas magnéticas ClintProt C8 de acordo com as instruções do fabricante. As esferas magnéticas são projetadas para a purificação e dessalinização de peptídeos e proteínas antes da análise pelo espectrômetro MALDI-TOF MS. As esferas possuem micropartículas magnéticas com uma superfície altamente porosa e revestimentos hidrofóbicos. Segundo o fabricante as esferas C8 são as mais indicadas na preparação de amostras de líquidos biológicos (soro, plasma, urina). O pré-fracionamento foi automatizado utilizando o robô da ClinProt (Bruker Daltonics, GmbH, Bremen, Alemanha), reduzindo assim a variabilidade (**Figura 11**). Este procedimento consiste obrigatoriamente de quatro etapas dentre elas:

1. Fase de ligação (*binding*): Alíquotas de plasma (40  $\mu$ L cada) foram misturadas com 5  $\mu$ L de esferas magnéticas e com 40  $\mu$ L de tampão do kit, permitindo que os peptídeos e as proteínas se ligassem à superfície hidrofóbica das micropartículas magnéticas C8.
2. Fase de lavagem (*washing*): O sobrenadante é removido após 1 min de incubação e as esferas foram lavadas duas vezes com 45  $\mu$ L e uma vez com 15  $\mu$ L de solução de lavagem recomendada pelo kit.
3. Fase de eluição (*elution*): Os peptídeos são então eluídos com 10  $\mu$ L de acetonitrila a 50%.
4. Fase de aplicação (*spotting*): Alíquotas de peptídeos eluídos (5  $\mu$ L) foram misturadas com 10  $\mu$ L de solução de matriz ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) (6,2 g / L HCCA em metanol / acetonitrila / água na concentração de



50%/40%/10%, respectivamente). Cerca de 1  $\mu$ L desta mistura foi aplicado quatro vezes em uma placa de MALDI-TOF (Bruker Daltonics, GmbH, Bremen, Alemanha) para posterior análise por espectrometria de massas.

Antes de se iniciar a análise por espectrometria de massa das amostras, foi realizada uma calibração externa do instrumento com misturas de proteínas/ peptídeos conhecidos de baixo peso molecular (intervalo de 1000-10000 Da) (ProtMix1). Após a calibração com o Protmix foi realizada aquisição das amostras depositadas sobre a placa alvo no espectômetro de massas. Os espectros foram adquiridos por um MALDI UltrafleXtreme TOF / TOF MS (Bruker Daltonics, GmbH, Bremen, Alemanha) (**figura 12**), operado em modo íon- positivo linear ou refletido, gravando valores de massa por carga ( $m / z$ ) de 1000-10000 Da. O espectro de cada amostra foi obtido através do bombardeamento de fótons (disparo) em diversos locais do poço no qual foi depositada a amostra. Os parâmetros de aquisição MALDI-TOF foram: total de 1200 disparos (200 x 6), laser com potência de cerca de 70% (modo linear) e 40% (modo refletido), movimento hexagonal do laser.

Figura 11: Robô da ClintProt

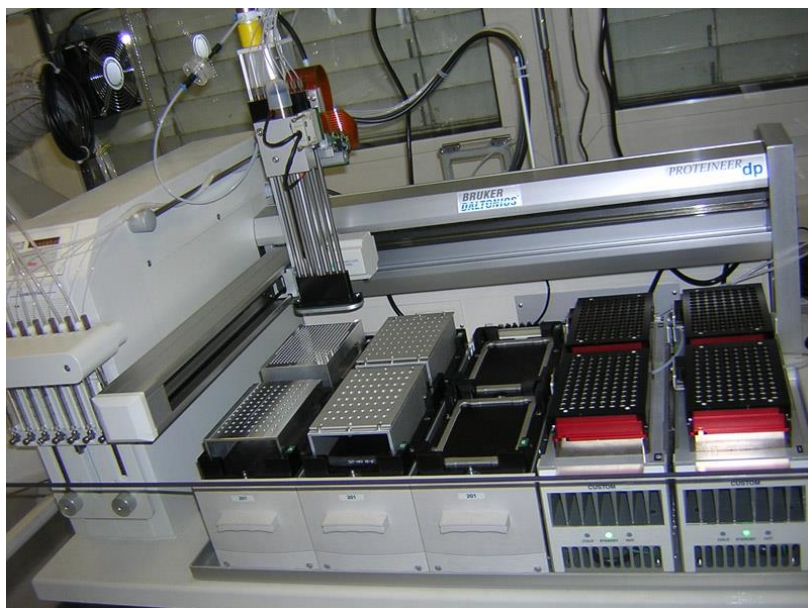


Figura 12: Espectrômetro de massas MALDI UltrafleXtreme TOF / TOF MS



### 3.4 Análise de dados

A análise dos dados foi realizada utilizando o programa ClinProtTools 2.1 (Bruker Daltonics, GmbH, Bremen, Alemanha). O ClinProTools foi usado para a comparação de múltiplos espectros e identificação de padrões de proteínas de acordo com os seguintes parâmetros: (i) normalização dos espectros de acordo com a corrente total do íon; (ii) recalibração dos espectros utilizando os picos proeminentes, (iii) subtração da linha de base e detecção do pico, e (iv) cálculo das áreas dos picos para cada espectro. Apenas um dos 8 espectros obtidos a partir do plasma de cada indivíduo pelo MALDI-TOF-TOF foi utilizado para análise estatística. Após o cálculo da média espectral do conjunto de dados de cada paciente, o programa seleciona o espectro que é mais semelhante à média para análise estatística subsequente. As análises estatísticas básicas, o algoritmo genético (AG) e o Support Vector Machine (SVM) foram então usadas para a seleção dos grupos de sinais que fossem capazes de diferenciar controles de pacientes com câncer de pênis. Estes sinais foram preliminarmente testados quanto à sua capacidade de diagnóstico utilizando os dois diferentes grupos (pacientes e controles) separadamente. A curva ROC (receiver operating characteristic curve) e a AUC (area under curve) foram calculadas pelo programa ClinProTools 2.1 para determinar a eficácia de diagnóstico de cada marcador (**Figura 13**). O valor de *cut-off* ( $P < 0,001$ ) que corresponde à maior precisão (a menor número de falsos negativos e falsos positivos) também foi calculado, juntamente com a especificidade e sensibilidade.

### 3.5 Identificação dos peptídeos pelo MALDI-TOF/TOF

Os peptídeos, presentes no plasma de pacientes e nos controles, foram identificados a partir das frações eluídas das esferas magnéticas C8. Para a identificação dos peptídeos, os espectros registrados foram gravados no UltrafleXtreme™ MS MALDI-TOF/TOF. As massas dos fragmentos foram analisadas após a sua detecção no refletor de íons. As análises foram realizadas usando os seguintes parâmetros de aquisição: fonte de íons 1, 7,5 kV; fonte de íons 2, 6,7 kV; lente 3,6 kV; refletor1, 29,5 kV; refletor 2, 13,95 kV; lift 1, 19 kV; lift 2, 3,15 kV; impulso de íons de extração 80 ns.

Os dados brutos do MS/MS foram processados com o programa FlexAnalysis™ 3.3 (Bruker Daltonics, Alemanha). A pesquisa de banco de dados foi realizada pelo Mascot (versão: 2.3.02) utilizando os seguintes parâmetros: Banco de dados SwissProt Humano (acessado em fevereiro 2012 - 20.317 seqüências), sem restrições enzimáticas, fixa e variável. As tolerâncias do MS e MS/MS foram geralmente fixadas em 1 Da. Apenas os espectros com uma pontuação superior ao limiar de identificação do Mascot foram aceitos.

#### 4 RESULTADOS

A maioria dos pacientes ( $n = 14$ ) foi estadiada como pT2, em relação aos restantes, 4 eram pT1, 6 pT3 e 1 pT4. Os achados patológicos dos pacientes com CEP estão na Tabela 1. A histopatologia confirmou CEP invasiva em todos os pacientes. Dos 25 casos, 8 (32%) eram bem diferenciados, 16 (64%) moderadamente diferenciados e 1 (4%) pouco diferenciado. A amputação e a linfadenectomia inguinal foram realizadas em 20 pacientes. Desses pacientes, 11 (55%) eram N0, 1 (5%) era N1, 4 (20%) eram N2 e 4 (20%) eram N3.

O ClintProt foi aplicado para analisar os peptídeos do plasma das amostras coletadas de pacientes com CEP. A comparação dos perfis espectrais obtidos a partir dos dados utilizados na fase de treinamento mostrou vários íons diferencialmente expressos nas duas populações estudadas (**Tabela 3**) e um grupo de dois sinais estatisticamente diferentes ( $P < 0,05$ ), com  $m/z$  de  $2021,99 \pm 9$  e com  $1897,22 \pm 9$ , foram identificados como capazes de diferenciar as duas populações.

A análise estatística preliminar foi realizada para cada marcador individualmente e para o conjunto de sinais pela curva ROC (**figura 13**) e um gel virtual proporcionava a visualização de diferença de intensidade de cada sinal (**figura 14**). A área sob a curva (AUC) do pico A com  $m/z$  de 1897,14 ( $p < 0,0001$ ) foi de 0,83, o que corresponde a um teste moderadamente preciso de acordo com os critérios sugeridos por Swets. A AUC do pico B com  $m/z$  de 2021,99 ( $p < 0,0001$ ) foi de 0,91, o que corresponde a um teste altamente preciso. Ambos os picos A e B, usados para o diagnóstico diferencial entre controles e pacientes, estavam sub-expressos ( $p < 0,05$ ) em pacientes em comparação com indivíduos saudáveis (**Figura 15**).

Figura 13: Curva ROC com área sob a curva (AUC) calculada

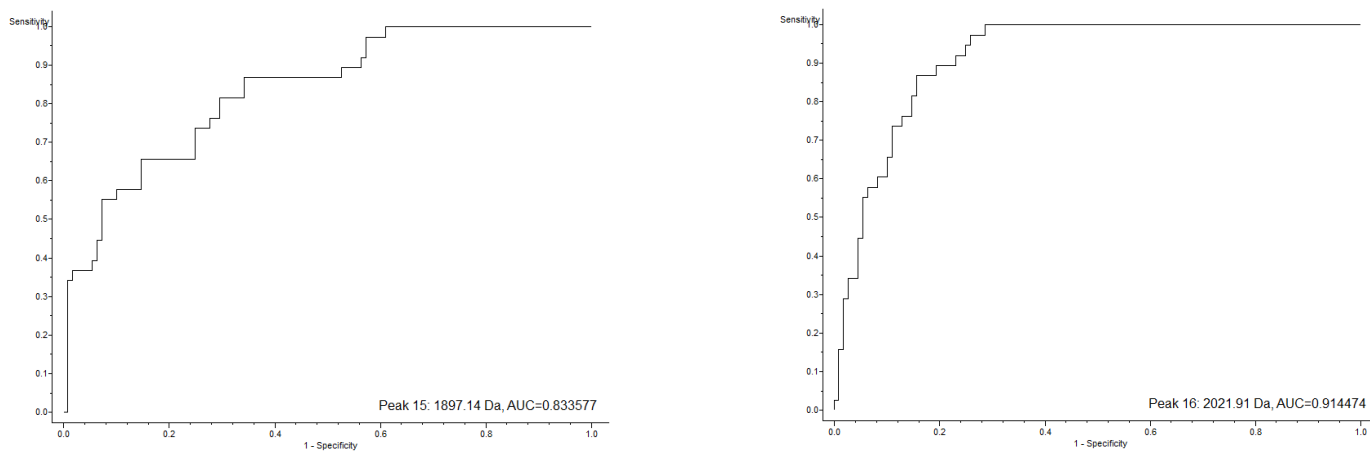


Figura 14: Gel virtual mostrando a diferença de intensidade entre o grupo controle e o grupo tumor

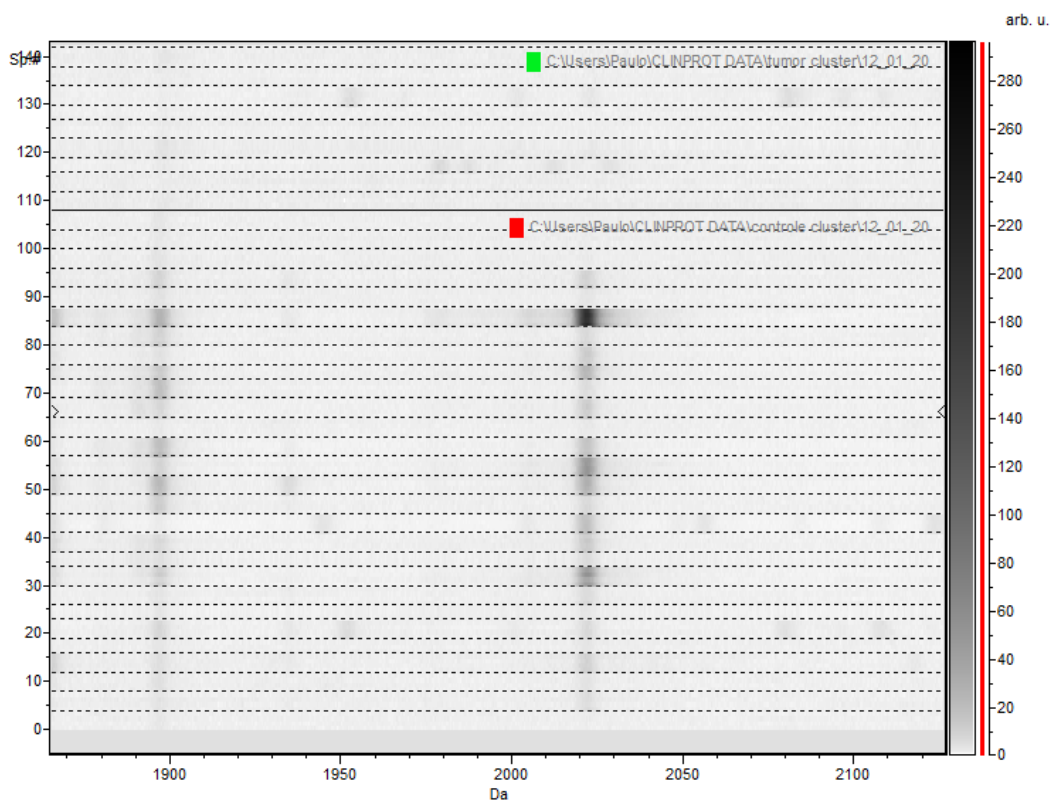


Tabela 3. Seleção dos picos diferentemente expressos na fase de treinamento (P<0.05) entre controles (n=28) e pacientes com carcinoma de pênis (n=17)

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

\* P valor pelo test t e ANOVA; valores menores que 0.05 indica significância estatística.

† P valor calculado pelo teste Wilcoxon/Kruskal–Wallis; valores menores que 0.05 indica significância estatística .

‡ Média das áreas dos picos das amostras controle .

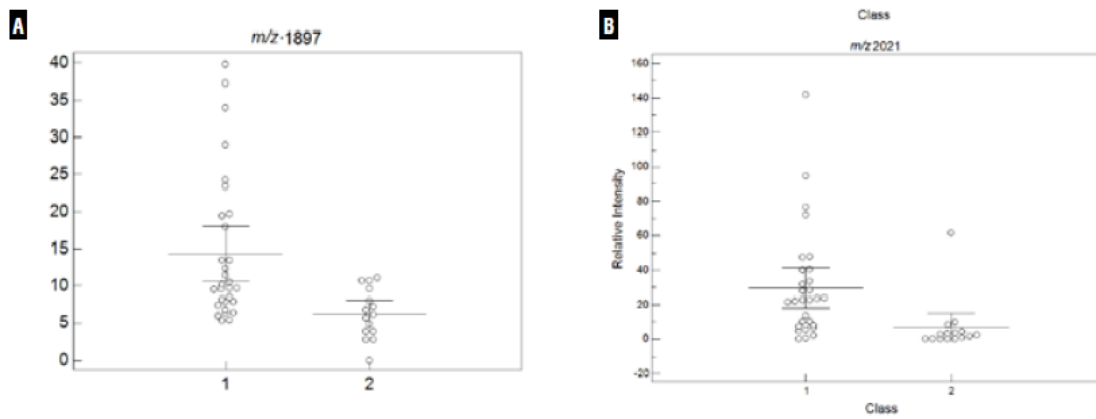
§ Média das áreas dos picos das amostras CEP.

¶ Desvio padrão dos picos das amostras controle.

|| Desvio padrão dos picos das amostras CEP

\*\* Os picos marcados representam os sinais escolhidos para elaboração do modelo diagnóstico.

Figura 15: Diferença de intensidade entre os 2 picos (1897 e 2021 m/z) entre grupos controle (class 1) e tumor (class2)





A combinação dos dois picos indicou uma melhoria do desempenho em comparação com os sinais individuais. Toda a casuística (25 pacientes com CEP e 36 controles) foi dividida em dois grupos sendo o primeiro representado por 17 pacientes com CEP e 28 controles (fase de treinamento) e segundo abrangendo 8 pacientes com CEP e 8 controles (fase teste). O primeiro grupo foi usado para a criação de um modelo diagnóstico (capaz de discriminar pacientes com CEP dos controles) e o segundo para realização de uma validação externa do modelo criado. Além disso, foi avaliada a capacidade de diagnóstico de subgrupos de pacientes com CEP (total 25) divididos de acordo com as mortes pela doença, presença de comprometimento de linfonodos e ausência de comprometimento linfonodal. A **tabela 4** resume os resultados obtidos referentes a sensibilidade e especificidade do modelo criado aplicado em cada grupo. É interessante notar que a medida que a doença se torna mais grave maior é a sensibilidade quando se compara com o grupo controle.

Alguns dos picos observados no perfil proteico do plasma puderam ser identificados pelo LIFT MS / MS (**Tabela 5**). Em particular, os picos m / z 1897,22 e o m / z 2021,99 foram identificados pelo MALDI-TOF / TOF como fragmentos de proteínas do sistema complemento, sendo eles C3 (m / z 1896,17) e C4a / b (m / z 2021,26) (**Tabela 5**).

Tabela4: . Avaliação dos grupos quanto a eficácia no diagnóstico em relação ao acometimento linfonodal

Grupo	Sensibilidade	Especificidade
6 Pacientes mortos pela doença	100%	97%
9 Pacientes linfonodos positive	80%	97%
11 Pacientes linfonodos negativos	54%	97%

Tabela 5: Peptídeos identificados na fração eluída do plasma de pacientes com CEP e controles pelo LIFT MS/MS.

Modo refletido m/z	Modo Linear m/z	Cálculo da massa (Da) em todas amostras de plasma pre-fracionadas	Seqüência dos peptídeos	UNIPROT	Descrição	Peptídeo escore
1896.17	1897.22	1895.024	NGFKSHALQLNNRQIR	CO4A_HUMAN  CO4B_HUMAN	Complemento C4-A OS=Homo sapiens GN=C4A PE=1 SV=1  Complemento C4-B OS=Homo sapiens GN=C4B PE=1 SV=1	61
2021.26	2021.99	2020.097	SSKITHRIHWESASLLR	CO3_HUMAN	Complemento C3 OS=Homo sapiens GN=C3 PE=1 SV=2	72

\*A tabela mostra os valores m/z observados no MALDI no modo linear e no modo refletido.

## 5 DISCUSSÃO

No Brasil, a incidência de câncer de pênis varia de acordo com a área de estudo, com uma maior incidência no Nordeste. Nesta região o CEP representa aproximadamente 5,7% das neoplasias malignas dos homens (BRUNINI, 1982). Koifman e colaboradores verificaram que em 230 pacientes operados em 3 hospitais do Rio de Janeiro 72,7% eram originários do Sudeste, sendo que 91,6% eram nascidos no Rio de Janeiro e apenas 19,5% no Nordeste. Este estudo revelou uma maior prevalência em pacientes brancos, casados, tabagistas, sem circuncisão, de religião católica e com idade igual ou superior a sessenta anos (KOIFMAN *et al.*, 2011). Um fato interessante neste estudo é a ocorrência da doença em um maior número de pacientes casados em comparação com os pacientes solteiros. Este achado pode ser uma coincidência, já que os únicos fatores relacionados à presença do câncer foram o nível socioeconômico baixo e a falta de higiene, condições presentes tanto no grupo de pacientes casados e solteiros. Outro estudo recente (FAVORITO *et al.*, 2008) mostrou que a prevalência de câncer de pênis no Sudeste e Nordeste, com taxas de 45,54% e 41,07%, respectivamente. Apesar da grande migração para o Sudeste, por ser a região econômica mais forte no país, neste estudo, a incidência da doença foi mais prevalente em pacientes nascidos no estado do Rio de Janeiro. Portanto, não se trata de um problema de saúde ocorrendo somente em regiões menos desenvolvidas do nosso país.

Apesar de adotarmos atualmente o sistema de classificação TNM 2002 para o estadiamento do CEP acreditamos assim como Horenblas e colaboradores (1994) que a versão do TNM de 1978, privilegiava mais o estadiamento clínico através da medição do tamanho do tumor e pela palpação dos linfonodos. Com o estadiamento atualmente utilizado (**Quadro 1**) não temos uma idéia definitiva do estágio do paciente antes de submetê-lo a cirurgia peniana e à linfadenectomia. Por se tratar de uma classificação essencialmente patológica, é praticamente impossível determinar clinicamente o nível exato de invasão pelo tumor primário e o real estado dos linfonodos inguinais.

Pacientes com carcinoma bem diferenciado têm uma melhor taxa de sobrevivência em 10 anos, do que aqueles com carcinoma moderadamente e pouco diferenciado ( $p < 0,0001$  e  $p = 0,006$ , respectivamente) (ORNELLAS 2008a). Vários estudos também têm enfatizado a associação entre a doença de alto grau e metástase nodal regional (THEODORESCU *et al.* 1996; RAVI 1993a; McDOUGAL 1995b; HEYNS 1997). SOLSONA e colaboradores (2001) mostraram que o risco de metástases linfonodais em pacientes com grau I de diferenciação foi de 15% versus 67% para aqueles com grau II e 75% para aqueles com grau III. Neste estudo,

por causa do pequeno número de pacientes com tumores classificados como grau III (apenas 7 casos), estes foram agrupados com os pacientes classificados como grau II. Gradação histológica foi uma variável significativa para o risco de metástase em análise univariada ( $p = 0,0112$ ), porém não na análise multivariável.

A presença de fimose e os efeitos irritativos do esmegma dentro do saco prepucial têm sido propostos como agentes etiológicos para o desenvolvimento do carcinoma peniano, embora o carcinógeno específico responsável pela degeneração maligna no esmegma humano ainda não tenha sido identificado (REDDY et al 1984). Na série de ORNELLAS e colaboradores (2008) 94% dos pacientes não eram circuncidados e os 40 pacientes circuncidados tinham sido submetidos a circuncisão após a puberdade. A circuncisão na idade adulta parece oferecer pouca ou menor proteção contra o desenvolvimento posterior da doença. No entanto, a circuncisão em neonatos parece ter um efeito mais protetor quando comparamos a pacientes que realizaram postectomia na idade adulta (LICKLIDER, 1961).

O estudo de LONT *et al* (2006) analisou o prognóstico nos casos de carcinomas de pênis infectados e não infectados por subtipos de HPV de alto risco. Verificou que o grupo de pacientes que era positivo para subtipos de HPV de alto risco apresentou sobrevida significativamente maior do que o grupo de pacientes não infectados, demonstrando deste modo que há 2 caminhos independentes de progressão tumoral nos carcinomas de pênis, sendo um está associado ao HPV e o outro não.

LI *et al.* (2011), no entanto, estudando tumores de colo de útero, observou que a carga viral do HPV (tipo 16) pode não ser um marcador ideal para prever a carcinogênese. Isto se deve a uma correlação entre a frequência de integração genômica do HPV (tipo 16) e a progressão neoplásica. A frequência de integração genômica pode ser um marcador potencial para o diagnóstico precoce para lesões do colo do útero em progressão.

Ainda não há na literatura uma explicação que elucide o papel do HPV na carcinogênese dos carcinomas de pênis. Entretanto, os genes E6 e E7 são os únicos genes do HPV expressos de forma consistente nas linhagens celulares derivadas de carcinoma de cérvix uterino. Estas proteínas cooperam para imortalizar os queratinócitos humanos *in vitro*. Entre os vários fatores celulares que os produtos destes genes interagem, destaca-se a capacidade da proteína E6 de unir-se à proteína supressora de tumor p53 e alterar sua capacidade funcional promovendo sua degradação pela via de proteólise dependente de ubiquitina. Além disso, a proteína E7 é capaz de unir-se e inativar a forma supressora de proliferação celular da proteína do retinoblastoma (pRB) (BOCARDO e VILLA, 2010).

Pacientes com CEP positivos para HPV costumam apresentar um resultado prognóstico variável. Em um estudo realizado por SCHEINER *et al.* (2008) estudando 80 pacientes com carcinoma de pênis submetidos à cirurgia no estado do Rio de Janeiro, observou-se a presença de HPV em 75% daqueles com carcinoma invasivo e em 50% daqueles com carcinoma verrucoso. O HPV tipo 16 foi o mais encontrado e não houve correlação entre a infecção pelo HPV e um determinado tipo histológico. Nesse estudo, a infecção por HPV não foi significativamente associada com a presença de metástase regional. Até o momento, a literatura mostra que o comprometimento da proteína supressora de tumor p53 possa ter relação com a sobrevida de pacientes em estágio T1 (LAN *et al.*, 1995; LEVI *et al.*, 1998, LOPES *et al.* 2002). Porém, mais estudos são necessários para se estabelecer a relação com o acometimento linfonodal.

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 entre 10,3% e 57% para os pacientes submetidos a esse procedimento como parte do tratamento do CEP (**Tabela 1**)

Cabanas tenta diminuir o número e a extensão das linfadenectomias utilizando para isto a biópsia do linfonodo sentinela (CABANAS, 1977). No entanto, outros autores apresentaram resultados menos satisfatórios com esta técnica, relatando o desenvolvimento de extensas metástases regionais depois de uma biópsia negativa para a malignidade (PERINETTI *et al.*, 1980; WESPES *et al.*, 1986). IZAWA e colaboradores (2005) revisaram os resultados com a biópsia tradicional dos linfonodos sentinelas nos pacientes sem linfonodos inguinais palpáveis. Quando a biópsia tradicional foi o procedimento de escolha encontraram uma taxa de recorrência de 16% (24/150) entre sete séries publicadas. Estender a área de dissecação não melhorou estes resultados (20% de recorrência, 5/25 pacientes).

A técnica de linfocintigrafia com injeção intradérmica peri-tumoral de technetium <sup>99m</sup>Tc foi recentemente alterada com intuito de melhorar sua sensibilidade, com a adição de exploração inguinal de rotina mesmo na ausência de detecção do radiofármaco. É realizada então uma palpação intra-operatória procurando por linfonodos anormais, e uma análise anátomo-patológica minuciosa dos linfonodos excisados como meio de reduzir o número de resultados falso-negativos. Estas manobras adicionais diminuíram a taxa de falso-negativo para 5%, mantendo um baixo risco de complicações (LEIJTE, 2007). No entanto devido a sua complexidade este procedimento não pode ser ainda utilizado rotineiramente nos nossos hospitais.

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, 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 estágio 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 deve 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, McDOUGAL, 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, 2005b). 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%. Diante desses fatos, a descoberta de marcadores que indiquem o comprometimento linfonodal é de suma importância.

A área da proteômica começou a revolucionar a medicina na era pós genoma. Esta abordagem promissora permitiu aos pesquisadores o estudo do papel das proteínas no organismo de indivíduos saudáveis e doentes. As proteínas presentes no plasma se originam de diversos tecidos e células sanguíneas. Os níveis de proteínas presentes no plasma refletem estados fisiológicos e patológicos do organismo podendo ser utilizados para o diagnóstico de doenças (ANDERSON, 2002). Amostras do plasma são obtidas na presença de um anticoagulante como o EDTA, citrato de sódio ou heparina e centrifugadas para remover as

células sanguíneas. Contudo, na ausência de um anticoagulante, o soro sanguíneo é obtido depois que o sangue coagula, e os elementos celulares são removidos. Uma grande dificuldade encontrada é a padronização das amostras e a escolha entre plasma ou soro, pois a composição desses é bastante diferente (LUNDBLAD, 2005). Além disso, o proteoma é muito complexo com diversas proteínas que podem estar glicosiladas ou ligadas a outras proteínas carreadoras. O desafio está na quantificação das proteínas de forma global. O proteoma sanguíneo é definido como o complemento mais completo expresso pelo sangue num dado momento. Este está em constante mudança e, modificações nas células em qualquer nível podem resultar em alterações na expressão das proteínas revelando uma fonte rica de potenciais biomarcadores celulares.

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. Apesar de outros tipos de amostras poderem ser obtidos (a saliva, lágrimas, urina, pele, cabelo, etc), cada um deles é um pequeno subconjunto do plasma ou uma amostragem local restrita da atividade celular (ANDERSON, 2002).

O plasma humano e soro representam um importante material biológico para o diagnóstico de determinada doença. No entanto, a concentração de proteínas continua a ser um grande desafio para o desenvolvimento de ensaios de diagnóstico. Quando a concentração de proteínas biomarcadoras é muito baixa na presença de proteínas de alta densidade, uma estratégia prática e eficaz é remover 99% das proteínas sem importância para o diagnóstico, a fim de melhorar a detecção destas proteínas de baixa abundância.

Descobertas inovadoras têm sido feitas na detecção de tumores em fase precoce. Estudos proteômicos de tumores como o de próstata, ovário, rim e bexiga são descritos na literatura. Até o momento, este é o primeiro estudo proteômico que aborda o carcinoma de pênis.

Existe um debate a respeito do papel do processo inflamatório na neoplasia. Tudo começou há mais de um século atrás, com as teorias concorrentes de RUDOLPH VIRCHOW e WILLIAM COLEY sobre se a inflamação promove ou prejudica o desenvolvimento de cancer (BALKWILL *et al.*, 2001; MARKIEWSKI *et al.*, 2009). A Medicina Clínica oferece retrato vívido da associação. Tecidos cronicamente expostos a toxinas tais como o tabaco, amianto, e o consumo de álcool geram um processo inflamatório que confere um risco maior de câncer brônquico, hepatocelular, gástrico e de pâncreas (LIN *et al.*, 2007). Processos de inflamatórios de doenças endógenas marcados por inflamação também podem predispor ao

desenvolvimento futuro de câncer. É o caso da associação entre o câncer de cólon e a doença inflamatória intestinal e o adenocarcinoma de esôfago e o esôfago de Barrett. Os pesquisadores postularam que a cronicidade da inflamação determina o seu efeito no câncer: processos inflamatórios agudos teoricamente combatem o desenvolvimento de células neoplásicas, ao passo que a inflamação crônica incentiva a sua gênese e propagação (LOVELAND *et al.*, 2008; OSTRAND-ROSENBERG *et al.*, 2008).

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 à infecção. Inúmeras proteínas do 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 mais poderosas no organismo, incluindo mais notavelmente as anafilatoxinas C3a e C5a. 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).

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. Observamos também que à medida que a doença progride mais subexpressos ficam os fragmentos C3, C4a/b. Além disso, foi encontrada uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 97% para a subexpressão desses fragmentos em pacientes com CEP que morreram pela doença. Pacientes com metástase linfonodal apresentaram também sensibilidade e especificidade de 80% e 97%, respectivamente, para a subexpressão desses fragmentos. Em pacientes sem acometimento linfonodal obtivemos uma sensibilidade de 57% e uma especificidade de 97%. A degradação do sistema complemento foi observada em pacientes com câncer de mama. No caso de C3, a degradação foi apenas nos fragmentos C3d, C3g, C3 $\alpha$ 1 e C3 $\beta$ . 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 $\beta$  (SHEN *et al.*, 2010).

A contribuição do sistema de complemento para o controle do crescimento do tumor tem sido negligenciada por um longo período de tempo, uma vez que a principal ênfase foi



colocada sobre a resposta imune mediada por células contra o câncer (MARCO *et al.*, 2007). O sistema imune inato é a primeira linha de defesa, composta de células e mecanismos de defesa do hospedeiro contra a infecção de uma forma não específica. Taneja *et. al.* (2011) estudaram o perfil de proteínas do plasma em pacientes com hepatite E. Neste estudo, os níveis das proteínas C3, C3F, C4 e bradicinina e quininogênio foram menores no plasma de pacientes com hepatite E em relação aos controles saudáveis. Qualquer agressão, tal como uma infecção viral no fígado, deveria desencadear uma resposta inata intensa como primeira linha de defesa do hospedeiro, mas o oposto foi encontrado. O mecanismo exato desta redução não é compreendido neste momento.

Em nossos pacientes, a subexpressão de C3 e C4 pode ser causado por HPV e / ou infecção por EBV, vírus que são altamente prevalentes nas lesões por CEP (AFONSO *et al.*, 2012). As proteínas virais de alguma forma neutralizariam o sistema imunitário (CAMPO *et al.*, 2010). Isto poderia explicar a progressão da doença, juntamente com a subexpressão de C3 e C4a / b, sendo uma hipótese a ser testada no futuro.

A superexpressão de proteínas reguladoras do sistema complemento (PRSC) em células tumorais é uma forma destas células se protegerem do ataque deste sistema de defesa. Acredita-se que CD46, CD55 e CD59 são as mais importantes proteínas de membrana reguladoras do sistema complemento (mCRPs), 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 (FH). É também interessante notar que FH é 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. Subsequentemente, foi descoberto que elas também eram capazes de matar células infectadas por certos vírus e atacar preferencialmente as células que não possuem expressão de antígenos 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 derivado do tumor (TDSFs), indução de elementos reguladores de várias linhagens de células e diferentes micro ambientes (BRONTE *et al.*, 2006). Em uma análise simplificada, ao mecanismo de evasão à atividade imune induzida pelo tumor resulta de duas atividades principais: i) da indução de tolerância do sistema imune aos antígenos 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 podem 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).

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, mediado 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, glomerulonefrite, a aterosclerose, a asma e a esclerose múltipla. Assim, é evidente que a patogênese mediada pelo sistema complemento é desencadeada principalmente pela imunidade disfuncional causada tanto pela ausência quanto pela hiperatividade de proteínas do complemento (MARKIEWSKI *et al.*, 2007).

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

- O estadiamento tumor de pênis é controverso devido à falta de métodos confiáveis de avaliação dos linfonodos inguinais sendo difícil a diferenciação entre linfadenomegalia inflamatória reacional e metastática. O exame físico não é um preditor confiável do comprometimento linfonodal pois pacientes com linfonodos palpáveis podem não apresentar metástases.

- Ficou demonstrado que à medida que a doença progride mais subexpressos estão os fragmentos C3 e C4 A/B do sistema complemento em comparação com indivíduos saudáveis.

- A validação cruzada, utilizando toda casuística apresentou 62,5% e 86,76% de sensibilidade e de especificidade, respectivamente, com uma alta sensibilidade (100%) e especificidade (97%) para os pacientes que morreram da doença.

- Pacientes com envolvimento ganglionar obtiveram uma sensibilidade e uma especificidade de 80 % e 97%, respectivamente. Estes resultados podem ser úteis como ferramentas para a avaliação do prognóstico destes pacientes.

## REFERÊNCIAS

- ABI-AAD, A.S.; deKERNION J.B. Controversies in ilioinguinal lymphadenectomy for cancer of the penis. *Urol Clin North Am.*, v. 19, p. 319-24, 1992.
- AFONSO, L.A.; MOYSES, N.; ALVES, G.; ORNELLAS, A.A.; PASSOS, M.R.; OLIVEIRA L.doH.; et al. Prevalence of human papillomavirus and Epstein-Barr virus DNA in penile cancer cases from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.107, p. 18-23, 2012.
- ALPANTAKI, K.; TSIRIDIS, E.; PAPE, H.C.; GIANNOUDIS, P.V. Application of clinical proteomics in diagnosis and management of trauma patients. *Injury*, v. 38, p. 263-71, 2007.
- ANDERSON, N.L. and ANDERSON, N.G. The human plasma proteome: History, character, and diagnostic prospects. *Molecular and Cellular Proteomics*, v. 1, n.11, p. 845-67, 2002.
- AYYAPPAN, K.; ANANTHAKRISHNAN, N.; SANKARAN, V. Can regional lymph node involvement be predicted in patients with carcinoma of the penis? *Br J Urol.*, v.73, p. 549–53, 1994.
- BANDOW, E. J. Comparison of protein enrichment strategies for proteome analysis of plasma. *Proteomics*, v. 10, p. 1416–1425, 2010.
- BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, v. 357, p. 539–45, 2001.
- BEHRENS, J; MARCEEL, M.M.; Van ROY, F.M., *et al*: Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss or uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J. Cell Biol.*, v. 108, p. 2435–47, 1989.
- BERDJIS, N.; MEYE, A.; NIPPGEN, J.; DITTERT, D.; HAKENBERG, O.; BARETTON, G.B.; WIRTH, M.P. Expression of Ki-67 in squamous cell carcinoma of the penis. *BJU Int.*, v. 96, n.1, p. 146-8, 2005.
- 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*. v. 167, p. 1638-42, 2002.
- BISCH, P.M. Genômica Funcional: Proteômica, capítulo 8 em: *Genômica*, Mir L.(Org.), Rio de Janeiro: Atheneu; ed. 1, p.139-62, 2004.
- 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.
- BLOK, V.T.; DAHA, M.R.; TIJSMA, O.M.; WEISSGLAS, M.G.; van den BROEK, L.J.; GORTER A: A possible role of CD46 for the protection in vivo of human renal tumor cells from complementmediated damage. *Lab Invest.*, v. 80, p. 335-44, 2000.

BOSCHETTI, E.; RIGHETTI, P.G. Hexapeptide combinatorial ligand libraries: the march of the detection of the lowabundance proteome continues. *BioTechniques*, v. 44, p. 663-5, 2008.

BRUNINI, R.; TORLONI, H.; HENSON, D.E.; GOTLIEB, S.L.D.; de SOUZA, J.M.P. Cancer in Brazil: Histopathological data, 1976-1980. Rio de Janeiro, Ministério da Saúde, 480 p, 1982.

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.*, v. 35, p. 327-57, 2006.

CABANAS, R.M. An approach for the treatment of penile carcinoma. *Cancer*, v. 39, p. 456-66, 1977.

CAMPO, M.S.; GRAHAM, S.V.; CORTESE, M.S.; ASHRAFI, G.H.; ARAIBI, E.H.; DORNAN, E.S. et al.: HPV-16 E5 down-regulates expression of surface HLA class I and reduces recognition by CD8 T cells. *Virology*, v. 407, p.137-42, 2010.

CAMPOS, M.M.; de SOUZA, M.H.; PIRES, V.; SCHEINER, M.A.; ESTEVES, E.B.; ORNELLAS, A.A. Clinical implications of natural killer cytotoxicity in patients with squamous cell carcinoma of the penis. *Nat Immun.*, v. 6, p. 256-62, 1998.

CAMPOS, R.S.; LOPES, A.; GUIMARÃES, G.C.; CARVALHO, A.L.; SOARES, F.A. E-cadherin, MMP-2, and MMP-9 as prognostic markers in penile cancer: analysis of 125 patients. *Urology*, v.67, n. 4, p. 797-802, 2006.

CAVALCANTI, S.M.B.; OLIVEIRA, L.H.S. Epidemiological aspects of human papillomavirus infection in the female genital tract. *Virus; Rev Res*, v.1, p. 42-7, 2003.

CHANG, J.T.; CHEN, L.C.; WEI, S.Y.; CHEN, Y.J.; WANG, H.M.; LIAO, C.T.; CHEN, I.H.; CHENG, A.J. Increase diagnostic efficacy by combined use of fingerprint markers in mass spectrometry--plasma peptidomes from nasopharyngeal cancer patients for example. *Clin Biochem.*, v. 39, n. 12, p. 1144-51, 2006.

CHECK, E. Proteomics and cancer: running before we can walk? *Nature*, v. 429, p. 496-7, 2004.

COBLENTZ, T.R.; THEODORESCU, D. Morbidity of modified prophylactic inguinal lymphadenectomy for squamous cell carcinoma of the penis. *J Urol.*, v. 168, p. 1386-9, 2002.

DONG, J.T.; LAMB, P.W.; RINKER-SCHAEFFER, C.W.; VUKANOVIC, J.; ICHIKAWA, T.; ISAACS, J.T.; BARRETT, J.C. KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. *Science*, v. 268, p. 884 -6, 1995.

CROMBACH, G.; SCHARL, A.; VIERBUCHEN, M. et al: Detection of squamous cell carcinoma antigen in normal squamous epithelia and in squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Cancer*, v. 63, p. 1337- 42, 1989.

DARAI, E.; KARAITIANOS, I.; DURAND, J.C. Treatment of inguinal lymph nodes in cancer of the penis. Apropos of 85 cases treated at the Institute Curie. *Ann Chir.*, v. 42, p. 748–52, 1988.

DIAMANDIS, E. P. Mass spectrometry as a diagnostic and a cancer biomarker discovery tool: opportunities and potential limitations. *Mol. Cell. Proteomics*, v. 3, p. 367–78, 2004.

DUNN, G.P.; BRUCE, A.T.; IKEDA, H.; OLD, L.J.; SCHREIBER, R.D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* v. 3, p. 991-8, 2002.

DURRANT, L.G.; CHAPMAN, M.A.; BUCKLEY, D.J.; SPENDLOVE, I.; ROBINS, R.A.; ARMITAGE, N.C. Enhanced expression of the complement regulatory protein CD55 predicts a poor prognosis in colorectal cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* V. 52, p. 638-42, 2003.

EGLEBAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, v. 2, p. 161–74, 2002.

FAVORITO, L.A.; NARDI, A.C.; RONALSA, M.; ZEQUI, S.C; SAMPAIO, F.J.; GLINA, S. Epidemiologic study on penile cancer in Brazil. *Int Braz J Urol.*, v. 34, n. 5, p. 587-91, 2008.

FEDARKO, N.S.; FOHR, B.; ROBEY, P.G.; YOUNG, M.F.; FISHER, L.W. Factor H binding to bone sialoprotein and osteopontin enables tumor cell evasion of complement-mediated attack. *J Biol Chem.*, v. 275, p. 16666-72, 2000.

GAO, J.P.; UCHIDA, T.; WANG, C. *et al.* Relationship between p53 gene mutation and protein expression: clinical significance in transitional cell carcinoma of the bladder *Int J Oncol*, v. 16, p. 469-75, 2000.

GUO, R.F.; WARD PA. Role of C5a in inflammatory responses. *Annu Rev Immunol.*, v. 23, p. 821–52, 2005.

GURSEL, E.O.; GEORGOUNTZOS, C.; USON, A.C.; MELICOW, M.M.; VEENEMA, R.J. Penile Cancer. *Urology*, v. 1, n. 6, p. 569-78, 1973.

GOMES, F.R. Marcadores tumorais (alcances e limites). *Acta Med Port.*v.10, n.1, p. 75-80, 1997

HAEDICKE J, IFTNER T. Human papillomaviruses and cancer. *Radiother Oncol.* 2013 Jul 3. doi:pii: S0167-8140(13)00279-X. 10.1016/j.radonc.2013.06.004. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23830197.

HANASH, S.; CELIS, J.E. The Human Proteome Organization: a mission to advance proteome knowledge. *Mol Cell Proteomics*, v. 1, p. 413–4, 2002.

HEYNS, C.F.; van VOLLENHOVEN, P.; STEENKAMP, J.W. *et al.*: Carcinoma of the penis—appraisal of a modified tumor-staging system. *Br J Urol.*, v. 80, p. 307-12, 1997.

HORENBLAS, S.; van TINTEREN, H.; DELEMARRE, J.F.M. et al. Squamous cell carcinoma of the penis, II: treatment of the primary tumor. *J Urol.*, v. 147, p. 1533-38, 1992.

HORENBLAS, S.; van TINTEREN, H. Squamous cell carcinoma of the penis. IV. Prognostic factors of survival: analysis of tumor, nodes and metastasis classification system. *J Urol.*, v. 151, n. 5, p. 1239-43, 1994.

HUNGERHUBER, E.; SCHLENKER, B.; SCHNEEDE, P.; STIEF, C.G.; KARL A. Squamous Cell Carcinoma Antigen Correlates with Tumor Burden but Lacks Prognostic Potential for Occult Lymph Node Metastases in Penile Cancer. *Urology* v. 70, p. 975-9, 2007.

INADA, S.; KOTO, T.; FUTAMI, K. et al: Evaluation of malignancy and the prognosis of esophageal cancer based on an immunohistochemical study (p53, E-cadherin, epidermal growth factor receptor). *Surg Today*, v. 29, p. 493-503, 1999.

JOHNSON, D.E.; LO, R.K. Complications of groin dissection in penile cancer. Experience with 101 lymphadenectomies. *Urology*, v. 24, p. 312-4, 1984.

KAMAT, M.R.; KULKARNI, J.N.; TONGAONKAR, H.B. Carcinoma of the penis: the Indian experience. *J Surg Oncol.*, v. 52, p. 50-55, 1993.

KATO, H.; TORIGOE, T. Radioimmunoassay for tumor antigen of human cervical squamous cell carcinoma. *Cancer*, v. 40, p. 1621-8, 1977.

KOHL, J. Anaphylatoxins and infectious and non-infectious inflammatory diseases. *Mol Immunol.* v. 38, p. 175-87, 2001.

KOIFMAN, L.; VIDES, A.J.; KOIFMAN, N.; CARVALHO, J.P.; ORNELLAS AA. Epidemiological Aspects of Penile Cancer in Rio de Janeiro: Evaluation of 230 Cases. *International Braz J Urol*, v. 37, n. 2, p. 231-43, 2011.

KOIFMAN, L.; HAMPL, D.; KOIFMAN, N.; VIDES, A. J.; ORNELLAS, A.A. Radical Open Inguinal Lymphadenectomy for Penile Carcinoma: Surgical Technique, Early Complications, and Late Outcomes Evaluation of 340 Procedures. *J Urol* 0022-5347  
doi.org/10.1016/j.juro.2013.06.016

KROON, B.K.; LONT, A.P.; VALDES OLMOS, R.A.; NIEWEG, O.E.; HORENBLAS S. Morbidity of dynamic sentinel node biopsy in penile carcinoma. *J Urol.* v. 173, p. 813-5, 2005.

KROON, B.K.; HORENBLAS, S.; LONT, A.P.; TANIS, P.J.; GALLEE, M.P.; NIEWEG, O.E. Patients with penile carcinoma benefit from immediate resection of clinically occult lymph node metastases. *J Urol.*, v. 173, p. 816-9, 2005.

KROON, B.K.; HORENBLAS, S.; MEINHARDT, W.; van der POEL, H.G.; BEX, A.; van TINTEREN, H.; VALDES OLMOS, R.A.; NIEWEG, O.E. Dynamic sentinel node biopsy in penile carcinoma: evaluation of 10 years experience. *Eur Urol.*, v. 47, p. 601-6, 2005.

LAM, K.Y.; CHAN, A.C.; CHAN, K.W. et al. Expression of p53 and its relationship with human papillomavirus in penile carcinomas *Eur J Oncol*, v. 21, n. 6, p. 613-6, 1995.

LEIJTE, J.A.; KROON, B.K.; VALDÉS OLMOS, R.A.; NIEWEG, O.E.; HORENBLAS, S. Reliability and safety of current dynamic sentinel node biopsy for penile carcinoma. *Eur Urol.*, v. 52, n. 1, p. 170-7, 2007.

LEVI, J.E.; RAHAL, P.; SARKIS A.S. et al. Human papillomavirus DNA and p53 status in penile carcinomas *Int J Cancer*, v. 76, p. 779, 1998.

LI, Y.; XIANG, Y.; ZHANQ, R.F.; CAI, Y.P.; CHENQ, X.M.; ZHU, B.L. Viral load, genomic integration frequency of human papilomavirus 16 in cervical cancer and precancerous lesions. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, v. 91, n. 13, p. 906-10, 2011.

LI, J.; ZHANG, Z.; ROSENZWEIG, J.; WANG, Y.Y.; CHAN, D.W. Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. *Clin Chem*, v. 48, p. 1296–304, 2002.

LICKLIDER, S. Jewish penile carcinoma. *J Urol.*, v. 86, p. 98, 1961.

Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest* 2007;117:1175–83

LONT, A.P.; KROON, B.K.; HORENBLAS, S.; GALLEE, M.P.; BERKHOF, J.; MEIJER, C.J.; SNIJDERS, P.J. Presence of high-risk human papillomavirus DNA in penile carcinoma predicts favorable outcome in survival. *Int J Cancer*. v. 119, n. 5, p. 1078-81, 2006.

LOPES, A.; HIDALGO, G.S.; KOWALSKI, L.P.; TORLANI, H.; ROSSI, B.M.; FONSECA, F.P. Prognostic factors in carcinoma of the penis: multivariate analysis of 145 patients treated with amputation and lymphadenectomy. *J Urol.*, v. 156, p. 1637–42, 1996.

LOPES, A.; BEZERRA, A.L.; PINTO, C.A.; SERRANO, S.V.; DE MELLO, C.A.; VILLA, L.L. 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*. v. 168, p. 81-6, 2002.

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

LUNDBLAD, R.L. Considerations for the Use of Blood Plasma and Serum for Proteomic Analysis. *The Internet Journal of Genomics and Proteomics*. vol. 1, n. 2. 2005. DOI: 10.5580/26e

MAICHE, A.G.; PYRHÖNEN, S.; KARKINEN, M. Histological grading of squamous cell carcinoma of the penis: a new scoring system. *Br.J.Urol.*, v. 67, p. 522-6, 1991.

MAGNI, F.; VAN DER BURGT, Y.E.; CHINELLO, C.; MAININI, V.; GIANAZZA, E.; SQUEO, V.; DEELDER, A.M.; KIENLE, M.G. *Blood Transfus*. vol. 8, suppl. 3, p. s92-7, 2010. doi: 10.2450/2010.015S

MARKIEWSKI, M.M.; LAMBRIS, J.D. The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. *Am J Pathol.*, vol. 171, p. 715–27, 2007.



MARKIEWSKI, M.M.; DEANGELIS, R.A.; BENENCIA, F; et al. Modulation of the antitumor immune response by complement. *Nat Immunol.*, vol. 9, p. 1225–35, 2008.

MARKIEWSKI, M.M.; LAMBRIS, J.D. Is complement good or bad for cancer patients? A new perspective on an old dilemma. *Trends Immunol.*, vol. 30, p. 286–92, 2009.

MARTINS, A.C.; FARIA, S.M.; COLOGNA, A.J.; SUAID, H.J.; TUCCI, S. JR. Immunoexpression of p53 protein and proliferating cell nuclear antigen in penile carcinoma. *J Urol.* vol. 167, n. 1, p. 89-92, discussion 92-3, 2002.

MCCANCE, D.J; KALACHE, A.; ASHDOWN, K.; ANDRADE. L.; MENEZES, F.; SMITH, P. Human papillomavirus types 16 and 18 in carcinomas of the penis from Brazil. *Int J Cancer*, vol. 37, p. 55-9, 1986.

MCDUGAL, W.S.; KIRCHNER, F.K. Jr.; EDWARDS, R.H.; KILLION, L.T. Treatment of carcinoma of the penis in a case of primary lymphadenectomy. *J Urol.*, vol. 136, p. 38-41, 1986.

MCDUGAL, W.S. Carcinoma of the penis: Improved survival by early regional lymphadenectomy based on the histological grade and depth of invasion of the primary lesion. *J Urol.*, vol. 154, p. 1364-6, 1995

NELSON, B.A.; COOKSON, M.S.; SMITH, J.A. Jr.; CHANG, S.S. Complications of inguinal and pelvic lymphadenectomy for squamous cell carcinoma of the penis: a contemporary series. *J Urol.*, vol. 172, p. 494-7, 2004.

ORNELLAS, A.A.; SEIXAS, A.L.; de MORAES, J.R. Analyses of 200 lymphadenectomies in patients with penile carcinoma. *J. Urol.*, vol. 146, p. 330-2, 1991.

ORNELLAS, A.A.: Câncer de pênis, incidência e avaliação das diversas formas de tratamento: estudo retrospectivo com 455 pacientes no Instituto Nacional de Câncer. Tesis, São Paulo, Brazil, Universidade de São Paulo, 1993, 160 p.

ORNELLAS, A.A.; SEIXAS, A.L.; MAROTA, A.; WISNESCKY, A.; CAMPOS, F.; de MORAES J.R. Surgical treatment of invasive squamous cell carcinoma of the penis. Retrospective analysis of 350 cases. *J.Urol.*, vol. 155, p. 1244-9, 1994.

ORNELLAS, A.A.; NÓBREGA, B.L.; WEI KIN CHIN, E.; WISNESCKY, A.; da SILVA, P.C.; de SANTOS SCHWINDT, A.B. Prognostic factors in invasive squamous cell carcinoma of the penis: analysis of 196 patients treated at the Brazilian National Cancer Institute. *J Urol.*, vol. 180, p. 1354-9, 2008a.

ORNELLAS, A.A.; KINCHIN, E.W.; NÓBREGA, B.L.; WISNESCKY, A.; KOIFMAN, N.; QUIRINO, R. Surgical treatment of invasive squamous cell carcinoma of the penis: Brazilian National Cancer Institute long-term experience. *J Surg Oncol.*, vol. 97, p. 487-95, 2008b.

OSTRAND-ROSENBERG, S. Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. *Curr Opin Genet Dev.*, vol. 18, p. 11–8, 2008.

PETRICOIN, E. F.; ARDEKANI, A. M.; HITT, B. A.; LEVINE, P. J.; et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet*, vol. 359, p. 572–7, 2002.

PEREIRA, C.R.N.; ROSA, M.L.G.; VASCONCELOS, GALB; FARIA, P.C.P.; CAVALCANTI, S.M.B.; OLIVEIRA, L.H. Human papillomavirus prevalence and predictors for cervical cancer among high risk women from Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Gynecol Cancer*, vol. 17, p. 651-60, 2007.

PERINETTI, E.; CRANE, D.B.; CATALONA, W.J. Unreliability of sentinel lymph node biopsy for staging penile carcinoma. *J Urol.*, vol. 124, n. 5, p. 734-5, 1980.

PROTZEL, C.; KAKIES, C.; KLEIST, B.; POETSCH, M.; GIEBEL, J. Down-regulation of the metastasis suppressor protein KAI1/CD82 correlates with occurrence of metastasis, prognosis and presence of HPV DNA in human penile squamous cell carcinoma. *Virchows Arch.* vol. 452, n. 4, p. 369-75, 2008. doi: 10.1007/s00428-008-0590-0.

PUTNAM, F. W. (1975–1987) in *The Plasma Proteins Structure, Function, and Genetic Control* (Putnam, F. W., ed) pp. 1–55, Academic Press, New York

RICKLIN D, LAMBRIS JD. Complement-targeted therapeutics. *Nat Biotechnol.*, vol. 25, p. 1265–75, 2007.

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.*, vol. 72, p. 817-9, 1993a.

RAVI, R. Morbidity following groin dissection for penile carcinoma. *Br J Urol.*, vol. 72, p. 941-5, 1993.

REIS, F.J.C. Rastreamento e diagnóstico das neoplasias de ovário: papel dos marcadores tumorais. *Rev Bras Ginecol Obstet.*, vol. 27, n. 4, p. 222-7, 2005.

REDDY, C.R.R.M.; DEVENDRANATH, V.; PRATAP S. Carcinoma of penis—Role of phimosis. *Urology*, vol. 24, p. 85–8, 1984.

RODRIGO, J.P.; DOMINGUEZ, F.; ALVAREZ, C.; et al: Expression of E-cadherin in squamous cell carcinomas of the supraglottic larynx with correlations to clinicopathological features. *Eur J Cancer*, vol. 38, p. 1059–64, 2002.

ROSA, G.D.; BARCELLOS, G.B.; CARVALHAL, G.F.; DORNELLES NETO, E.J. Marcadores tumorais em urologia. *Acta Médica (Porto Alegre)* vol. 26, p. 155-65, 2005.

RUTKOWSKI, M. J.; SUGHRUE, M.E.; KANE, A.J.; et al. Cancer and the Complement Cascade. *Mol Cancer Res.*, vol. 8, p. 1453-65, 2010.

SCHEINER, A.M.; CAMPOS, M.M.; ORNELLAS, A. A.; CHIN, E. W.; ORNELLAS, M.H.; ANDRADA-SERPA, M.J. Human Papillomavirus and Penile Cancers in Rio de

- Janeiro, Brazil: HPV Typing and Clinical Features. *Int.Braz.J.Urol.*, vol. 34, n. 4, p. 467-76, 2008.
- SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein. from the known and the unknown. *J Cell Pathol.*, vol. 182, p. 311–22, 2000.
- SHEN, Y.; TOLIĆ, N.; LIU, T.; ZHAO, R.; PETRITIS, B.O.; GRITSENKO, M.A.; et al.: Blood peptidome-degradome profile of breast cancer. *PLoS One.* vol. 5, n. 10, 2010, e13133. doi: 10.1371/journal.pone.0013133.
- SILVEIRA, A.S. Câncer ginecológico: Diagnóstico e tratamento. In: Gil R.A. Fatores prognósticos, preditivos e marcadores tumorais no câncer ginecológico. Florianópolis: UFSC; 2005:135-52.
- SMYTH, M.J.; DUNN, G.P.; SCHREIBER, R.D. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol.* Vol. 90, p. 1-50, 2006.
- SOLSONA, E.; IBORRA, I.; RUBIO J.; et al. Prospective validation of the association of local tumor stage and grades as a predictive factor for occult lymph node micrometastasis in patients with penile carcinoma and clinically negative inguinal nodes, *J Urol.*, vol. 165, p. 1506-9, 2001.
- SPIESS, P.E.; HERNANDEZ, M.S.; PETTAWAY, C.A. Contemporary inguinal lymph node dissection: minimizing complications. *World J Urol.*, vol. 27, p. 205-12, 2009.
- SORIA, J.C.; 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.*, vol. 8, p. 1089-98, 1997.
- STATES, D. J.; et al. Challenges in deriving high-confidence protein identifications from data gathered by a HUPO plasma proteome collaborative study. *Nature Biotechnol.*, vol. 24, p. 333–8, 2006.
- STAUBITZ, W.J.; MELBOURNE, H.L.; OBERKIRCHER, O.J. Carcinoma of the penis. *Cancer*, vol. 8, p. 371-8, 1955.
- 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
- SWETS JA: Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science*. 1988; 240: 1285-93
- TAYLOR, C.F.; HERMJAKOB, H.; JULIAN, R.K. Jr.; GARAVELLI, J.S.; AEBERSOLD, R.; APWEILER, R. The work of the Human Proteome Organization's Proteomics Standards Initiative (HUPO PSI). *Proteomics*, vol.10 n. 2, p. 145-51, 2006.
- TAKAHASHI, Y.; HORIE, M.; ISOGAI, K.; et al: Clinical study of serum squamous cell carcinoma-related antigen levels in penile cancer. *Hinyokika Kyo*, vol. 33, p. 396-9, 1987.

- 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.
- TJALSMA, H.; BOLHUIS, A.; JONGBLOED, J. D. H.; BRON, S.; VAN DIJL, J. M. Signal Peptide-Dependent Protein Transport in *Bacillus subtilis*: A Genome-Based Survey of the Secretome". *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 64, n. 3, p.515–47, 2000. doi:10.1128/MMBR.64.3.515-547.2000.
- THEODORESCU, D.; RUSSO, P.; ZHANG, Z-F.; MORASH, C.; FAIR, W.R. Outcomes of initial surveillance of invasive squamous cell carcinoma of the penis and negative nodes. *J Urol*, vol. 155, p. 1626–31, 1996.
- UMBAS, R.; SCHALKEN, J.A.; ALDERS, T.W.; et al: Expression of the cellular adhesion molecule E-cadherin is reduced or absent in high-grade prostate cancer. *Cancer Res.* vol. 52, p. 5104–9, 1992.
- VILLANUEVA, J.; PHILIP, J.; ENTENBERG, D.; CHAPARRO, C. A.; et al.,*Anal. Chem.*, vol.76, p. 1560–70, 2004.
- WASINGER, V.C.; CORDWELL, S.J.; CERPA-POLJAK, A.; YAN, J.X.; GOOLEY A.A.; WILKINS, M.R.; DUNCAN, M.W.; HARRIS, R.; WILLIAMS, K.L.; HUMPHERY-SMITH, I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*, vol. 16, n. 7, p. 1090-4, 1995.
- WESPES, E.; SIMON, J.; SCHULMAN, C.C. Cabanas approach: is sentinel node biopsy reliable for staging penile carcinoma? *Urology.*, vol. 28, n. 4, p. 278-9, 1986.
- WISHNOW K.I.; JOHNSON, D.E.; FRITSCH, H. Squamous cell carcinoma antigen (TA-4) in penile carcinoma. *Urology*, vol. 36, p. 315–7, 1990.
- ZITVOGEL, L.; TESNIERE, A.; KROEMER, G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol.*, vol. 6, p. 715-27, 2006.
- ZHU, Y.; ZHOU, X.Y.; YAO, X.D.; DAI, B.; YE, D.W. The prognostic significance of p53, Ki-67, epithelial cadherin and matrix metalloproteinase-9 in penile squamous cell carcinoma treated with surgery. *BJU Int.*, vol.100, n. 1, p. 204-8, 2007.

**APÊNDICE** - Artigo científico publicado: Downregulation of C3 and C4A/B Complement factor fragments in plasma from patients with squamous cell carcinoma of the penis



ORIGINAL ARTICLE

Vol. 38 (6): 1-11, November - December, 2012

## 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 Gazzaniga, 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 of lymph node 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 koilocytosis 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,  $\alpha$ -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  $\mu$ L each) were mixed with 5  $\mu$ L of magnetic beads and 40  $\mu$ L 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  $\mu$ L and once with 15  $\mu$ L of the recommend washing solution. Peptides were then eluted with 10  $\mu$ L 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  $\mu$ L) were mixed with 10  $\mu$ L of HCCA matrix solution (6.2 g/L HCCA in methanol/acetonitrile/water 50/40/10). About 1  $\mu$ L 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 limphadenectomy	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 limphadenectomy	5
17	80	white	MD	positive	pT4NxMx	Emasculation	8
18	90	white	PD****	negative	pT1NxMx	Partial amputation.	1
19	83	white	WD	negative	pT2N3Mx	Partial amputation + bilateral inguinal limphadenectomy	8
20	55	mulatto	MD	negative	pT3N2Mx	Emasculation + bilateral inguinal limphadenectomy	4
21	61	mulatto	MD	negative	pT2N0Mx	Total amputation + bilateral inguinal limphadenectomy	9
22	71	white	MD	positive	pT2N0Mx	Partial amputation + bilateral inguinal limphadenectomy	1
23	56	mulatto	WD	negative	pT2N0Mx	Partial amputation + bilateral inguinal limphadenectomy	4
24	60	black	WD	negative	pT2NxMx	Total amputation.	1
25	62	white	WD	negative	pT2N3Mx	Partial amputation + bilateral inguinal limphadenectomy	24

\* 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 UltrafleXtreme™ 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 FlexAnalysis™ 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 NO, 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  $m/z$   $2021.99 \pm 9$ ,  $1897.22 \pm 9$ , 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

## IBJU I DOWNREGULATION OF C3 AND C4A/B COMPLEMENT FACTOR FRAGMENTS

**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 D2I
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.

I 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).

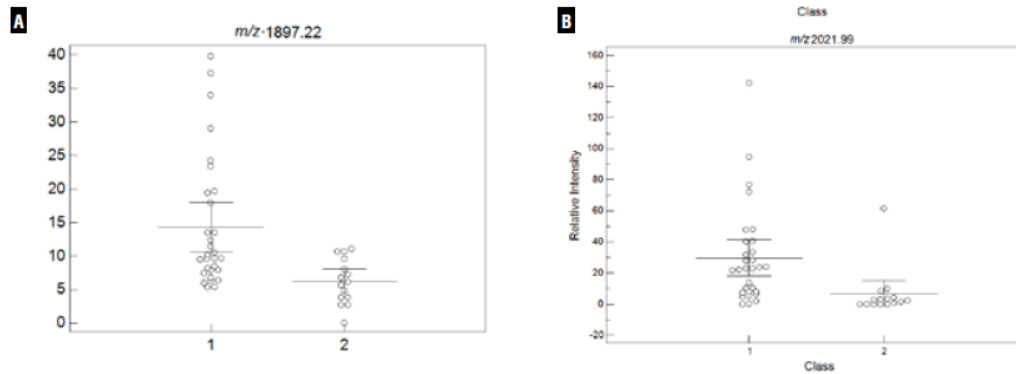


Table 4 - Identified peptides in the C8 MB eluted fraction of patients' and control subjects' plasma by LIFT MS/MS. All peptide identification scores were above Mascot identity threshold. Table reports the m/z values of the ions observed in MALDI linear and reflectron mode.

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 $\alpha$ '1 and C3 $\beta$ . 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 $\beta$ . 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 supported

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

## CONFLICT OF INTEREST

None declared.

## REFERENCES

- Misra S, Chaturvedi A, Misra NC: Penile carcinoma: a challenge for the developing world. *Lancet Oncol.* 2004; 5: 240-7.
- Ornellas AA, Kinchin EW, Nóbrega BL, Wisnescky A, Koifman N, Quirino R: Surgical treatment of invasive squamous cell carcinoma of the penis: Brazilian National Cancer Institute long-term experience. *J Surg Oncol.* 2008; 97: 487-95.
- 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.
- 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.
- 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.
- Ornellas AA, Nóbrega BL, Wei Kin Chin E, Wisnescky A, da Silva PC, de Santos Schwindt AB: Prognostic factors in invasive squamous cell carcinoma of the penis: analysis of 196 patients treated at the Brazilian National Cancer Institute. *J Urol.* 2008; 180: 1354-9.
- Abi-Aad AS, deKernion JB: Controversies in ilioinguinal lymphadenectomy for cancer of the penis. *Urol Clin North Am.* 1992; 19: 319-24.
- Alpantaki K, Tsiridis E, Pape HC, Giannoudis PV: Application of clinical proteomics in diagnosis and management of trauma patients. *Injury.* 2007; 38: 263-71.
- Rempelakos A, Bastas E, Lymperakis CH, Thanos A: Carcinoma of the penis: experience from 360 cases. *J BUON.* 2004; 9: 51-5.
- Theodoreescu 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.
- 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, Gnaou 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 fingerprint 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, 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.
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, Tolic 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, Robins 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 Immunol.* 1998; 16: 256-62.
33. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD: Cancer immunoeediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* 2002; 3: 991-8.
34. Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD: Cancer immunosurveillance and immunoeediting: 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

## ANEXO A – Parecer do comitê de ética em pesquisa



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

## PARECER Nº 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 Pâncreas". Termo de Consentimento de 08/11/05.  
**Pesquisador Responsável:** Drª. Gilda Alves Brown.  
**Instituição:** Instituto Nacional do Câncer- Rio de Janeiro/ RJ. (centro único)  
**Área Temática Especial:** Genética 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

  
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,

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

c/c – Dra. Marisa Breitenbach  
Coordenadora da CPQ

## ANEXO B – Modelos dos termos de consentimento livre e esclarecido



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO AMOSTRA DE TECIDO NORMAL DE PELE PÊNIS PROJETO SECRETOMA DE CÂNCER DE RIM E DE PÊNIS

Nome do Voluntário: \_\_\_\_\_

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 além da cirurgia a qual você já iria ser submetido.

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

#### OBJETIVO DO ESTUDO

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.

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

#### PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

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.

#### RISCOS

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.

  
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

### 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 Schellga  
 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.

  
 Dra. Adriana Scheliga  
 Coordenadora





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