

**ANÁLISE *IN SITU* DE PROTEÍNAS  
DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS EM CARCINOMAS  
EPIDERMÓIDES PENIANOS POR ESPECTROMETRIA  
DE MASSAS UTILIZANDO *MATRIX-ASSISTED LASER  
DESORPTION/IONIZATION (MALDI)***

**ELISÂNGELA DE JESUS SILVA**

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

**Área de concentração: Oncologia**

**Orientador: Dr. José Vassallo**

**Co-Orientadores: Dra. Adriana Bulgarelli**

**Dr. Nilson Antônio Assunção**

**São Paulo**

**2016**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Silva, Elisângela de Jesus

**Análise *in situ* de proteínas diferencialmente expressas em carcinomas epidermóides penianos por espectrometria de massas utilizando Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) /**

Elisângela de Jesus Silva – São Paulo, 2016.

129p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Oncologia.

Orientador: José Vassallo

Descritores: 1. CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS.  
2. NEOPLASIAS PENIANAS. 3. ESPECTROMETRIA DE MASSAS  
POR IONIZAÇÃO E DESSORÇÃO A LASER ASSISTIDA POR MATRIZ

“O otimista é um tolo. O pessimista, um chato. Bom mesmo é ser um realista  
esperançoso”.

**Ariano Suassuna**

## **DEDICATÓRIA**

À minha terra das tabocas e aos meus amores pernambucanos. Especialmente o meu noivo Erick, que se fez presente, mesmo estando a léguas de distância.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Dr. José Vassallo, por sua visão translacional, que em muito contribuiu para a realização deste projeto.

Aos meus co-orientadores, Dra. Adriana Bulgarelli pelo auxílio nas etapas de genotipagem do HPV e eletroforese bidimensional, e o Dr. Nilson Antônio Assunção pelo suporte nas análises de espectrometria de massas.

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, chefe do Depto de Anatomia Patológica e precursor da linha de pesquisa em tumores penianos da instituição, pela oportunidade de desenvolver este estudo.

Ao Dr. Stênio C. Zequi por sua capacidade de articulação na busca de colaborações nas diversas regiões do país, e por sua importante contribuição na banca de qualificação.

Ao Dr. Gustavo Guimarães, chefe do Núcleo de Urologia da instituição, e à Thais Safranov, enfermeira de pesquisa, ambos contribuíram significativamente para construção do banco de dados clínicos dos casos de tumores penianos.

À Dra. Cláudia M. Coutinho-Camillo pela presença amiga e valiosos conselhos científicos.

À MSc. Kátia Klug pelo suporte técnico e, sobretudo, por sua amizade fraternal, que foi meu principal alento neste período de distanciamento familiar.

Ao Dr. Fábio Marchi pela assistência nas análises de bioinformática.

Ao Dr. Vinícius Calsavara pelo suporte no processamento estatístico.

A todos os colegas do grupo de pesquisa da Patologia Investigativa (CIPE) e Radicais Livres em Sistemas Biológicos (UNIFESP) pelos inúmeros pequenos favores.

Ao A.C.Camargo Cancer Center pela infra-estrutura e recursos humanos disponibilizados ao longo do desenvolvimento do projeto, principalmente o Centro Internacional de Pesquisa e Ensino (CIPE), coordenação da pós-graduação e biblioteca.

Às instituições parceiras que viabilizaram a coleta e envio de amostras biológicas congeladas. Entre elas, ênfase a participação da Ass. Piauiense de Combate ao Câncer – Teresina (PI); Hosp. do Câncer do Mato Grosso – Cuiabá (MT); Hosp. Universitário. Onofre Lopes – Natal (RN); PUCCAMP – Campinas (SP); Hosp. Anchieta – Santo André (SP); Hosp. Araújo Jorge – Goiânia (GO); Hosp. Universitário Pedro Ernesto – Rio de Janeiro (RJ); Hosp. Profº Edgar Santos – Salvador (BA).

À Universidade Federal de São Paulo (Campus Diadema) pelo uso do parque de equipamentos para a realização das análises de MALDI *Imaging*.

Ao Laboratório Nacional de Biociência – LNBio (CNPq) pela utilização dos serviços da *facility* de espectrometria de massas nas análises de LC-MS/MS.

Ao CNPq (Processo 46368/2014-8) e FAPESP (2009/52088-3 e 2012/23127-3) pelo financiamento da pesquisa e bolsa de estudos.

## RESUMO

Silva EJ. **Análise *in situ* de proteínas diferencialmente expressas em carcinomas epidermóides penianos por espectrometria de massas utilizando *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI)***. São Paulo; 2016. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

O carcinoma de pênis (CaPe) corresponde a uma doença maligna mutilante do homem. É mais frequente em regiões economicamente desprivilegiadas, como o Norte/Nordeste do Brasil, onde frequentemente é diagnosticado como doença mais avançada. Assim, novos marcadores diagnósticos, prognósticos e preditivos de tratamentos terapêuticos ainda são necessários. Abordagens proteômicas, incluindo o MALDI Imaging, podem contribuir neste sentido. Esta técnica emergente de espectrometria de massas permite a visualização da distribuição espacial de centenas de dados moleculares diretamente da superfície de uma secção tecidual, adquiridos por razão massa/carga ( $m/z$ ). Neste contexto, nosso principal propósito foi integrar dados de proteômica clássica (gel 2D e Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas) e de MALDI Imaging, para obter padrões diferenciais de proteínas associados com amostras de Carcinoma Epidermoide Peniano usual (relacionado ou não ao HPV) e espécimes normais, a fim de buscar possíveis biomarcadores da doença. Um total de 45 amostras de CaPe, congeladas, foram inicialmente genotipadas para a presença do HPV. Destas, 60% foram positivas para variantes virais de alto risco. A proteômica clássica (N=24) evidenciou níveis diferenciais de 35 proteínas entre amostras de CaPe e controles, e 29 entre CaPe HPV positivo versus negativo ( $P < 0,05$ ; ANOVA). Redes de interações demonstraram que estes perfis proteicos interagem com clusters de proteínas relacionadas com a carcinogênese e progressão tumoral. Entre eles, se destacaram aqueles formados por proteínas antioxidantes e de adesão celular, presentes em níveis elevados em tumores HPV negativos. A partir dos interactomas, quatro alvos proteicos foram selecionados para a análise *in situ* por imageamento: Calreticulina, 14-3-3 sigma, Serpina B5 e

Glutathione-S-transferase. A aquisição de dados do MALDI Imaging foi conduzida após a digestão in situ pela tripsina, usando uma resolução de 200  $\mu\text{m}$  e faixa de 700-3500 m/z para peptídeos (N=31). Os dados de identificação do gel 2D foram então integrados aos do imageamento. A identidade proteica dos filtros foi confirmada, in silico, por meio da presença de peptídeos teóricos co-localizados com o peptídeo experimental alvo nas secções de CaPe. Não houve associação significativa entre os parâmetros clinicopatológicos e as intensidades de sinal dos alvos ( $P > 0,05$ , U de Mann-Whitney). Análises não supervisionadas, realizadas a partir dos dados do MALDI Imaging, evidenciaram mapas de segmentação que coincidiram com as regiões tumorais e margens adjacentes livres de neoplasia. Entre os principais valores de m/z diferenciadores estava o pico  $1413 \pm 2,5$  Da, abundante nas regiões tumorais, e correlacionado ao peptídeo experimental m/z 1410,86 referente à proteína Calreticulina (CRT), o. Análises estatísticas (PCA e Curva ROC) indicaram este valor de m/z como potencial biomarcador da doença. Por conseguinte, a CRT foi selecionada para a etapa de validação por imunohistoquímica em tecidos parafinados de CaPe (N=158). Níveis elevados de imunoreatividade da CRT foram associados com piores tempo de sobrevivência global (Razão de Risco 2,3; IC-1,46-3,96;  $P < 0,001$ ) e câncer específica (Razão de Risco 4,37; IC-1,66-11,51;  $P = 0,002$ ) nos casos de CaPe. A presença de metástase em linfonodos foi considerado um fator prognóstico independente para o risco de morte pelo câncer (Razão de Risco – 14,18; CI-3,29-61,12;  $P < 0,001$ ). A imunoreatividade da CRT também foi capaz de prever a presença de metástase em linfonodos (Chance de Risco: 1,006; IC- 1,0001-1,0012;  $p = 0,044$ ). Estes dados, em conjunto, sugerem que a CRT pode ser um potencial biomarcador prognóstico do CaPe. A estratégia de integração da proteômica clássica com o MALDI Imaging, mostrou-se uma ferramenta útil na busca de novos biomarcadores para o CaPe. Além disto, o trabalho adicionou uma visão analítica à histopatologia clássica, o que deverá inserir as técnicas utilizadas neste projeto em estudos de Anatomia Patológica, tanto em nossa instituição, quanto no contexto global.



## SUMMARY

Silva EJ. [*In situ* analysis of protein differentially expressed in penile squamous cell carcinoma by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) mass spectrometry]. São Paulo; 2016. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Penile cancer (PeCa) corresponds to a mutilating malignant disease in men. It is more frequent in underprivileged socioeconomic regions (e.g., North-East of Brazil), where it is frequently diagnosed in advanced stages. Thus, new markers are still needed for early diagnosis, prognosis and prediction of therapy. Proteomic approaches, including MALDI Imaging, could assist in this effort. This emerging spatially resolved mass spectrometric technique can obtain topographical distribution of hundreds of molecules directly from the tissue section surface, measured by mass/charge ratio ( $m/z$ ). In this context, our main propose was to integrate classic proteomic data (2D gel and Liquid Chromatograph coupled with Mass Spectrometry) with MALDI Imaging to obtain differential patterns of protein associated with Usual Squamous Cell Penile Carcinoma (HPV related or not) and normal specimens, to look for possible biomarkers of the disease. A total of 45 fresh-frozen PeCa samples were initially searched for HPV genotype, 60% of which were positive for high-risk HPV. Classic proteomics (N=24) demonstrated differential levels of 35 proteins comparing PeCa and control samples, and 29 comparing HPV-positive *versus* HPV-negative PeCa samples ( $P < 0.05$ ; ANOVA). Protein networks showed that these protein profiles interact with clusters of proteins related with tumorigenesis and tumor progression processes. Among them, antioxidant and cell adhesion proteins play a critical role in HPV negative penile tumors. Based on interactome data, four protein targets were selected for *in situ* analyses by imaging: Calreticulin, 14-3-3 protein sigma, Serpin B5 and Glutathione-s-transferase. MALDI Imaging data acquisition of peptides was conducted after *in situ*

trypsin digestion using a lateral resolution of 200  $\mu\text{m}$ , covering the range 700-3500  $m/z$  (N=31). After that, 2D gel based proteomic data was integrated with Imaging data. The filter protein identities were confirmed *in silico* by the co-localization of theoretical triptic peptides with the experimental peptides in PeCa sections. There was no significant association between the clinical and pathological parameters and the target signal intensities ( $P>0.05$ ; U de Mann-Whitney). An unsupervised clustering analysis based on MALDI Imaging data revealed segmentation maps that coincide with histological annotation for tumor and adjacent non-neoplastic regions. Among the mainly differentiating  $m/z$  values there was  $1413 \pm 2.5$  Da. This peak was especially co-localized with tumoral regions and correlated with Calreticulin (CRT) experimental peptide ( $m/z$  1410,86). Statistical analysis (PCA and ROC Curves) indicated this  $m/z$  value as a potential biomarker of the disease. For this reason, CRT was selected for validation by immunohistochemistry performed on paraffin-embedded PeCa tissues (N=158). As result, CRT hiperexpression in PeCa tissue increased the risk of unfavorable overall survival (Relative Risk – 2.3; CI-1.46-3.96;  $P<0.001$ ) and cancer specific survival (Relative Risk – 4.37; CI-1.66-11.51;  $P=0.002$ ) in these patients. Lymph node metastasis represented an independent prognostic risk factor for death related to cancer in our patients (Relative risk – 14.18; CI-3.29-61.12;  $P <0.001$ ). CRT immunoreactivity was also capable to predict the presence of lymph node metastases (Risk Chance – 1,006; CI-1.0001-1.00123;  $P =0.044$ ). Taken together, our results suggest that CRT may represent a prognostic biomarker of PeCa. The strategy of integrated classic proteomic and MALDI Imaging revealed as usefull tool to search for news biomarkers of the disease. Futhermore, this work added an analytical perspective to the classical histopathology, allowing to include the techniques used in this project in future morphological studies, both in our institution and in the global context.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Exemplo de um espectrograma de massas.....	11
<b>Figura 2</b>	Imagem molecular gerada a partir da aplicação da tecnologia do MALDI <i>Imaging</i> .....	21
<b>Figura 3</b>	Fluxograma da casuística utilizada no estudo.....	26
<b>Figura 4</b>	<i>Spots</i> selecionados para a etapa de identificação proteica, quando comparado grupo tumor <i>versus</i> controle.....	50
<b>Figura 5</b>	<i>Spots</i> selecionados para etapa de identificação proteica, quando comparado CEP HPV positivo e HPV negativo.....	51
<b>Figura 6</b>	Cromatograma Total de Íons (A), espectro de MS (B) e MS/MS (C) do spot 27.....	52
<b>Figura 7</b>	Rede de interações das proteínas diferenciais nas amostras de Carcinoma Epidermoide Peniano, tipo usual, com processos biológicos.....	58
<b>Figura 8</b>	Rede de interações das proteínas diferenciais nas amostras de Carcinoma Epidermoide Peniano, tipo usual, HPV positivas, com processos biológicos.....	59
<b>Figura 9</b>	Análise <i>in situ</i> dos peptídeos trípticos alvos do estudo.....	64
<b>Figura 10</b>	Co-localização do peptídeo experimental e teóricos da proteína Calreticulina em amostra de carcinoma peniano.....	66
<b>Figura 11</b>	Co-localização do peptídeo experimental e teóricos da proteína 14-3-3 sigma em amostra de carcinoma peniano.....	66

<b>Figura 12</b>	Co-localização do peptídeo experimental e teóricos da proteína Serpina B5 em amostra de carcinoma peniano.....	67
<b>Figura 13</b>	Co-localização do peptídeo experimental e teóricos da proteína Glutaciona-s-transferase em amostra de carcinoma peniano.....	67
<b>Figura 14</b>	Mapa de segmentação dos <i>clusters</i> relacionados às regiões tumorais e adjacente normais em amostras de Carcinoma Epidermoide Penianos usuais.....	68
<b>Figura 15</b>	<i>Score plot</i> e histograma do percentual de explicação das componentes utilizadas nas análises de PCA, entre regiões tumorais <i>versus</i> adjacentes normais, em amostras Carcinoma Epidermoide Penianos usuais.....	69
<b>Figura 16</b>	Espectrograma de massas das regiões do mapa de segmentação.....	70
<b>Figura 17</b>	Curva ROC do $1413 \pm 2.5$ Da e imagens moleculares da sua distribuição espacial, nas amostras tumorais 1 e 2.....	71
<b>Figura 18</b>	Distribuição espacial dos peptídeos trípticos alvo do estudo.....	72
<b>Figura 19</b>	Imunoreatividade da Calreticulina no citoplasma de células do Epitélio Normal Peniano (ENP) e Carcinoma Peniano (CaPe).....	75
<b>Figura 20</b>	Avaliação imunoistoquímica da Calreticulina, nos tecidos parafinados de Carcinoma Penianos <i>versus</i> controles.....	76
<b>Figura 21</b>	Estimativa do ponto de corte para o Hscore da Calreticulina para as análises de sobrevivência nos casos de amostras de Carcinoma Peniano parafinados.....	77

<b>Figura 22</b>	Curvas de sobrevivências em função da imunoreatividade da Calreticulina nos casos amostras de Carcinomas Penianos parafinados.....	78
<b>Figura 23</b>	Probabilidade de ocorrência de metástases em linfonodos em função do Hscore da proteína Calreticulina em amostras de Carcinoma Peniano parafinadas.....	80
<b>Figura 24</b>	Espectro adquirido a partir da fragmentação da massa parental 1410,86 Da, referente à proteína Calreticulina.....	83

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Número de amostras de tumores penianos processadas no estudo por instituição.....	25
<b>Tabela 2</b>	Caracterização do anticorpo utilizado nas análises de imunistoquímica.....	41
<b>Tabela 3</b>	Caracterização histopatológica dos tecidos congelados de Carcinoma Epidermoide Peniano, tipo usual, utilizados na etapa de eletroforese 2D (N=14).....	44
<b>Tabela 4</b>	Caracterização histopatológica dos tecidos congelados de Carcinoma Epidermoide Peniano, tipo usual, utilizados nos experimentos de imageamento molecular por espectrometria de massas (N=21).....	45
<b>Tabela 5</b>	Caracterização histopatológica das 158 amostras de Carcinoma Peniano inclusas no <i>Tissue Microarray</i> (TMA) utilizado na etapa de validação por imunistoquímica.....	46
<b>Tabela 6</b>	Resultados da detecção e tipagem do HPV por meio do kit <i>LINEAR ARRAY HPV Genotyping Test</i> (Roche®).....	47
<b>Tabela 7</b>	Resultados da análise, por LC-MS/MS, dos <i>spots</i> diferenciais entre o grupo tumoral e controle.....	53
<b>Tabela 8</b>	Resultados da análise, por LC-MS/MS, dos <i>spots</i> diferenciais entres os tumores penianos com e sem associação ao HPV.....	55
<b>Tabela 9</b>	Proteínas identificadas por MALDI TOF/TOF e selecionadas para as análises <i>in situ</i> por imageamento molecular.....	63

<b>Tabela 10</b>	Comparação estatística das intensidades médias dos peptídeos alvos em regiões de interesse de amostras de Carcinoma Peniano de acordo com as variáveis clinicopatológicas e grupo controle.....	65
<b>Tabela 11</b>	Principais valores de m/z co-localizados nas regiões tumorais, determinadas pelo mapa de segmentação, de amostras de Carcinomas Epidermoide Peniano, tipo usual, utilizadas no estudo.....	70
<b>Tabela 12</b>	Estimativas dos parâmetros do modelo de regressão de Cox (sobrevida global), em pacientes com Carcinoma Peniano.....	79
<b>Tabela 13</b>	Estimativas dos parâmetros do modelo de regressão de Cox (sobrevida câncer específica), em pacientes com Carcinoma Peniano.....	79

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b><sup>18</sup>F-FDG*</b>	[18] F-flourodeoxiglicose
<b>2D*</b>	Bi-dimensional
<b>ACN</b>	Acetonitrila
<b>AJCC*</b>	<i>American Joint Committee on Cancer</i> (Comitê Cooperativo Americano de Câncer)
<b>AKT*</b>	Proteína quinase B (PKB)
<b>ANOVA*</b>	Análise de variância
<b>ATP*</b>	<i>Adenosine Triphosphate</i> (adenosina trifosfato)
<b>AUC*</b>	<i>Area Under the Curve</i> (área sob a curva)
<b>CaPe</b>	Carcinoma Peniano
<b>CEP</b>	Carcinoma Epidermoide Peniano
<b>CHAPS*</b>	<i>3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate</i>
<b>CI5*</b>	<i>Cancer Incidence in Five Continents</i> (Incidência do Câncer em Cinco Continentes)
<b>CID*</b>	<i>Collision-Induced Dissociation</i> (dissociação induzida por colisão)
<b>CRT</b>	Calreticulina
<b>CT*</b>	<i>Computed Tomography</i> (tomografia computadorizada)
<b>CTAB*</b>	<i>Cetyl Trimethylammonium Bromide</i>
<b>DAB*</b>	<i>3,3'-diaminobenzidine</i>
<b>DNA*</b>	<i>Deoxiribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
<b>DTT*</b>	<i>Dithiothreitol</i>
<b>ENP</b>	Epitélio Normal Peniano
<b>ESI*</b>	<i>Electrospray Ionization</i>
<b>FDA*</b>	<i>Food and Drug Administration (USA)</i> – (Departamento de Administração de Fármacos e Alimentos , Estados Unidos da América)
<b>FDR*</b>	<i>False Discovery Rate</i>
<b>GST</b>	Glutathiona-s-Transferase



<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>HE</b>	Hematoxilina e Eosina
<b>HFIP*</b>	Hexafluoroisopropanol
<b>HPLC*</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (cromatografia líquida de alto rendimento)
<b>HPV*</b>	<i>Human papillomavirus</i> (vírus do papiloma humano)
<b>IAA*</b>	<i>Iodocetamide</i>
<b>IARC</b>	<i>International Agency for Research on Cancer</i> (Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer)
<b>IC</b>	Intervalo de Confiança
<b>ISD*</b>	<i>Ion source Decay</i>
<b>ITO*</b>	<i>Indium-Tin-Oxide</i>
<b>JAK/STAT*</b>	<i>Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
<b>KDa*</b>	<i>Kilo Daltons</i> - unidade de massa atômica
<b>LC*</b>	<i>Liquid Chromatography</i> (cromatografia líquida)
<b>m/z</b>	Razão massa/carga
<b>MALDI*</b>	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
<b>MAPK*</b>	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
<b>MASPIN*</b>	<i>Mammary Serine Proteinase Inhibitor</i>
<b>MDM2*</b>	<i>Murine Double Minute 2</i>
<b>miR</b>	MicroRNA (micro ácido ribonucleico)
<b>MS*</b>	<i>Mass Spectrum</i>
<b>mTOR*</b>	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
<b>NIH*</b>	<i>National Health Institute</i> (Instituto Nacional de Saúde, Estados Unidos da América)
<b>PAGE*</b>	<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> (gel de eletroforese de poliacrilamida)
<b>PBS*</b>	<i>Phosphate-buffered saline</i> (tampão fosfato salino)
<b>PCA*</b>	<i>Principal Component Analysis</i> (análise do componente principal)

<b>PET*</b>	<i>Positron Emission Tomography</i> (tomografia por emissão de pósitrons)
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>Pi</b>	Ponto isoelétrico
<b>PI3K</b>	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
<b>PMF</b>	<i>Peptide Fingerprint</i>
<b>Rb</b>	Retinoblastoma
<b>RE</b>	Retículo Endoplasmático
<b>ROC*</b>	<i>Receiver Operation Characteristic</i> (Característica de Operação do Receptor)
<b>SB5*</b>	Serpina B5
<b>SDS*</b>	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
<b>SPSS*</b>	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i> (Pacote estatístico para as Ciências Sociais)
<b>TEM</b>	Transição Epitélio-Mesênquima
<b>TFA*</b>	<i>Trifluoroacetic acid</i>
<b>TIC*</b>	<i>Total Ion Count</i> (contagem total de íons)
<b>TMA*</b>	<i>Tissue MicroArray</i> (microarranjo de tecidos em matriz)
<b>TNM*</b>	<i>Tumor Nodes Metastasis</i> (Tumor, Linfonodos, Metástases)
<b>TOF*</b>	<i>Time of Flight</i> (tempo de voo)
<b>UPLC*</b>	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> (cromatografia líquida de ultra-resolução)

\*Siglas ou abreviaturas derivadas do inglês (com traduções, quando possível).

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1	O Carcinoma Peniano .....	1
1.2	Princípios de Espectrometria de Massas.....	8
1.3	Métodos de Separação de Proteínas .....	12
1.4	Aplicações Clínicas da Proteômica .....	15
1.5	O Imageamento Molecular na Oncologia .....	17
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>
2.1	Objetivo Geral.....	22
2.2	Objetivos Específicos .....	22
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
3.1	Casuística.....	24
3.1.1	Crterios de Inclusão e Exclusão .....	27
3.2	Genotipagem do HPV.....	27
3.3	Eletroforese Bidimensional .....	27
3.3.1	Extração de Proteínas e Quantificação .....	27
3.3.2	Primeira Dimensão .....	29
3.3.3	Segunda Dimensão .....	29
3.3.4	Digestão <i>In Gel</i> .....	30
3.4	LC-MS/MS .....	31
3.5	Interações Proteicas por Bioinformática .....	32
3.6	Análise <i>In Situ</i> de Peptídeos por MALDI <i>Imaging</i> .....	32
3.7	Processamento dos dados Analíticos.....	35
3.7.1	Co-Localização de Peptídeos Teóricos .....	35
3.7.2	Correlações Clinicopatológicas .....	36
3.7.3	Análise Multivariada não Supervisionada .....	36
3.8	Validação por Imunoistoquímica.....	38
3.8.1	Análise Estatística .....	41

<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>43</b>
4.1	Dados Clínicos e Genotipagem do HPV.....	43
4.2	Proteômica Clássica.....	49
4.3	Bioinformática.....	57
4.4	Imageamento Molecular por Espectrometria.....	60
4.5	Imunoistoquímica .....	73
<b>5</b>	<b>DESAFIOS ANALÍTICOS ENFRENTADOS</b> .....	<b>81</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>84</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>106</b>
<b>8</b>	<b>PLANO DE PUBLICAÇÃO</b> .....	<b>108</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS</b> .....	<b>109</b>

## **ANEXOS**

- Anexo 1** Classificação e Estadiamento TNM dos Tumores Penianos
- Anexo 2** Algoritmo Tratamento do Tumor Primário
- Anexo 3** Termo de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP
- Anexo 4** Cartilha de Procedimentos Cirúrgicos
- Anexo 5** Metodologias por cada amostra
- Anexo 6** Listas de Peptídeos Trípticos Teóricos

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O CARCINOMA PENIANO

O câncer de pênis (CaPe) é uma doença rara, sobretudo em países desenvolvidos. No entanto, em regiões economicamente desprivilegiadas, como o norte/nordeste do Brasil, por exemplo, pode atingir índices significativos de acometimento, constituindo até 16% das neoplasias malignas masculinas (BLEEKER et al. 2009). É considerado um sério problema de saúde em países em desenvolvimento (GUIMARÃES et al. 2011). Na Espanha, representa aproximadamente 0,7% de todos os tumores malignos em homens, com uma incidência anual de 0,7 a 1,5 casos por 100.000 homens/ano. Índices similares são encontrados em outras partes da Europa e Estados Unidos. Entretanto, entre judeus israelenses os índices são extremamente baixos, 0,1 por 100 mil indivíduos/ano. A circuncisão neonatal atua como fator protetor neste grupo (POW-SANG et al. 2010). Na última publicação do *International Agency for Research on Cancer-IARC* (2014), acerca da incidência de CaPe nos cinco continentes, a cidade de Goiânia (GO) lidera o *ranking* de casos de CaPe no mundo, apresentando uma taxa de 3,3 por 100 mil homens/ano (CI5-X 2014). As causas dessas variações geográficas na incidência desse tipo de câncer ainda não estão bem esclarecidas. Contudo, vários fatores socioeconômicos e culturais têm

sido associados com a alta prevalência de tumores penianos (CUBILLA et al. 2010).

A despeito da alta incidência desta neoplasia, os estudos epidemiológicos multicêntricos são escassos em nosso país. Isto resulta em dados pouco confiáveis em relação aos aspectos mais básicos da lesão. Os principais dados epidemiológicos sobre essa doença resultam apenas de um estudo realizado pela Sociedade Brasileira de Urologia. Nesta casuística, que envolveu 283 novos casos de CaPe, foram identificados alguns fatos que fogem ao conhecimento tradicional desse tumor. Aproximadamente 20% dos casos acometeram pacientes abaixo dos 45 anos de idade (7,5% abaixo dos 35 anos) e 58% dos casos eram de estádios avançados (T2-T4) (FAVORITO et al. 2008). Estes dados, embora bastante elementares, demonstram o precário panorama do CaPe no Brasil.

Os fatores de risco incluem a presença de fimose, condições precárias de higiene, certas inflamações crônicas da pele, fimose e infecção pelo HPV (FERRÁNDIZ-PULIDO et al. 2012). Em um estudo multicêntrico conduzido por ZEQUI et al. (2012) no Brasil, a prática de sexo com animais foi sugerido como um possível fator de risco para o desenvolvimento do CaPe (Razão de Risco: 2,07; IC: 1,21 a 3,52; P= 0,007; Análise Multivariada). Segundo os autores do estudo, o contato do tecido peniano com a mucosa de outro animal resultaria em microtraumas, seguido de exposição a secreções antigênicas ou carcinogênicas para os humanos. Esta situação poderia favorecer um processo de irritação crônica e displasia, podendo culminar no aparecimento de uma neoplasia.

A apresentação clínica do CaPe varia de um inchaço sutil, pequeno nódulo, pústula ou verruga, a um carcinoma extenso. Os sintomas precoces incluem coceira ou ardência sob o prepúcio ou ulceração do mesmo. A progressão da doença ocorre de forma locorregional, com o envolvimento sequencial dos gânglios linfáticos, pélvicos e inguinais, antes do desenvolvimento de metástases mais distantes (KAYES et al. 2007). Em um estudo de autópsias, os principais sítios de metástases incluíram o fígado, pulmões, ossos e miocárdio (CHAUX et al. 2011).

O sistema de estadiamento dos tumores penianos é um processo em contínuo desenvolvimento, sendo que a classificação mais recente foi proposta pelo *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (EDGE e COMPTON 2010). No Anexo 1 é possível observar esta classificação e o sistema de estágios clínicos da doença.

A etiopatogenia molecular do CaPe parece envolver alterações em diferentes vias carcinogênicas. Enquanto pouco se sabe acerca do impacto e das inter-relações destas vias, é aceito que uma proporção de carcinomas penianos está associada com a infecção pelo HPV de alto risco (HPV, do inglês *human papillomavirus*) e a outra, por mecanismos moleculares independentes do HPV (RUBIN et al. 2001).

Basicamente, os tumores penianos seriam iniciados por interferências nas vias celulares p14<sup>ARF</sup>/MDM2/p53 e/ou p16<sup>INK4a</sup>/cyclina D/Rb, tanto por via viral (expressão de oncoproteínas E6 e E7), quanto por mecanismos não virais (mutações, silenciamento de genes supressores de tumor e hipermetilação de promotores) (FERREUX et al. 2003). Interferências nestas

vias promovem alterações na divisão celular e redução da apoptose, desencadeando um estado de instabilidade cromossômica que conduz ao processo carcinogênico (HEIDEMAN et al. 2012). Em estágios avançados de CaPe foram identificadas alterações em genes responsáveis pela progressão da doença, invasão, angiogênese e metástase (GOLIJANIN et al. 2004; CAMPOS et al. 2006).

A maioria (95%) dos tumores penianos é constituída por carcinomas derivados do epitélio pluriestratificado, tanto da glândula como do sulco coronal e prepúcio. Um variado espectro de distintas morfologias é atualmente reconhecido, incluindo 12 subtipos com características patológicas e clínicas diferentes (VELAZQUEZ e CUBILLA 2007; CHAUX et al. 2010). Estudos indicam que 48% a 65% dos tumores penianos são carcinomas epidermóides do tipo usual; o restante, corresponde aos carcinomas verrucosos, condilomatosos, papilíferos, sarcomatóides, pseudoglandulares, *cuniculatum*, adenoepidermóides, condilomatoso-basalóides, pseudo-hiperplásicos, basalóides e mistos (Epstein et al. 2011, citado por CHAUX e CUBILLA 2012, p.773).

Os dados morfológicos, além da classificação correta do subtipo, podem dar informações bastante úteis em relação ao comportamento biológico do tumor. Entre eles, o sítio anatômico, tamanho, espessura, características do frente de invasão e invasão vascular ou perineural são considerados aspectos importantes na predição das metástases linfonodais e da sobrevida câncer específica em pacientes diagnosticados com CaPe (LOPES et al. 1996; GUIMARÃES et al 2006).



Em estágios iniciais de CaPe o tratamento conservador pode ser realizado, com ressecção do tumor ou radioterapia (GUIMARÃES et al. 2011). Nos casos de doença avançada, procedimentos cirúrgicos que incluem amputação total ou parcial ainda são necessários, com o objetivo de remover a lesão primária respeitando-se margens de pelo menos 2 cm (SHABBIR et al. 2014). Embora este tratamento seja bastante curativo, pode ser devastador para a qualidade de vida e saúde mental do paciente (DIORIO et al. 2016). No Anexo 2 está disposto um fluxograma com as principais estratégias de tratamento dos tumores primários penianos.

Os linfonodos superficiais e profundos, das regiões inguinais e ilíaca, são os principais sítios de metástase em casos de CaPe (FAVORITO 2016). Dessa forma, a dissecação linfonodal inguino-ilíaca é parte importante da terapêutica, porém, apresenta índices elevados de morbidade. Por isto, a seleção dos pacientes deve ser criteriosa (COBLENTZ e THEODORESCU 2002). Outro fator agravante é que em cerca de 50% dos casos de CaPe que apresentam confirmação clínica de presença de linfonodos metastáticos (linfonodos palpáveis), não há evidências histopatológicas da doença (GUIMARÃES et al. 2011).

Em pacientes que apresentam acometimento avançado locorregional e são considerados irresssecáveis, a utilização de quimioterapia neoadjuvante seguida de cirurgia conservadora tem demonstrado benefícios significativos na sobrevida destes pacientes (PAGLIARO et al. 2010). Todavia, em pacientes com metástases distantes não há tratamentos

efetivos, sendo a quimioterapia paliativa o único recurso disponível (BLEEKER et al. 2009; DIORIO et al. 2016).

A eficiência de terapias adjuvantes e neoadjuvantes no tratamento do CaPe tem sido alvo de diversos estudos. Segundo o NIH (*National Cancer Institute*, Instituto Nacional do Câncer, Estados Unidos da América) no momento há 23 estudos clínicos em fase inicial, relacionados aos tumores penianos. Em um estudo clínico de fase II, 39 pacientes com confirmação histológica de metástase distante, receberam uma combinação dos quimioterápicos docetaxel, cisplatina e fluorouracil com média de quatro ciclos. Cerca de 40% dos pacientes tiveram uma resposta objetiva ao tratamento, e apresentaram média de progressão livre de doença de três meses e sobrevida global média de sete meses (ZHANG et al. 2015). Muito embora vários aprimoramentos na conduta clínica do CaPe tenham sido obtidos, os resultados ainda são modestos. Esta situação reafirma a necessidade de avanços na compreensão da biologia do tumor, a fim de gerar novas opções para delinear melhor os estudos clínicos.

Nos últimos anos diversos estudos em CaPe buscaram aprimorar a avaliação da eficácia prognóstica de marcadores plasmáticos (ZHU et al. 2008), teciduais (LOPES et al. 2002; ROCHA et al. 2012; TERMINI et al. 2015; VASSALLO et al. 2015; WERNECK et al. 2016) e também marcadores genéticos (SILVA et al. 2013; BUSSO-LOPES et al. 2014; KUASNE et al. 2015). Os principais achados científicos relacionados a marcadores moleculares no CaPe foram compilados por RODNEY et al. (2015) em revisão de literatura. Apesar do empenho dos grupos de pesquisa em CaPe,

ainda há uma escassez de biomarcadores disponíveis na rotina médica que possam auxiliar os clínicos na predição de resposta terapêutica em casos de CaPe (VUICHOUD et al. 2016).

A associação entre alguns subtipos histológicos de CaPe e o HPV tem sido constantemente evidenciada na literatura, com incidência de cerca de 50% dos casos (BACKES et al. 2009; CALMON et al. 2011). A relação entre prognóstico e *status* do HPV em CaPe ainda não está esclarecida na literatura. Em muitos estudos não houve variação significativa entre o *status* do HPV e sobrevida dos pacientes (FONSECA et al. 2013; HERNANDEZ et al. 2014). No entanto, DJAJADININGRAT et al. (2015) demonstrou prognóstico favorável em amostras positivas para genótipos de alto risco do HPV, numa série de 487 pacientes diagnosticados com CaPe. Em carcinomas de orofaringe a presença do HPV também conferiu baixo risco de progressão da doença, sendo reconhecido como um fator de bom prognóstico (WEINBERGER et al. 2006).

Ainda nos dias de hoje a sobrevida dos pacientes após o tratamento da lesão primária ainda é determinada, basicamente, pela extensão de metástases nos linfonodos regionais (NICHOLSON et al 2013). Vale ressaltar que a sobrevida em cinco anos cai dramaticamente em pacientes com metástases linfonodais. Dessa forma, fatores prognósticos clínicos e moleculares podem ajudar a evitar o tratamento mais agressivo, como indicar casos para a linfadenectomia, reduzindo futuras complicações (GUIMARÃES et al. 2011).

Avanços na compreensão das mudanças patogênicas que ocorrem no CaPe ainda são limitados (CALMON et al. 2011). Pesquisas adicionais com o propósito de delinear a sequência dos eventos moleculares envolvidos no desenvolvimento e progressão de lesões precursoras são necessárias para auxiliar na detecção precoce, prognóstico e estratégias terapêuticas para o CaPe (HEIDEMAN et al. 2012). A identificação de alvos moleculares de origem proteica por meio de análises de proteômica baseadas em espectrometria de massas pode contribuir neste sentido. Pois as alterações gênicas se revelam por meio das proteínas, que são os efetores finais das várias vias metabólicas e constituintes das células e tecidos.

## **1.2 PRINCÍPIOS DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

O termo proteômica foi introduzido por WILKINS et al. (1996), fazendo uma analogia à genômica, sendo conceituado como uma análise completa de proteínas de uma célula, tecido ou organismo. A utilização da espectrometria de massas como ferramenta proteômica para correlacionar as proteínas com seus respectivos genes tornou-se uma combinação eficiente. Isto foi conseguido, em parte, pelos avanços simultâneos nas técnicas de análise de massas e de sequenciamento em larga escala do genoma (YATES 1998). Representa o principal método de escolha para analisar proteínas de amostras biológicas complexas e, conseqüentemente, descobrir novos biomarcadores (MAES et al. 2015; NEDELKOV 2016).

A invenção do espectrômetro de massas é atribuída ao Dr. Joseph John Thomson, que recebeu o prêmio Nobel em Física em 1906, por seus estudos envolvendo condução de eletricidade por gases. A espectrometria de massas é uma técnica microanalítica capaz de detectar seletivamente e quantificar uma dada molécula (analito). Além disso, pode determinar a composição e aspectos estruturais de um composto (WATSON e SPARKMAN 2007).

O princípio da espectrometria consiste na habilidade de mensurar a razão massa/carga ( $m/z$ ) dos analitos em fase gasosa. Esta característica implica na necessidade da biomolécula estar carregada eletricamente (ionizada). Uma vez carregada, esta partícula pode então ter sua posição manipulada em um espaço, por influência de um campo elétrico ou magnético, de modo que seu valor de  $m/z$  possa ser analisado e detectado por um equipamento de espectrometria de massas.

O espectrômetro de massas é constituído basicamente por cinco partes principais: um sistema de injeção de amostra, uma fonte de ionização, um analisador de massas, um detector de massas e uma estação de processamento de dados. É na etapa de ionização que os íons gasosos são formados e, em seguida, as partículas carregadas negativamente ou positivamente são aceleradas eletrostaticamente em direção ao analisador de massas. O *eletrospray* ou ESI (Do inglês “ElectroSpray Ionization”) e a dessorção à laser assistida por matriz ou MALDI (Do inglês “Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization”), são os métodos de ionização mais utilizados em análises de espectrometria de massas.

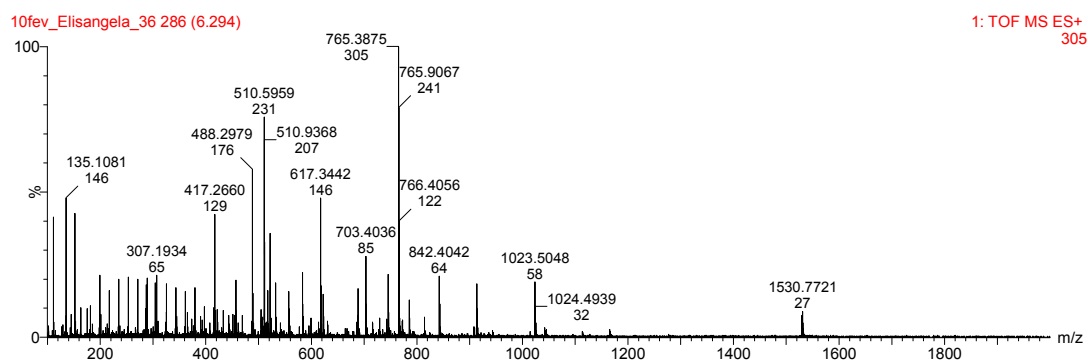
A técnica do ESI foi inicialmente desenvolvida por FENN et al. (1990). Enquanto que a invenção do MALDI é atribuída aos trabalhos realizados por TANAKA et al. (1988) e HILLENKAMP e KARAS (1990). O método do ESI, um “spray” de gotículas carregadas é formado com auxílio de um campo elétrico, produzindo íons positivos ou negativos. No MALDI uma solução de matriz, formada por compostos orgânicos, cristalizada junto com o analito, absorve a energia do laser e a transfere para o analito. Após este evento, os íons passam da fase sólida para a gasosa (dessorção). O desenvolvimento destes métodos de ionização culminou na escolha do prêmio Nobel de Química em 2002, compartilhado entre o Dr. John Fenn e Dr. Koiche Tanaka.

Após a etapa de ionização, os íons gerados são separados pelo analisador de massas, de acordo com sua massa, carga e forma. Diferentes analisadores são disponíveis, estes utilizam uma enorme variedade de estratégias físicas para desempenhar sua função, incluindo a fragmentação de um íon para posterior análise (CAMERON 2012). Quando tal evento ocorre, ou seja, quando os íons são seletivamente encaminhados para uma segunda etapa de fragmentação, caracteriza-se uma análise de MS/MS (MS, Do inglês “Mass Spectrum”), também chamada de espectrometria *in Tandem*. Fragmentações promovem dissociações iônicas e acumulam mais informações espectrais da biomolécula, aumentando a confiabilidade na etapa de identificação.

Um exemplo de analisador de massas é o analisador do tipo TOF (Do inglês “Time-Of-Flight”), nos quais, os íons são separados de acordo com o

tempo de “voo” necessário para percorrer um dado trajeto dentro do equipamento. O tempo de “voo” depende da velocidade atingida pelo íon, que por sua vez provém das características químicas e estruturais da partícula. Dessa forma, ainda que os íons sejam expostos à mesma aceleração inicial, atingirão velocidades distintas, e, conseqüentemente, distintos valores de  $m/z$ . Finalmente, as partículas são detectadas e os dados analíticos são processados com auxílio de softwares.

Os dados adquiridos são visualizados graficamente por meio de um espectrograma, no qual, os valores de  $m/z$  são dispostos em função de sua intensidade relativa ou absoluta em uma dada amostra, gerando um conjunto de picos. Na Figura 1, é possível observar um exemplo de espectrograma de massas.



**Figura 1** - Exemplo de um espectrograma de massas. Adquirido no intervalo de 200 a 1800  $m/z$ , de peptídeos oriundos da digestão trípica da hemoglobina humana, por meio de um analisador de massas tipo TOF.

Outro conceito importante na proteômica baseada em espectrometria de massas diz respeito ao processamento da amostra antes da aquisição

dos dados. Quando as análises espectrométricas são conduzidas em entidades intactas, caracteriza-se uma estratégia *top down*. Em princípio, uma das vantagens seria a identificação, em paralelo, de todas as modificações que ocorrem em uma dada molécula. (TRAN et al. 2012). No entanto, as estratégias *bottom-up*, nas quais as proteínas são extraídas de uma amostra e, em seguida, são clivadas enzimaticamente em peptídeos por enzimas, têm demonstrado maior facilidade experimental (AEBERSOLD e MANN 2016).

### **1.3 MÉTODOS DE SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS**

Métodos de separação de proteínas podem ser aplicados para facilitar a identificação espectrométrica dos alvos proteicos de amostras biológicas complexas, tanto em abordagens *top down*, quanto *bottom-up*. A cromatografia líquida (LC, do inglês “Liquid Chromatography”) e a eletroforese bidimensional (2D) são exemplos de técnicas utilizadas para separar proteínas antes da aquisição dos espectros de massas.

O desenvolvimento do método da eletroforese 2D se deu no início dos anos 80, muito antes do termo proteômica ser introduzido na ciência (BRAVO e CELIS 1985; WILKINS et al. 1996). Basicamente, as proteínas são inicialmente separadas de acordo com o seu Ponto isoelétrico (Pi), ou seja, valor de pH no qual sua carga é nula. Esta etapa é conhecida como focalização isoelétrica e consiste na 1ª dimensão. Em seguida, as proteínas são submetidas a um processo de eletroforese convencional em gel de



poliacrilamida, no qual as proteínas são separadas em função do peso molecular (2ª dimensão). Posteriormente, os *spots* do gel são excisados, e as proteínas submetidas a uma etapa de digestão por proteases, como a tripsina, os peptídeos gerados são então extraídos do gel e analisados por espectrometria de massas.

Quando o processo de eletroforese 2D faz uso do detergente SDS é denominada de SDS-PAGE (Do inglês “Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis”). Os géis 2D fornecem mapas quantitativos de proteínas intactas, formados pela distribuição diferencial dos *spots*. Essas informações de níveis de concentração proteica possibilitam a realização de experimentos comparativos, como tecido saudável *versus* doença; tratado *versus* não tratados, entre outros. Além disso, a técnica é capaz de estimar a massa e  $P_i$ , separar isoformas proteicas e, em conjunto com dados de MS e/ou métodos especiais de visualização, podem revelar a identidade proteica e modificações pós-translacionais (ROGOWSKA-WRZESINSKA e LE BIHAN 2013).

A facilidade de implementação da eletroforese 2D nos laboratórios de biologia molecular e a simplicidade na obtenção de dados de quantificação proteica, justifica seu uso ainda nos dias atuais. Além disso, esta técnica é útil para algumas aplicações específicas como: sequenciamento *de novo* e identificação de proteínas de organismos, que ainda não dispõe de sequencias genômicas disponíveis e identificação de proteínas modificadas. Estas aplicações foram revisadas recentemente por ROGOWSKA-WRZESINSKA e LE BIHAN (2013).

Com o desenvolvimento de estratégias robustas de separação de proteínas, chamadas de análises de *shotgun*, algumas limitações da eletroforese 2D foram superadas, como a dificuldade de identificar proteínas presentes em baixa frequência analítica se considerarmos o preparo da amostra. Estas análises, baseadas em UPLC (Do inglês “Ultra high Performance Liquid Chromatography”), permitiram a identificação de milhares de proteínas em um único experimento, sendo extensivamente difundidas em abordagens de proteômica. Em seguida, estas análises de *shotgun* foram logo acopladas às estratégias baseadas em gel 2D, na busca da identidade dos *spots*.

De uma maneira geral, análises cromatográficas baseiam-se na separação de proteínas de acordo com sua afinidade química à fase estacionária e/ou às fases móveis. Esta última constituída principalmente por soluções orgânicas que interagem com o analito na coluna cromatográfica. De maneira que quando há um grau elevado de interação entre a fase móvel e a amostra, esta pode ser eluída da fase estacionária e detectada no espectrômetro de massas.

De fato, as estratégias de separação, identificação e de quantificação de proteínas baseadas em análises de *shotgun* ocuparam o espaço dos métodos do gel 2D (MOTOYAMA e YATES 2008). No entanto, as propriedades experimentais inerentes da eletroforese 2D ainda garantem sua utilidade em estudos proteômicos (BRUNORO et al. 2014; FENG et al. 2015; OU et al. 2016).

## 1.4 APLICAÇÕES CLÍNICAS DA PROTEÔMICA

Nos últimos anos, avanços analíticos, sobretudo nos modos de ionização de ESI e MALDI TOF, permitiram a análise estrutural, funcional e de modificações pós-translacionais de milhares de proteínas em um tempo relativamente curto (AEBERSOLD e MANN 2016). Estes fatos fazem da proteômica uma ferramenta útil para buscar biomarcadores de valor clínico significativo. Por conseguinte, tem sido utilizada no desenvolvimento de testes diagnósticos, prognósticos e preditivos de resposta terapêutica em diversas doenças (KONDO e KAWAI 2014; SHIPITSIN et al. 2014; YE et al 2015; NASCIMENTO et al. 2016).

Um levantamento realizado por MAYNE et al. (2016), evidenciou que nos últimos três anos, cerca de 16% dos estudos publicados com a temática de proteômica, tinham como palavra chave o termo “biomarcador”. Diversas áreas da clínica médica já foram exploradas por ferramentas analíticas. DWINOVAN et al. (2016) revelou potenciais alvos terapêuticos para combater as complicações cardiovasculares decorrentes de diabetes Tipo 2, utilizando modelo animal e análises de espectrometria de massas.

O desempenho do MALDI TOF no diagnóstico de doenças, entre elas, nefropatias autoimunes e áquelas causadas por microorganismos tem se tornado cada vez mais comum na literatura (KUZMANOV et al. 2016; CALDERARO et al. 2016). Esta tecnologia já faz parte da rotina de muitos laboratórios americanos e europeus de microbiologia. Fornece um método rápido, confiável, econômico e de fácil manuseio na identificação de

bactérias e de fungos (gênero e espécie). Nestas análises o perfil de MS obtido da amostra biológica é comparado com um banco de dados de referência (DIERIG et al. 2015). Um dos principais sistemas comercializados para este fim é o MALDI Biotyper CA SYSTEM (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), que já dispõe de aprovação do FDA desde 2013, para uso na rotina de identificação de bactérias gram negativas presentes em colônias obtidas da cultura de fluidos humanos.

No câncer, estratégias analíticas têm sido aplicadas tanto em fluidos biológicos quanto em biópsias de pacientes acometidos por diversos tipos tumorais, como gástrico (MOHRI et al. 2016), mama (MILIOLI et al. 2015) e pulmão (KRIEGSMANN et al. 2016), a fim de encontrar proteínas que possam ser indicativas de alterações relacionadas à doença. Em tumores de próstata, nos últimos anos, análises proteômicas levaram à descoberta de mais de 200 biomarcadores proteicos (TONRY et al. 2016). Entre outros achados, WEBBER et al. (2016) detectaram a presença da proteína aldeído desidrogenase (ALDH1A1) em células normais do estroma prostático, sendo níveis reduzidos desta proteína associada com o câncer de próstata. Outro exemplo destes avanços consiste no potencial uso de um painel composto por 12 biomarcadores, evidenciados por métodos de quantificação proteômica, na predição de agressividade tumoral nesta neoplasia (SHIPITSIN et al. 2014).

Estudos de proteômica clássica em CaPe ainda são pouco explorados, contando com apenas duas publicações até o momento. O primeiro trabalho foi publicado por ORNELLAS et al. (2012), no qual os

fragmentos C3 e C4 A/B do sistema complemento foram inversamente correlacionados com a progressão da doença. Para tanto, o grupo realizou uma extração proteica, com auxílio de *beads* magnéticas, no soro de 25 pacientes diagnosticados com CaPe e 36 controles, seguido de identificação por espectrometria de massas (MALDI TOF/TOF).

Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisa identificou um total de 63 proteínas em níveis diferenciais entre 10 tumores penianos HPV positivos e 10 espécimes não tumorais HPV negativos, por meio de análises de gel 1D seguido de espectrometria de massas (ESI-TOF). Embora o estudo tenha identificado diversas proteínas nunca antes relacionadas ao CaPe, não foi possível fazer associações entre as proteínas identificadas e *status* do HPV, pois todas amostras tumorais eram positivas para esta infecção viral (KOIFMAN et al. 2014).

## **1.5 O IMAGEAMENTO MOLECULAR NA ONCOLOGIA**

Embora a abordagem da proteômica clássica, como gel 2D, LC-MS/MS e MALDI-TOF/TOF, permita a identificação de biomarcadores moleculares, não é capaz de refletir a distribuição espacial de uma biomolécula no tecido. Porém, para doenças complexas como o câncer, obter informações da localização celular de uma dada proteína é de extrema relevância (EGGELING et al. 2012). Por exemplo, quando a diminuição nos níveis da E-caderina e aumento nos níveis de Vimentina ocorrem nos blocos tumorais infiltrativos de amostras de CaPe, indicam presença de transição

epitélio-mesênquima e, conseqüentemente, pior prognóstico (WERNECK et al. 2016).

A imunoistoquímica tem sido o principal método de escolha para visualizar os níveis de proteínas nos departamentos de anatomia patológica. Contudo, sua aplicação está limitada à análise de proteínas previamente conhecidas, além da necessidade do uso de anticorpos específicos. Dentre as novas tecnologias de imageamento molecular disponíveis, o MALDI *Imaging* representa um potencial candidato para uso na rotina histopatológica.

O MALDI *Imaging* proporciona a aquisição de dados espectrométricos e distribuição espacial de proteínas diretamente de um tecido intacto, sem a necessidade de reagente alvo-específico (SEELEY e CAPRIOLI 2008). A aplicação da técnica resulta em imagens moleculares (Figura 2). Outra vantagem dessa metodologia é a possibilidade de se encontrar “assinaturas moleculares” da doença, compreendendo de 5 a 20 proteínas ou mais que, juntas, resultam em um padrão diagnóstico/prognóstico robusto (SCHWAMBORN e CAPRIOLI 2010). Dessa forma, imagens de expressões moleculares teciduais podem ser usadas como ferramenta de alta especificidade e sensibilidade para complementar o diagnóstico histopatológico clássico (CHAURAND 2012).

As primeiras imagens moleculares foram geradas ainda nos anos 90 (CAPRIOLI et al. 1997), sendo precedida pelo desenvolvimento do método de ionização MALDI (TANAKA et al. 1988; HILLENKAMP e KARAS 1990). Desde então, o MALDI *Imaging* tem sido aplicado em diversos tecidos

tumorais humanos, incluindo carcinoma renal (OPPENHEIMER et al. 2010), gástrico (MORITA et al. 2010), prostático (CAZARES et al. 2009), ovariano (MEDING et al. 2013) e cerebral (SALPHATI et al. 2016). Na literatura há um único trabalho demonstrando a aplicação do MALDI *Imaging* em tumores penianos, no qual, a tecnologia foi utilizada para comparar regiões tumorais com regiões normais adjacentes em duas amostras de CaPe. Neste estudo, o valor de m/z referente ao peptídeo da proteína S100 foi considerado um dos principais picos diferenciadores (FLATLEY et al. 2015).

A busca de marcadores de valor clínico significativo, por meio do MALDI *Imaging*, normalmente depende de experimentos que combinem localização espacial e identificação de proteínas. Uma vez que a análise direta de proteínas intactas pelo imageamento é limitada a massas abaixo de 25 KDa (CILLERO-PASTOR e HEEREN 2014). Dessa forma, pesquisas científicas têm direcionado esforços para aprimorar procedimentos de digestão *in situ* para a análise de peptídeos pelo imageamento (CRECELIUS et al. 2015). No entanto, não é possível estabelecer um protocolo global que seja eficiente para todos os tipos de amostras (MARTIN-LORENZO et al. 2014).

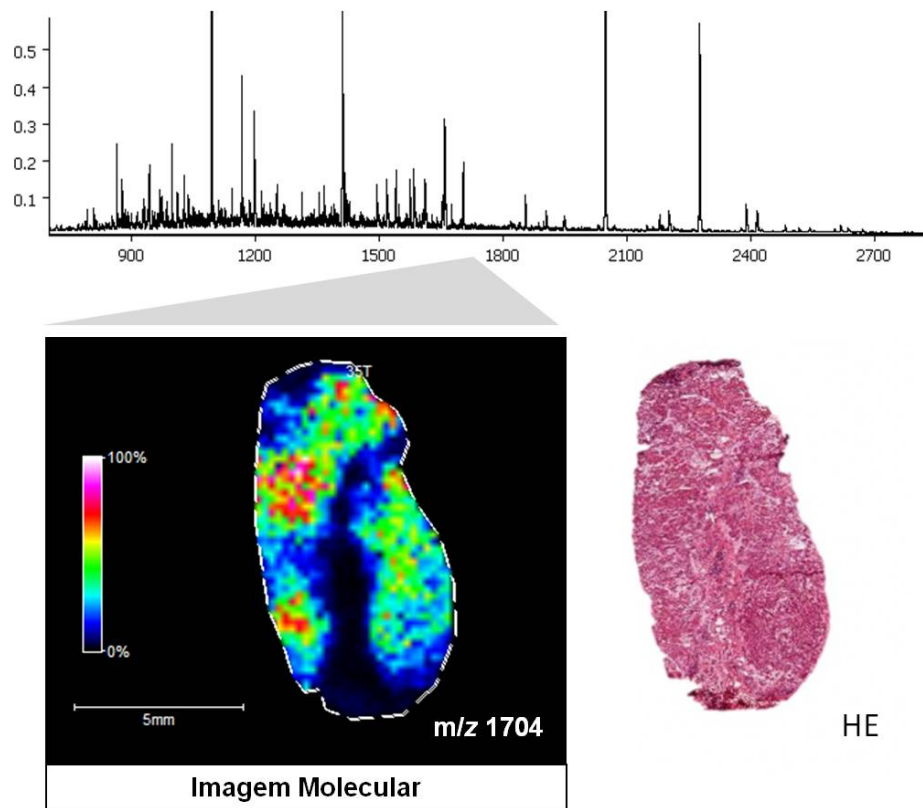
Ainda existe uma discrepância entre a sofisticação na qual as imagens moleculares são geradas, e a habilidade da técnica em identificar as proteínas relacionadas aos valores de m/z. A justificativa mais plausível é a complexidade do tecido devido à presença de inúmeros compostos presentes em um único ponto (co-localizados), prejudicando a identificação confiável dos íons. Por conseguinte, a seleção do íon precursor fica

comprometida, pois pode haver vários valores de  $m/z$  próximas e o perfil de fragmentação pode não ser de um único precursor. Além disso, os íons presentes em baixa concentração sofrem influência dos mais abundantes e, assim, o espectro de fragmentação dos mesmos apresenta baixa relação sinal/ruído afetando a identificação no banco de dados.

Diante destas limitações, técnicas alternativas costumam ser aplicadas em paralelo ao mapeamento dos bioanalitos nos tecidos (LONGUESPÉE et al. 2016). MEDING et al. (2013) estabeleceram um banco de referência de peptídeos trípticos a partir de proteínas extraídas de tecidos parafinados de câncer de ovário, seguido de análises de LC-MS/MS. Posteriormente, combinaram o MS dos peptídeos proteolíticos, detectados pelo imageamento com suas respectivas identidades proteicas.

Muito embora a técnica necessite de aperfeiçoamentos experimentais, o mapeamento diferencial de centenas de compostos direto de uma secção tecidual é atualmente a ilustração mais relevante da associação entre a histologia “clássica” e a “molecular” (LONGUESPÉE et al 2014a).





**Figura 2** - Imagem molecular gerada a partir da aplicação da tecnologia do MALDI *Imaging*. Espectros de massas adquiridos de uma secção tecidual de Carcinoma Peniano. O íon  $m/z$  1704 refere-se a um dos peptídeos da amostra, obtidos após uma digestão *in situ* trípica. HE- Coloração de Hematoxilina e Eosina.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O presente projeto teve como principal objetivo utilizar métodos de proteômica clássica e de imageamento molecular para obter padrões diferenciais de proteínas, a fim de auxiliar na compreensão dos aspectos moleculares do CaPe e na busca de possíveis marcadores com valor clínico significativo para a doença.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o *status* do HPV em amostras congeladas de carcinomas epidermoides penianos usuais, e espécimes normais, por meio de uma genotipagem.
- Identificar proteínas com níveis diferenciais nos tumores penianos, com e sem associação ao HPV, bem como no grupo controle, por meio de análises proteômica convencional (Eletroforese 2D, LC-MS/MS e MALDI TOF/TOF).
- Utilizar ferramentas de bioinformática para avaliar as interações proteína-proteína, a fim de estabelecer alvos para a análise *in situ* por MALDI *Imaging*.

- Aplicar a tecnologia do MALDI *Imaging* na avaliação exploratória de peptídeos nos tumores penianos e controles.
- Adquirir dados de MS/MS dos alvos pré-determinados por meio de análises de MALDI TOF/TOF.
- Integrar os dados da proteômica convencional com o MALDI *Imaging*, para analisar a distribuição espacial dos peptídeos alvo, seguido da associação com os parâmetros clinicopatológicos.
- Confirmar *in silico* a identidade proteica dos alvos peptídicos.
- Realizar uma análise multivariada, não supervisionada, para obter *clusters* relacionados com as regiões tumorais e adjacentes normais dos tecidos, baseado nos valores diferenciais de m/z, correlacionando-os posteriormente com dados de identificação proteica.
- Validar, por imunistoquímica, o alvo proteico que demonstrar melhor potencial de biomarcador da doença, de acordo com as análises de proteômica.
- Avaliar a influência da imunoreatividade deste alvo na sobrevida, e na predição de metástases em linfonodos, a fim de evidenciar sua utilidade como marcador prognóstico em pacientes acometidos pelo CaPe.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 CASUÍSTICA**

Trata-se de um estudo retrospectivo, composto por dois grupos distintos de amostras: um grupo de tecidos congelados e um grupo de tecidos parafinados. Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do A.C.Camargo Cancer Center sob o número 1369/10E (Anexo 3).

O grupo de tecidos congelados foi composto por 45 amostras de carcinoma epidermoide de pênis (CEP), tipo usual, e 10 amostras de Epitélio Normal Peniano (ENP), sendo sete margens adjacentes livres de neoplasia e três prepúcios não neoplásicos, estes últimos obtidos de tecidos de pacientes submetidos à cirurgia de circuncisão. Estas amostras foram oriundas de pacientes tratados em nossa instituição e também de outras oito instituições médicas no país (Tabela 1). As amostras biológicas foram coletadas, armazenadas e transportadas de acordo com procedimentos operacionais padrão do BioBanco de tumores do A.C.Camargo Cancer Center (Anexo 4).

**Tabela 1** - Número de amostras de tumores penianos processadas no estudo por instituição.

<b>Responsável</b>	<b>Centro Colaborador</b>	<b>Número de casos de CaPe</b>
Antônio Hugo J.F.M Campos	AC Camargo Cancer Center (SP)	9
Giuliano Amorim Aita	Ass. Piauiense de Combate ao Câncer – Teresina (PI)	13
Carlos Evaristo Metello	Hosp. de Câncer do Mato Grosso – Cuiabá (MT)	7
José Hipólito Dantas	Hosp. Univer. Onofre Lopes –Natal – (RN)	2
Leonardo O. Reis	PUCCAMP – Campinas (SP)	2
Marcos Tobias Machado	Hospital Anchieta – Santo André (SP)	2
Adriano Augusto P.de Paula	Hospital Araujo Jorge - Goiânia – GO	7
Eloísio Alexandro da Silva	Hospital Universitário Pedro Ernesto – (RJ)	2
Lucas Batista	Hospital Profº Edgar Santos - Salvador (BA)	1
<b>TOTAL</b>		<b>45</b>

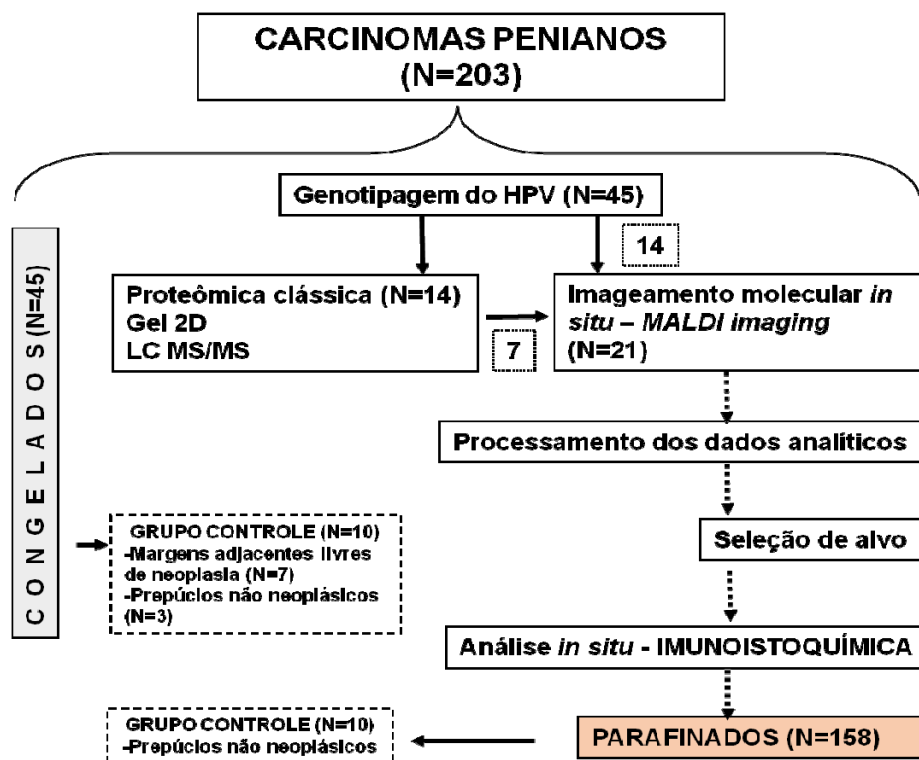
CaPe-Carcinoma Peniano

A genotipagem do HPV foi realizada em todo grupo de tecidos congelados (N=55). As primeiras 14 amostras tumorais recebidas e armazenadas no BioBanco de tumores da instituição foram utilizadas nas análises de proteômica convencional. Em sete destes casos, mais outros 14 (N=21), foram conduzidas as análises de MALDI *Imaging*. Tal situação foi gerada pelo esgotamento de oito amostras durante a etapa de eletroforese 2D. O motivo da utilização de apenas 28 amostras de CEP congeladas nas análises proteômicas, de um total de 45 disponíveis, se justifica pelo atraso no recebimento de parte das amostras e pelo prazo habitualmente concedido ao trabalho de doutorado.

Os espécimes normais congelados (N=10) foram comuns a todas as análises deste estudo, exceto a validação por imunistoquímica. Esta foi realizada em 158 amostras de CaPe, cujos blocos de parafina encontravam-

se disponíveis nos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do AC Camargo Cancer Center. Estes casos foram retrospectivamente selecionados e incluídos em um *Tissue Microarray* (TMA). Estas amostras, juntamente com 10 amostras de prepúcio normais, emblocadas em parafina, constituíram o grupo de tecidos parafinados do estudo. Vale ressaltar que os prepúcios não-neoplásicos correspondem a amostras colhidas com anuência do Comitê de Ética da Instituição, bem como dos pacientes, que assinaram termos de consentimento informado.

Um fluxograma contendo a casuística utilizada em cada etapa do projeto pode ser observado na Figura 3. O detalhe da utilização de cada amostra de CaPe por ensaio experimental do estudo encontra-se no Anexo 5.



**Figura 3** - Fluxograma da casuística utilizada no estudo.

### **3.1.1 Critérios de inclusão e de exclusão**

Foi utilizado como critério de inclusão o diagnóstico de carcinoma do pênis, tendo sido o paciente submetido a tratamento cirúrgico do tumor primário e a linfadenectomia regional, uni ou bilateral, em qualquer momento do seu seguimento. Foram excluídos casos sem informações clinicopatológicas adequadas para a análise e pacientes que tenham realizado tratamento adjuvante ou neo-adjuvante.

## **3.2 GENOTIPAGEM DO HPV**

Um total de 45 amostras de CEP e 10 espécimes normais congeladas tiveram material gênico extraído (fenol/clorofórmio) e foram avaliadas qualitativamente quanto à presença de subtipos de HPV. Para tanto, foi utilizado o kit *LINEAR ARRAY HPV Genotyping Test* (Roche®), seguindo as recomendações de WOO et al. (2007) para uso em tecidos congelados. Trata-se de um teste *in vitro* para detecção de 37 genótipos de DNA viral por meio da amplificação do DNA alvo por Reação em Cadeia de Polimerase seguido de hibridização do ácido nucleico.

## **3.3 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL**

### **3.3.1 Extração de proteínas e quantificação**

Para extração proteica, 50 cortes (10 µm de espessura), de cada tecido (10 amostras de ENP e 14 de CaPe) foram realizados em criostato.

Em seguida, as secções teciduais foram colocadas em um tubo de 2,0 mL com *beads* de cerâmica (Precellys®) e ressuspenso em 500 µL de solução de extração proteica: Ureia 7 M; Tiourea 2 M; CHAPS 2%; Triton X-100 3%, DTT 100 mM e inibidores de proteases 1X (Complete, Roche, Germany). Em seguida, o tecido seccionado foi processado no homogeneizador de tecidos *Precellys®24* (Bertin technology, France). Posteriormente, a amostra foi centrifugada à 4 °C, 14.000 rpm, durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubo estéril e armazenado a -80°C. A quantificação das proteínas foi realizada com o kit 2-D Quanti (GE Healthcare, Germany), seguindo as instruções do fabricante.

Após quantificação, a qualidade das proteínas extraídas foi verificada por eletroforese em gel de poliacrilamida. Sendo utilizados 50 µg de proteínas totais de cada amostra. Para a corrida utilizou-se tampão Laemmli (Tris 25 mM, Glicina 192 mM e SDS 0,1%), seguindo os seguintes parâmetros: voltagem fixa de 56 V, durante o *stacking* à 5% p/v de acrilamida e 105 V, para percorrer a extensão seguinte do gel (10% p/v de acrilamida). Após o término da corrida o gel foi corado em solução de *Coomassie™ brilliant blue G-250* (8% sulfato de amônio, 0,8% de ácido fosfórico, 0,08% *coomassie blue G-250* e 20% de metanol) durante 40 minutos. Em seguida, foram descorados com solução de metanol 20% e ácido acético glacial 5%, por 15 minutos, tal procedimento foi repetido três vezes. A imagem do gel foi adquirida por meio do fotodocumentador Alphamager ® (*ProteinSimple* ©, USA). Apenas quando bandas visíveis apareciam no gel 1D, as amostras seguiam para a etapa de focalização isoeletrica.



### 3.3.2 Primeira dimensão

Um total de 1,5 mg de proteína foram utilizadas por amostra para a triplicata do gel, sendo 500 µg por gel. Cada tira de gradiente de pH 3-11 NL imobilizado (IPG™) foi imersa em solução de reidratação (Ureia 7 M; Tioureia 2 M; CHAPS 2%; azul de bromofenol, *IPG Buffer* 0,5% e *DeaStreak Rehydration Solution* (GE Healthcare, Germany) acrescida de 500 µg da amostra, de modo que os volumes finais atingissem 340 µL. Após reidratação passiva por 12 h, as fitas foram submetidas a uma focalização isoeétrica em sistema *EttanIPGphorlsoelectric Focusing* (GE Healthcare, Germany). Para a realização da corrida eletroforética de segunda dimensão, as fitas foram reduzidas em 10 mL de solução de equilíbrio (Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, ureia 6 M, glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol) acrescida de 100 mg de dithiothreitol (DTT). As fitas permaneceram imersas nesta solução por 15 min sob agitação. Em seguida, realizou-se a alquilação na mesma solução de equilíbrio contendo 250 mg de iodoacetamida (IAA) por mais 15 minutos.

### 3.3.3 Segunda Dimensão

Esta etapa foi realizada em gel de 12,5% de policacrilamida com 1,5 mm de espessura usando-se o sistema de eletroforese vertical modelo Ettan DALT six (GE Healthcare, Germany). Os géis foram fixados em solução de metanol 10% e ácido acético glacial 7,5%, durante 3h. Posteriormente, foi realizada a coloração em solução de *Coomassie™ brilliant blue G-250* por 48 horas sob agitação à temperatura ambiente. Para a retirada do excesso de

corante, os géis foram descorados com solução de metanol 20% e ácido acético glacial 5%, e mantido sem solução de 5% de ácido acético a 4°C, até a análise das imagens. A digitalização das imagens dos géis foi feita com auxílio de um *scanner* modelo UTA-1100, por meio do programa LabScan versão 5.0 (GE Healthcare, Germany). Em seguida, com auxílio do *software* Image Master 2D Platinum 7software (GE Healthcare, Germany), os spots foram detectados automaticamente e comparados estatisticamente em função dos grupos do estudos (Normal *versus* Tumor; CaPe HPV+ *versus* CaPe HPV-). Foi adotado foi nível de significância de 5% (ANOVA). Um total de 100 “spots” diferenciais, sendo 50 entre tumores e normais e os outros 50 entre CaPe HPV + e HPV-, entre foram excisados dos géis e submetidos à uma etapa de digestão triptica.

#### **3.3.4 Digestão *in gel***

O protocolo de digestão *in gel* utilizado foi desenvolvido por SHEVCHENKO et al. (1996) com modificações. Este é o mesmo preconizado pela *facility* de espectrometria de massas do LnBio. Os procedimentos incluíram a excisão dos spots dos géis, que foi realizada com auxílio de pipetas e ponteiras especiais; duas lavagens repetitivas em Metanol 50% / de ácido acético 2,5%; redução (DTT 10mM); alquilação (Iodocetamida 50mM) de cisteínas; lavagens em 0.1M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>; desidratação em Acetonitrila (ACN) 100% v/v e tripsinização overnight à 37°C (20ng/μL). A digestão foi interrompida adicionando 30uL de ácido fórmico 5% em cada microtubo. O sobrenadante foi transferido para um

novo microtubo. E os peptídeos remanescentes do gel foram extraídos utilizando solução de Ácido fórmico 5% em ACN 50%. A amostra foi completamente concentrada em *speedvacuum* (Labconco, EUA), à 45 °C. Em seguida, os peptídeos foram armazenados em freezer -20° C até as análises espectrométricas.

### 3.4 LC-MS/MS

Os peptídeos foram separados por uma coluna de C18 (100 mm6100 mm) em sistema de RP-nanoUPLC (nanoAcquity, Waters®) acoplado ao espectrômetro de massa Q-TOF Premier (Waters®) com fonte nanoeletrospray e *flow rate* de 0.6 ml/min. O gradiente variou de 2-90% de acetonitrila em 0.1% de ácido fórmico por 10 min. O nanoeletrospray operou em modo “top three”, onde o espectro de MS foi adquirido seguido por MS/MS dos três íons mais intensos foram selecionados. Após a fragmentação de MS/MS, o íon foi acrescido à uma lista de exclusão por 60s e para análise de clivagens endógenas dos peptídeos, foi utilizada uma exclusão em tempo real. A aquisição dos espectros foi realizada com o auxílio do software MassLynx 4.1 e os dados convertidos em formato peaklist (mgf). Para identificação das proteínas foi utilizado o banco de dados HumanUniprot\_012015 (sequência 89706, resíduos 35609686; *release* 701,2015), por meio da plataforma Mascot engine v.2.3.01 (Matrix Science Ltd), com modificação fixa Carbamidometil, modificação variável oxidação da metionina, enzima tripsina (1 *missed cleavage*) e tolerância de

0,1Da tanto para o íon precursor como fragmentos. Foi considerado apenas valores de FDR ( Do inglês “ False Discovery Rate”) iguais ou menores que 4%.

### **3.5 INTERAÇÕES PROTEICAS POR BIOINFORMÁTICA**

Neste período, os dados obtidos pelas análises de *shotgun* foram processados por ferramentas de bioinformática mais robustas. Após as comparações entre tumores versus espécimes normais e *status* do HPV, um grupo de proteínas significativas foi submetida a análise de enriquecimento utilizando o software *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA, QIAGEN Redwood City). Posteriormente, vias de sinalização celular com interesse clínico significativo ( $P < 0,05$ ) foram selecionadas para construção de redes de interações proteína-proteína com auxílio do banco de dados *Interologous Interaction* (I2D) and *NAVIGATOR* (SAVAS et al. 2009; BROWN et al. 2009).

### **3.6 ANÁLISE *IN SITU* DE PEPTÍDEOS POR MALDI *IMAGING***

A avaliação dos mapas de interações proteicas nos indicou diversas proteínas com potencial clínico significativo para o CaPe. Dentro deste grupo, quatro proteínas foram selecionadas para as análises *in situ* por imageamento, levando-se em consideração a elevada concentração apresentada por estas proteínas no gel 2D e relevância clínica. Os spots das proteínas alvos foram submetidos a uma etapa de digestão in gel de acordo

com o protocolo já estabelecido no período anterior. Para as análises de MALDI TOF/TOF, os peptídeos foram ressuspensos em 1  $\mu$ L de solução aquosa contendo 0,1% de ácido Trifluoroacético, sendo homogeneizados com auxílio de mini centrífuga. A matriz utilizada foi o ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (10 mg/mL em 50% ACN e 1% de TFA). Matriz e amostras foram homogeneizadas na proporção 3:1, matriz: analito, sendo depositados 2  $\mu$ L desta mistura na placa MTP 384 *Groundsteel* (Bruker®). Após cristalização da matriz, a placa foi introduzida no equipamento AutoFlex MALDI TOF/TOF (Bruker ®). A calibração foi feita externamente utilizando uma mistura de peptídeos de massa molecular conhecida na faixa de 700 a 3500 Da. As análises de MS foram conduzidas utilizando-se o método positivo em modo reflectivo. Posteriormente três ions que apresentaram elevada intensidade foram selecionados manualmente, e submetidos à fragmentação (análises de MS/MS) por meio de um método de LIFT™ positivo. Os espectros adquiridos de MS e a combinação MS e MS/MS de cada spots foram analisados no software FlexAnalysis e Biotools tanto por *peptide mass fingerprint* (PMF) quanto *MS/MS ion search*. A plataforma MASCOT foi utilizada para comparar os dados adquiridos com o banco de dados SwissProt, seguindo os seguintes parâmetros: enzima tripsina, carga peptídica +1, +2, e +3, tolerância de massa 0,3 Da, tolerância MS/MS 0,6 Da e instrumento MALDI TOF/TOF. Os dados de MS/MS adquiridos foram exportados em formato *mgf* e em seguida processados no software *ProteinScape* (Bruker ®), gerando um arquivo *\*xls* contendo os dados

espectrais dos peptídeos correspondentes à proteína previamente identificada.

Para adquirir os dados de distribuição espacial dos peptídeos, secções teciduais foram depositadas em lâminas ITO (10 $\mu$ m). Estas foram submetidas a uma etapa de digestão *in situ*, com pulverização de 200 $\mu$ L de uma solução de tripsina (100ng/ $\mu$ L) utilizando o ImagePrep<sup>TM</sup>. Em seguida, houve incubação em estufa 37°C por 1,5h sob 100% de humidade. Após a digestão, uma solução de matriz de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (7 mg/mL em 50% ACN e 1% de ATF) foi sonicada por 30 min e pulverizada nas lâminas com auxílio do ImagePrep<sup>TM</sup>. A aquisição dos dados espectrométricos foi conduzida no Autoflex MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics®), com calibração externa, mistura de peptídeos de 700-3500Da, e laser SmartBeam operando em modo reflectivo num intervalo de 100-3000 m/z. O método analítico para estas análises foi otimizado, com intensidade variando de 40 a 60%, supressão de sinal da matriz a partir de 500 Da, acúmulo 900 disparos do laser para cada pixel e resolução de 200 $\mu$ m. Além da obtenção de SNAPs que serão utilizados no momento de importação dos filtros identificadores de proteínas pelo software *ImageID*.

Finalmente, os arquivos *\*xls* e *\*mis*, este último obtido do imageamento molecular de peptídeos, foram então compilados no software *ImageID*, sendo gerados filtros de identidade proteica.

## 3.7 PROCESSAMENTO DOS DADOS ANALÍTICOS

### 3.7.1 Co-localização de peptídeos trípticos teóricos

A identidade proteica dos filtros obtidos pela etapa de análise *in situ* por imageamento foi confirmada *in silico* por meio da co-localização de peptídeos teóricos dos alvos proteicos nas secções teciduais. De modo que os peptídeos teóricos deveriam apresentar distribuição espacial semelhante ao peptídeo experimental para que houvesse uma confirmação. Para tanto, a ferramenta “*Finding Co-localized m/z values*” do software SCiLS lab versão 2014b (SCiLS, Bremen, Alemanha) foi utilizada para gerar imagens moleculares dos picos co-localizados com os valores de m/z referente aos peptídeos elucidados pela digestão tríptica de cada proteína alvo. A sequência teórica de cada proteína alvo foi obtida por meio do banco de dados *Universal Protein Resource* (UniProt), sendo exportada em formato FASTA e processada no software *Sequence editor* (Bruker®). A digestão teórica foi realizada de acordo com os seguintes parâmetros: enzima tripsina, íon positivo mono, 0,3 de erro MS, 0,6 de MS/MS erro, faixa de 700-3500 Da e limite de duas clivagens parciais. Em seguida, a lista de picos co-localizados foi inspecionada manualmente, e comparada à lista de valores de m/z obtida da digestão teórica de cada proteína. Sendo caracterizados como picos co-localizados àqueles que apresentaram pelo menos 80% de concordância entre a distribuição espacial dos íons experimentais (peptídeos trípticos alvos) e os teóricos. As imagens moleculares foram visualizadas no

software SCiLS Lab 2D com remoção automática de *hotspots* e *very strong denoising*.

### **3.7.2 Correlações clinicopatológicas**

Inicialmente, dados foram processados por meio do método TIC (Do inglês “Total Ion Count”), que normaliza cada espectro individualmente, dividindo cada intensidade espectral pelo somatório de todas as intensidades. Em seguida, regiões representativas dos tumores e do epitélio normal peniano foram delimitadas por um patologista (J.V.), no software FlexImaging (Bruker®), com auxílio do co-registro de HE. As intensidades de sinal dos valores de  $m/z$  alvos apresentadas por estas regiões foram exportadas e comparadas estatisticamente em função das variáveis clinicopatológicas. Para tanto, o teste não paramétrico U de *Mann Whitney* foi aplicado com auxílio do software SPSS versão 23, sendo adotado o nível de 5% de significância. As variáveis independentes, grau histológico e sítio anatômico, não foram utilizados nesta análise. Pois alguns subgrupos eram formados por N inferior a cinco pacientes, fato que comprometeria o poder do teste estatístico.

### **3.7.3 Análise multivariada não supervisionada**

Todo o processamento de dados de imagem, incluindo estas análises estatísticas, foram realizadas por meio do software SCiLS lab versão 2014b (SCiLS, Bremen, Alemanha). As etapas de pré-processamento, incluíram remoção de linha de base, (por método *TopHat*, no qual o espectro médio foi



recalculado partir da linha de base corrigida) e também normalização TIC. Para detectar o conjunto de picos com informações relevantes utilizamos a ferramenta “Finding Peaks” por meio do método *orthogonal matching pursuit* e estimativa automática do valor de sigma. Basicamente, o método detecta o conjunto representativo de valores de m/z modelando cada espectro em função gaussiana. Utilizando-se a ferramenta *aligning peaks*, os picos foram alinhados em direção aos valores máximos centrais de cada intervalo de valores de m/z, a fim de prevenir a seleção redundante de vários valores de m/z para um mesmo pico.

Os dados pré-processados e a lista de picos alinhados de cada amostra foram submetidos ao *pipeline* “Spatial denoising and segmentation” individualmente. Este fluxo permite que a variação pixel a pixel seja suprimida, aprimorando a visualização das imagens moleculares (*Spatial denoising*). Em seguida, os dados são agrupados estatisticamente, baseando-se em suas diferenças (método *Bisecting k-means*) e formando um dendograma, cujos *clusters* podem ser visualizados interativamente no *software*. Os *clusters* obtidos foram inspecionados manualmente, e, com auxílio das imagens histológicas, sub-regiões que coincidiram com regiões tumorais e regiões adjacentes normais foram selecionadas. Em seguida, uma análise de correlação foi realizada para detectar valores de m/z co-localizados com os *clusters* evidenciados pelo mapa de segmentação. Foram consideradas apenas correlações estatisticamente significativas (Pearson,  $p < 0,05$ ). Em seguida, o intervalo de picos que apresentou os maiores índices de correlação, com as regiões tumorais, foi utilizado para

análises de PCA (Do inglês “Principal Component Analysis”). Adicionalmente, os principais picos discriminatórios entre as regiões tumorais e tecidos adjacentes normais, foram avaliados por meio da curva ROC (Do inglês “Receiver Operating Characteristic”). Sendo considerados como diferenciador perfeito, valores de AUC (Do inglês “Area Under the Curve”) maiores que 0,85. Finalmente, a distribuição espacial dos valores de m/z referentes aos peptídicos alvo nas regiões segmentadas também foram avaliados por meio de imagens moleculares.

### **3.8 VALIDAÇÃO POR IMUNOISTOQUÍMICA**

Para elaboração do *Tissue Microarray* (TMA), um total de 158 casos de CaPe foram selecionados retrospectivamente do arquivo de tecidos parafinados do Departamento de Anatomia Patológica do AC Camargo Cancer. As amostras foram inicialmente analisadas histopatologicamente, em lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina (HeE), para marcação de área representativa do tumor. Os blocos receptores de parafina TMA (Beecher Instruments, Silver Springe, MD, USA), foram elaborados a partir de amostras colhidas dos blocos doadores originais, com agulha de um milímetro de diâmetro (TM Arrayer punch MP10-1,0 mm), com 0,5 mm de distância entre os spots. Os *punches* foram realizados em duplicata (dois *spots* para cada caso), perfazendo um total de 316 *spots*, que foram divididos em dois blocos de TMA.

Uma secção de 5 µm de cada bloco de TMA foi obtida com auxílio de micrótomo, sendo fixados em lâminas StarFrost®, em banho maria. As lâminas ficaram em estufa à 60 °C, *overnight*, e, após este intervalo, foram submetidas a uma bateria de desparafinização (três banhos de xilol de 5 min cada, seguido de quatro banhos em álcool absoluto), e finalmente lavadas em água corrente deionizada. A recuperação antigênica foi realizada em panela de pressão, por 15 min. em tampão de citrato 10 mM, valor de pH 6,0. A partir desta etapa, os procedimentos aplicados nas lâminas foram os mesmos, tanto para os tecidos congelados quanto parafinados. Em seguida foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena, por excesso de substrato por meio de três lavagens em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, seguido de lavagem em água deionizada corrente, sendo cada lavagem de 5min. Enquanto que para o bloqueio das proteínas inespecíficas foi utilizado 100µL do ProteinBlock Dako® para cada lâmina, com incubação em câmara úmida por 20min. O anticorpo monoclonal de camundongos anti-calreticulina, foi incubado *overnight* em câmara úmida a 4 °C. O clone e titulação do anticorpo encontram-se na Tabela 2. Após três lavagens de 5min em tampão PBS (0,01 M, pH 7.4), os tecidos foram submetidos à uma etapa de incubação do anticorpo secundário utilizando-se o sistema de polímeros, 30min com o *Advance Link* (Dako®) e 30min com o *Advance Enzyme* (Dako®). Após lavagens em tampão PBS (0,01 M, pH 7.4), a marcação foi revelada com o corante DAB (1:50) por no máximo 5min, seguido de água deionizada corrente por outros 5 min. A contra coloração foi realizada em hematoxilina por 2 min. Após lavagens em água deionizada corrente, as

secções teciduais foram desidratadas em banhos sucessivos de etanol absoluto e xilol. Finalmente a lâmina foi montada utilizando-se lamínula e o Entelan (Merck®). As fotomicrografias foram adquiridas a partir da digitalização das lâminas no equipamento Aperio®, seguido de visualização no software ScanScope®.

A imunoreatividade foi avaliada com auxílio de microscopia ótica com aumento de 400x, utilizando o índice **Hscore**, este é baseado no percentual e intensidade de células marcadas.

$$\text{Hscore} = (0 \times \% \text{ de células negativas}) + (1 \times \% \text{ de células positivas } 1+/\text{leve}) + (2 \times \% \text{ de células positivas } 2+/\text{moderada}) + (3 \times \% \text{ de células positivas } 3+/\text{intensa})$$

Dessa forma os valores de Hscore podem variar de 0 (marcação nula, 100% das células x 0) até 300 (máximo de células marcadas, 100% das células x 3). Para as amostras controles, a coloração acastanhada localizada na lâmina basal do epitélio foi desconsiderada, por se tratar apenas da melanina, pigmentação naturalmente presente no tecido. Na avaliação dos TMAs, com a representação em duplicata, o valor final considerado foi a média aritmética simples de cada um dos valores individuais válidos.

**Tabela 2** - Caracterização do anticorpo utilizado nas análises de imunohistoquímica.

<b>Anticorpo Primário</b>	<b>Clone</b>	<b>Fornecedor</b>	<b>Titulação</b>	<b>Recuperação Antigênica</b>
Calreticulina	FMC 75	Abcam (Cambridge, UK)	1:1000	Citrato, pH 6,0

### 3.8.1 Análise estatística

Inicialmente foi realizada a estatística descritiva dos dados clinicopatológicos de todos os casos. Nas amostras congeladas, o teste U de Mann-Whitney foi aplicado para comparar o nível de Calreticulina, entre os grupos controle e tumor, e também entre tumores penianos HPV positivo e negativo. A associação entre a imunoreatividade desta proteína com o status do HPV foi avaliada pelo teste do Qui-quadrado ou Exato de Fisher. A partir dos dados de seguimento foi possível realizar análises de sobrevivência. O tempo de sobrevida global foi caracterizada como o tempo transcorrido entre a cirurgia primária e a última consulta ou morte. Enquanto que para a sobrevida câncer específica utilizou-se o tempo transcorrido entre a cirurgia primária e a última consulta ou morte por câncer. Inicialmente, estimou-se um ponto de corte com auxílio da técnica da maximização da estatística Log-Rank padronizada (LAUSEN e SCHUMACHER 1992). Este ponto de corte é caracterizado como o valor do índice Hscore ótimo para discriminar dois grupos de pacientes em relação à sobrevivência. Análises de regressão de Cox simples foram utilizadas para avaliar a influência dos parâmetros clínicos e imunoreatividade da Calreticulina na sobrevida câncer específica e global. Consideramos como variáveis independentes o grau histológico, invasão vascular, invasão

perineural, estadiamento clínico, metástases em linfonodos e índices Hscore estimados. Um modelo de regressão de Cox múltiplo também foi ajustado aos dados, para avaliar concomitantemente a influência das mesmas variáveis na sobrevida câncer específica e global dos pacientes. Para avaliar o potencial da proteína Calreticulina na predição de presença de metástase em linfonodos, utilizamos um modelo de regressão logística simples, no qual, os dados contínuos do Hscore da proteína foram processados em função do status linfonodal. Adicionalmente, as variáveis relacionadas ao Hscore também foram ajustadas neste modelo. Os testes estatísticos foram realizados no software SPSS versão 23 e software R versão 3.3.0, sendo adotado o nível de 5% de significância.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 DADOS CLÍNICOS E GENOTIPAGEM DO HPV

Os dados demográficos e clinicopatológicos, das amostras congeladas, utilizadas nas análises de proteômica estão dispostos nas Tabelas 3 e 4. Na Tabela 3 constam os casos utilizados para o gel 2D e na Tabela 4 para MALDI *Imaging*. Deve-se notar que parte dos casos são comuns às duas técnicas e, portanto, comuns às duas Tabelas (n= 7 amostras). Na Tabela 5 é possível observar as características clínicas dos 158 casos de CaPe incluídos no TMA e utilizadas na etapa de validação imunohistoquímica. Neste grupo não foi possível avaliar o *status* do HPV.

O percentual de casos de CEP associados ao HPV, inclusos nas análises de proteômica clássica e de Imageamento, foi de 50% e 60%, respectivamente. Não houve associação significativa entre o *status* do HPV e os demais parâmetros clínicos no grupo de tecidos congelados ( $P>0,05$ ; teste exato de Fisher). Levando-se em consideração todas as amostras tumorais congeladas (N=45), a detecção do HPV foi evidenciada em 29 amostras (64%), sendo os genótipos de alto risco os mais prevalentes. Enquanto que no grupo controle, todas os espécimes normais, com exceção de uma amostra de prepúcio não neoplásico, foram positivas para genótipos de alto risco do HPV (Tabela 6).

**Tabela 3** - Caracterização histopatológica dos tecidos congelados de Carcinoma Epidermoide Peniano, tipo usual, utilizados na etapa de eletroforese 2D (N=14).

<b>Parâmetro</b>		<b>Número</b>	<b>Percentual</b>
<b>Idade, anos (mediana 54)</b>	≥45	9	64
	<45	4	29
	Sem informações	1	7
<b>Sítio anatômico</b>	Prepúcio	1	7
	Glande	5	36
	Corpo	2	14
	Uretra	0	0
	Múltiplos sítios	5	36
	Sem informações	1	7
<b>Grau Histológico</b>	Bem diferenciado	8	56
	Moderadamente diferenciado	3	21
	Pouco diferenciado	3	21
<b>Estadiamento T</b>	Tx	2	14
	T0	0	0
	Ta	0	0
	T1a	0	0
	T1b	0	0
	T2	6	43
	T3	5	36
	T4	1	7
<b>Metástase em Linfonodo</b>	Presente	7	50
	Ausente	5	36
	Sem informações	2	14
<b>Estadiamento clínico Final</b>	0	0	0
	I	0	0
	II	5	36
	IIIa	3	21
	IIIb	3	21
	IV	1	7
	Sem informações	2	14
<b>Status HPV*</b>	Positivo (alto risco)	7	50
	Negativo	7	50

\*Não houve diferença significativa entre o status do HPV e os demais parâmetros clínicopatológicos ( $P > 0.05$ , teste Exato de Fisher).



**Tabela 4** - Caracterização histopatológica dos tecidos congelados de Carcinoma Epidermoide Peniano, tipo usual, utilizados nos experimentos de imageamento molecular por espectrometria de massas (N=21).

<b>Parâmetro</b>		<b>Número</b>	<b>Percentual</b>	
<b>Idade, anos (mediana 53)</b>	≥45	16	76	
	<45	5	24	
	Sem informações	0	0	
<b>Sítio anatômico</b>	Prepúcio	1	5	
	Glande	7	33	
	Corpo	2	9	
	Uretra	1	5	
	Múltiplos sítios	10	48	
	Sem informações	0	0	
<b>Grau Histológico</b>	Bem diferenciado	10	48	
	Moderadamente diferenciado	9	43	
	Pouco diferenciado	2	9	
<b>Estadiamento T</b>	Tx	0	0	
	T0	0	0	
	Ta	0	0	
	T1a	2	9	
	T1b	0	0	
	T2	10	48	
	T3	9	43	
	T4	0	0	
<b>Metástase em Linfonodo</b>	Presente	12	58	
	Ausente	7	33	
	Sem informações	2	9	
<b>Estadiamento clínico Final</b>	0	0	0	
	I	2	9	
	II	7	33	
	IIIa	2	9	
	IIIb	10	48	
	IV	0	0	
	Sem informações	0	0	
	<b>Status HPV*</b>	Positivo (alto risco)	13	62
		Negativo	8	38

\*Não houve diferença significativa entre o status do HPV e os demais parâmetros clínicopatológicos ( $P > 0.05$ , teste Exato de Fisher).

**Tabela 5** - Caracterização histopatológica das 158 amostras de Carcinoma Peniano incluídas no *Tissue Microarray* (TMA) utilizado na etapa de validação por imunohistoquímica.

<b>Parâmetro</b>		<b>Número</b>	<b>Percentual</b>
<b>Idade, anos (mediana,54)</b>	≥45	123	78
	<45	35	22
<b>Histologia</b>	Epidermoide (Usual)	118	75
	Outras variantes	40	25
<b>Estadiamento T</b>	Tx	16	10
	T0	1	1
	Tis	25	16
	Ta	5	3
	T1a	79	50
	T1b	31	19
	T2	1	1
	T3	0	0
	T4	0	0
	<b>Grau Histológico</b>	Bem diferenciado	49
Moderadamente diferenciado		47	30
Pouco diferenciado		62	39
<b>Invasão do corpo esponjoso</b>	Presente	91	58
	Ausente	43	27
	Sem informações	24	15
<b>Invasão do corpo cavernoso</b>	Presente	74	47
	Ausente	50	32
	Sem informações	34	21
<b>Infiltração da uretra</b>	Presente	5	3
	Ausente	125	79
	Sem informações	28	18
<b>Invasão Perineural</b>	Presente	39	25
	Ausente	112	71
	Sem informações	7	4
<b>Invasão Vascular</b>	Presente	32	20
	Ausente	119	76
	Sem informações	7	4
<b>Metástase em Linfonodo</b>	Presente	41	26
	Ausente	117	74
<b>Estadiamento clínico final</b>	0	29	18
	I	61	39
	II	23	15
	IIIa	19	12
	IIIb	7	4
	IV	0	0
	Sem informações	19	12

**Tabela 6** - Resultados da detecção e tipagem do HPV por meio do kit *LINEAR ARRAY HPV Genotyping Test* (Roche®). Em 45 amostras congeladas de carcinomas epidermóides de pênis, tipo usual, e 10 controles.

Amostra	ID	Centro colaborador	Genótipos HPV	
			Alto Risco	Baixo Risco
1	CEP	APCC – Teresina (PI)	16	6
2	CEP	APCC – Teresina (PI)	16	-
3	CEP	APCC – Teresina (PI)	16, 53	-
4	CEP	APCC – Teresina (PI)	16	-
5	CEP	APCC – Teresina (PI)	-	-
6	CEP	APCC – Teresina (PI)	-	-
7	CEP	HC – Cuiabá (MT)	16	11
8	CEP	ACCCC – São Paulo (SP)	-	-
9	CEP	ACCCC – São Paulo (SP)	-	-
10	CEP	ACCCC – São Paulo (SP)	-	-
11	CEP	ACCCC – São Paulo (SP)	-	-
12	CEP	ACCCC – São Paulo (SP)	16	-
13	CEP	HA – Santo André (SP)	-	-
14	CEP	APCC – Teresina (PI)	16	-
15	CEP	PUCCAMP – Campinas (SP)	16	-
16	CEP	HAI – Goiânia (GO)	16	-
17	CEP	PUCCAMP – Campinas (SP)	16, 18	-
18	CEP	APCC – Teresina (PI)	16	11
19	CEP	HUOL – Natal (RN)	16,18, 31, 51	-
20	CEP	HUOL – Natal (RN)	16,18	-
21	CEP	HUPE – Rio de Janeiro (RJ)	16	-
22	CEP	HUPE – Rio de Janeiro (RJ)	16	11
23	CEP	HAI – Goiânia (GO)	-	-
24	CEP	HAI – Goiânia (GO)	-	-
25	CEP	HAI – Goiânia (GO)	-	-
26	CEP	HAI – Goiânia (GO)	-	-
27	CEP	HAI – Goiânia (GO)	-	-
28	CEP	HAI – Goiânia (GO)	-	-
29	CEP	APCC – Teresina (PI)	68	-

Cont/ Tabela 6

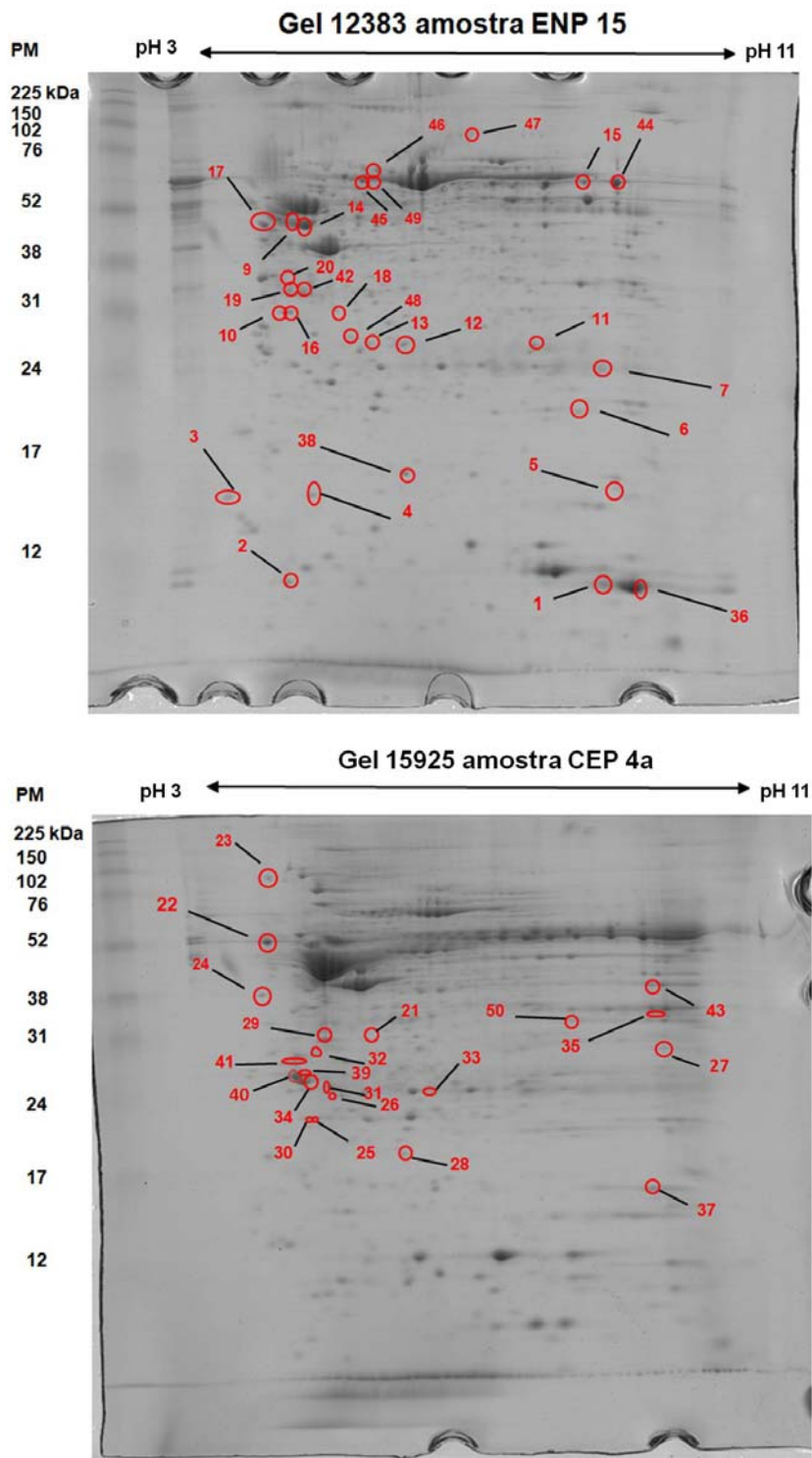
30	CEP	APCC – Teresina (PI)	16	6
31	CEP	APCC – Teresina (PI)	16	-
32	CEP	APCC – Teresina (PI)	16	11
33	CEP	APCC – Teresina (PI)	16	11
34	CEP	HC – Cuiabá (MT)	16	11
35	CEP	HC – Cuiabá (MT)	18,31, 52, 58	-
36	CEP	HC – Cuiabá (MT)	18	40
37	CEP	HC – Cuiabá (MT)	16,18,52	-
38	CEP	HC – Cuiabá (MT)	16	-
39	CEP	APCC – Teresina (PI)	16,18,	-
40	CEP	HA– Santo André (SP)	-	-
41	CEP	HPES – Salvador (BA)	16	-
42	CEP	ACCCC – São Paulo (SP)	-	-
43	CEP	ACCCC – São Paulo (SP)	-	-
44	CEP	ACCCC – São Paulo (SP)	-	-
45	CEP	ACCCC – São Paulo (SP)	16	
46	MAN	APCC – Teresina (PI)	16	
47	MAN	APCC – Teresina (PI)	16	11
48	MAN	APCC – Teresina (PI)	16	11
49	MAN	APCC – Teresina (PI)	16	-
50	MAN	APCC – Teresina (PI)	16,18	-
51	MAN	HAI – Goiânia (GO)	16,18	-
52	MAN	PUCAMP – Campinas (SP)	16	-
53	PN	ACCCC – São Paulo (SP)	16,18	-
54	PN	ACCCC – São Paulo (SP)	16	-
55	PN	ACCCC – São Paulo (SP)	-	-

CEP – Carcinoma Epidermoide Peniano; MAN - Margem Adjacente Não Neoplásica; PN - Prepúcio Normal; HPV- Do inglês “Human Papilloma Virus”; ACCCC- AC Camargo Cancer Center; APCC- Associação. Piauiense de Combate ao Câncer; HC - Hospital do Câncer; HA- Hospital Anchieta; PUCAMP- Pontifícia Universidade Católica de Campinas; HAJ -Hospital Araujo Jorge; HUOL- Hospital Universitário Onofre Lopes; HUPE- Hospital Pedro Ernesto; HPES - Hospital Profº Edgar Santos. “-”, ausência de genótipos do HPV.

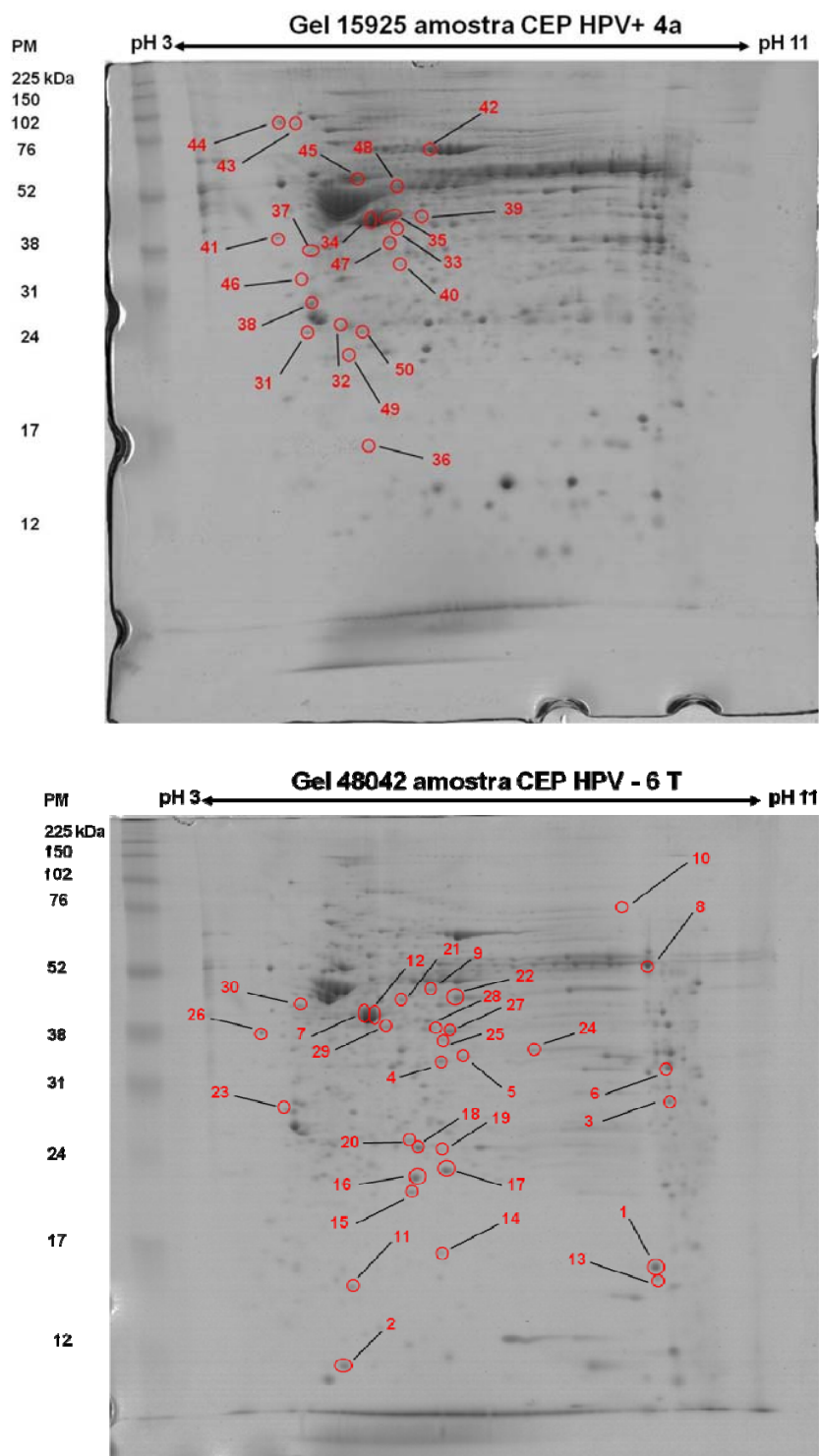
## 4.2 PROTEÔMICA CLÁSSICA

Comparações estatísticas entre os géis 2D das 14 amostras de CaPe e 10 controles evidenciaram um total de 268 spots diferenciais entre os grupos. Sendo 23 presentes apenas nas amostras tumorais, 207 exclusivamente em tecidos normais e 38 diferenciais entre os dois grupos ( $p < 0,05$ ; ANOVA). Enquanto que a análise estatística realizadas entre os casos com e sem associação ao HPV resultou num total de 321 spots, 250 presentes apenas em casos HPV negativos, 56 somente em casos HPV positivos e 10 diferenciais entre os dois grupos ( $p < 0,05$ ; ANOVA). As Figuras 4 e 5 mostram a disposição dos 100 spots selecionados para a etapa de identificação de proteínas por LC-MS/MS. A Figura 6 demonstra o cromatograma de íons totais, MS e MS/MS de um dos spots analisados.

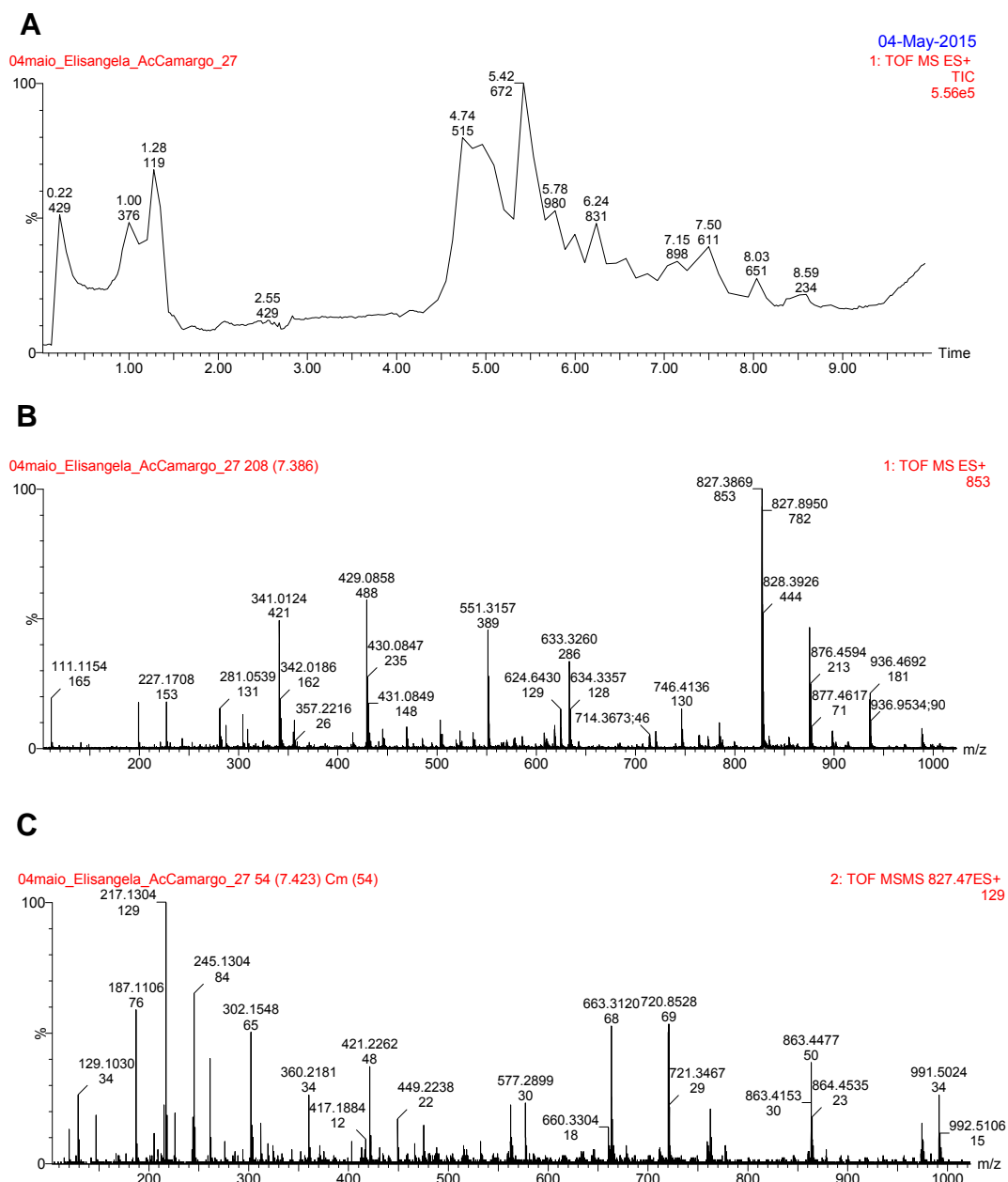
As análises de *shotgun* realizadas nos spots diferenciais entre o grupo de CaPe e controles evidenciaram um total de 35 proteínas de interesse clínico, sendo 17 presentes em níveis elevados e 18 em baixos níveis nos tumores. Enquanto que a identificação dos spots diferenciais na comparação tumor HPV positivo *versus* HPV negativo demonstraram um total de 29 proteínas relevantes para a doença. Sendo nove mais concentradas em tumores HPV positivo e 20, em HPV negativos. Todos os dados obtidos por meio da plataforma MASCOT estão sumarizados nas Tabelas 7 e 8. Deve-se notar que embora 100 spots tenham sido identificados, 36% tratavam-se de proteínas em importância clínica para o CaPe (Ex: hemoglobinas, queratinas e actinas).



**Figura 4** - Spots selecionados para a etapa de identificação proteica, quando comparado grupo tumor *versus* controle. Os spots numerados de 1 a 35 estavam em níveis elevados apenas um dos grupos experimentais. Os demais spots apresentaram níveis diferenciais nos dois grupos. Spots com numeração 36 a 50, níveis diferenciais entre as amostras tumorais e controle ( $p < 0,05$ ; ANOVA). CEP-Carcinoma Epidermoide Peniano, ENP-Epitélio Normal Peniano.



**Figura 5** - *Spots* selecionados para etapa de identificação proteica, quando comparado CEP HPV positivo e HPV negativo. Os *spots* numerados de 1 a 10, apresentaram níveis diferenciais entre as amostras, sendo todos presentes em baixos níveis no grupo HPV positivo. Os *spots* de 11 a 50 estavam em níveis elevados em apenas um dos grupos experimentais ( $p < 0,05$ ; ANOVA). CEP-Carcinoma Epidermoide Peniano. HPV-Do inglês "Human Papilloma Vírus".



**Figura 6** - Cromatograma Total de Íons (A), espectro de MS (B) e MS/MS (C) do spot 27. Este *spot* foi identificado como a proteína supressora tumoral SerpinB5, presente em níveis elevados nas amostras de carcinoma peniano sem associação ao HPV. Dados obtidos a partir das análises de shotgun do LnBio.



**Tabela 7** - Resultados da análise, por LC-MS/MS, dos *spots* diferenciais, entre o grupo tumoral e controle. Foram identificadas 35 proteínas de interesse. Outros 15 *spots* foram excluídos por se tratarem de proteínas sem interesse clínico, como citoqueratinas e hemoglobina.

Spot ID	Massa (Da)	PI	Protein Score*	Ion Score	Cobertura (%)	Fold Change (2D)	Nível em CEP**	Proteína
2	12015	4,82	92	49	12	-1	↓	<b>TNX</b> Thioredoxin
3	15883	4,34	80	54	7	-1	↓	<b>CALML5</b> Calmodulin-like protein 5
4	16336	4,85	37	43	8	-1	↓	<b>EIF5A</b> Eukaryotic translation initiation factor 5A-1
5	18950	8,06	280	69	40	-1	↓	<b>DSTN</b> Destrin
6	21158	7,01	106	37	22	-1	↓	<b>PEBP1</b> Phosphatidylethano lamine-binding protein 1
7	11884	5,24	41	39	34	-1	↓	<b>IGKC</b> Ig kappa chain C region (Fragment)
10	35971	4,94	203	29 <sup>#</sup>	15	-1	↓	<b>CA1</b> Carbonic anhydrase 1 (Fragment)
11	37139	5,28	166	76	9	-1	↓	<b>ASPRV1</b> Retroviral-like aspartic protease 1
12	28876	5,78	238	70	28	-1	↓	<b>PSME1</b> Proteasome activator complex subunit 1
13	26932	5,29	327	82	29	-1	↓	<b>PHB</b> Prohibitin (Fragment)
18	37139	5,28	165	34	7	-1	↓	<b>IL25</b> Interleukin-25
19	35971	4,94	209	59	26	1	↑	<b>ANXA5</b> Annexin A5
22	48283	4,29	191	72	24	1	↑	<b>CALR</b> Calreticulin
23	61124	4,34	266	78	18	1	↑	<b>PRKCSH</b> Glucosidase 2subunit beta
24	32084	4,12	397	79	43	1	↑	<b>SET</b> Isoform 2 of Protein SET
25	20992	5,12	50	50	5	1	↑	<b>GLO1</b> Lactoylglutathione lyase
26	22427	5,01	205	73	17	1	↑	<b>ARHGDIB</b> Rho GDP-dissociation inhibitor 2
27	67892	6,08	177	66	6	1	↑	<b>MSN</b> Moesin
30	19697	4,84	299	63	41	1	↑	<b>TPT1</b> Translationally-controlled tumor protein
31	21658	5,37	81	56	17	1	↑	<b>ARHGDI</b> A Rho GDP-dissociation inhibitor 1

**Cont/ Tabela 7**

<b>32</b>	26632	4,75	89	36	15	1	↑	<b>TPM3</b> Tropomyosin alpha-3 chain
<b>33</b>	18485	5,6	81	42	26	1	↑	<b>PRX4</b> Peroxiredoxin-4 (Fragment)
<b>34</b>	15801	5,24	139	72	24	1	↑	<b>HNRNPA2</b> Heterog, nuclear ribonucleoproteins A2/B1
<b>35</b>	37464	8,97	139	49	11	9,25	↑	<b>YWHAZ</b> 14-3-3 protein zeta/delta (Fragment)
<b>37</b>	34243	5,46	302	79	19	-8,10	↓	<b>CFL1</b> Cofilin-1
<b>38</b>	16154	5,70	50	49	7	-8,14	↓	<b>SOD1</b> Superoxide dismutase [Cu-Zn]
<b>40</b>	27871	4,68	420	85	45	9,24	↑	<b>SFN</b> 14-3-3 protein sigma
<b>41</b>	16154	5,7	50	46	7	4,87	↑	<b>YWHAE</b> 14-3-3 protein epsilon
<b>42</b>	70294	5,48	502	60	21	-2,71	↓	<b>OGN</b> Mimecan
<b>43</b>	27871	4,68	420	82	45	5,93	↑	<b>ALDOA</b> Fructose-bisphosphate aldolase
<b>45</b>	86847	6,67	527	92	9	-4,16	↓	<b>HSPA1A</b> Heat shock 70 kDa protein 1A/1B
<b>47</b>	29279	6,27	213	40	15	-4,64	↓	<b>CFB</b> Complement factor B
<b>48</b>	31699	7,15	267	72	25	-3,22	↓	<b>PSME2</b> Proteasome activator complex subunit 2
<b>49</b>	17962	5,16	51	51	7	-1,74	↓	<b>HSPA8</b> Heat shock cognate 71 kDa protein (Fragment)
<b>50</b>	29326	4,63	309	82	13	3,75	↑	<b>GAPDH</b> Isoform 2 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

CEP- Carcinoma Epidermoide Peniano; ↑ Nível elevado. ↓ Baixo Nível. \*Significativa homologia entre os espectros observados e teóricos do banco de dados proteicos ( $p < 0,01$ ) e FDR (Do Inglês " False Discovery Rate")  $\leq 0,96$ ; \*\*Quando comparado ao grupo controle (ANOVA;  $p < 0,05$ );# - Score não significativo ( $p > 0,01$ ).

**Tabela 8** - Resultados da análise, por LC-MS/MS, dos *spots* diferenciais entres os tumores penianos com e sem associação ao HPV. Um total 29 proteínas de interesse foram identificadas. Outros 21 *spots* foram excluídos por se tratarem de proteínas sem interesse clínico, como citoqueratinas e actinas.

Spot ID	Massa (Da)	PI	Protein Score*	Ion Score	Cobertura (%)	Fold Change**	Nível em CEP HPV+	Proteína
1	18719	8,22	738	84	74	-4,60	↓	<b>CFL1</b> Cofilin-1
3	67892	6,08	635	81	17	-1,40	↓	<b>MSN</b> Moesin
4	36900	5,71	623	95	27	-0,11	↓	<b>LDHB</b> L-lactate dehydrogenase B
5	53524	6,39	679	102	34	-2,01	↓	<b>PKM</b> Pyruvate kinase (Fragment)
6	36950	8,44	505	94	32	-0,44	↓	<b>LDHA</b> L-lactate dehydrogenase A
2	15048	5,34	380	102	58	-1	↓	<b>LGAL</b> Galectin-1
11	16336	4,85	268	73	37	-1	↓	<b>EIF5A</b> Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 (Fragment)
14	45861	6,13	192	66	9	-1	↓	<b>HP</b> Haptoglobin
15	22049	5,66	431	76	22	-1	↓	<b>PRDX2</b> Peroxiredoxin-2
16	23569	5,43	1261	125	50	-1	↓	<b>GSTP1</b> Glutathione S-transferase
18	22826	5,98	891	115	68	-1	↓	<b>HSPB1</b> Heat shock protein beta-1
19	30749	5,86	315	85	45	-1	↓	<b>PRDX4</b> Peroxiredoxin-4
20	25485	6,10	296	95	28	-1	↓	<b>APCS</b> Serum amyloid P-compon,
21	69443	5,87	299	110	12	-1	↓	<b>EZR</b> Ezrin
23	24919	4,50	135	70	17	-1	↓	<b>EEF1B2</b> Elongation factor 1-beta
24	38918	6,57	593	108	46	-1	↓	<b>ANXA1</b> Annexin A1
25	48135	4,70	296	71	30	-1	↓	<b>TUBB</b> Tubulin beta chain
27	42530	5,72	950	112	51	-1	↓	<b>SERPINB5</b> Serpin B5
28	43203	5,53	297	76	37	-1	↓	<b>PSMD13</b> 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13

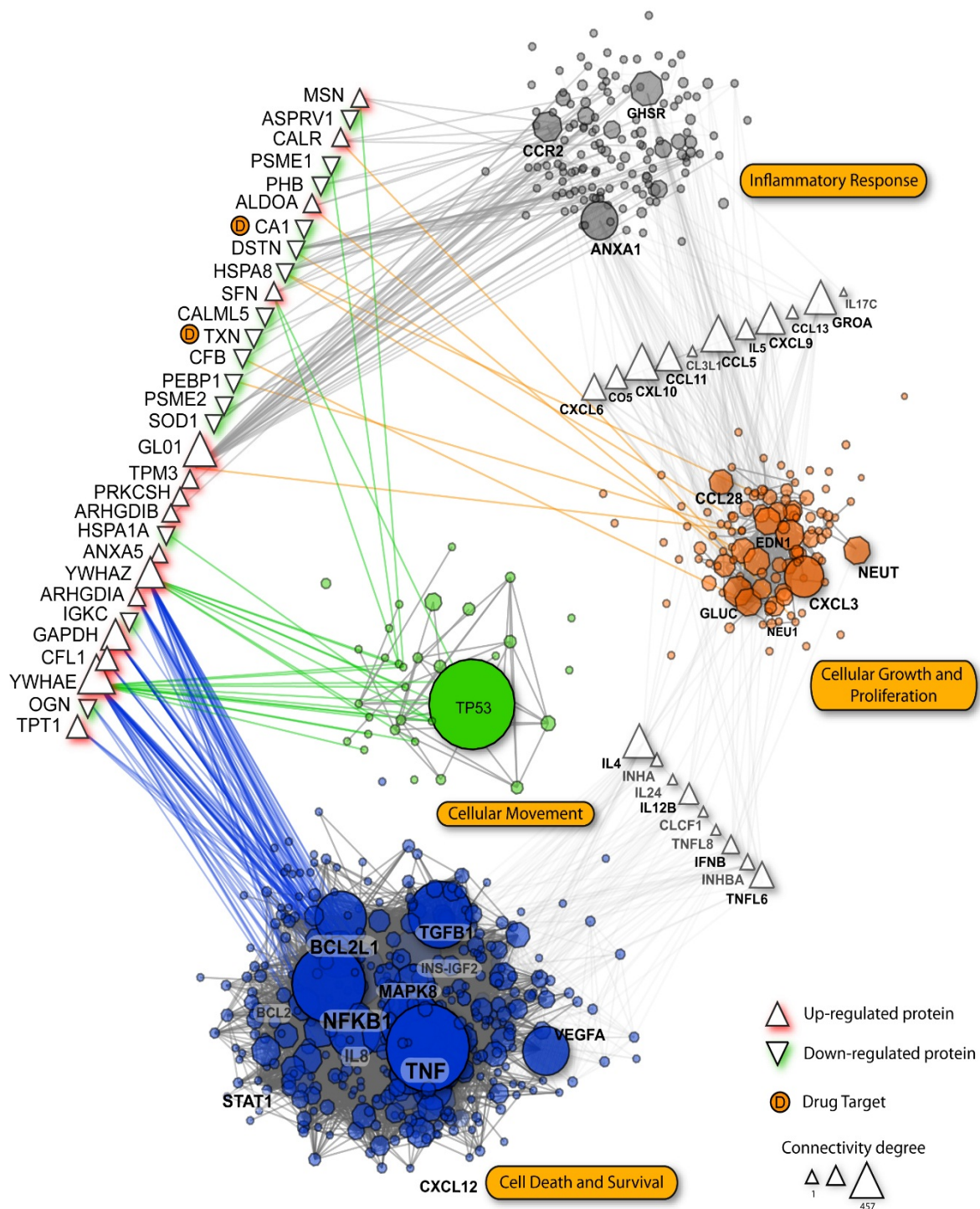
**Cont/ Tabela 8**

<b>30</b>	53676	5,06	1014	125	49	-1	↓	<b>VIM</b> Vimentin
<b>31</b>	27095	4,56	335	73	28	1	↑	<b>EIF6</b> Eukaryotic translation initiation factor 6
<b>32</b>	21658	5,37	212	76	26	1	↑	<b>ARHGDI1</b> Rho GDP-dissociation inhibitor 1
<b>38</b>	29326	4,63	937	140	55	1	↑	<b>YWHAE</b> 14-3-3 protein epsilon
<b>43</b>	85622	4,85	324	95	12	1	↑	<b>HNRNPUL2</b> Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2
<b>44</b>	61124	4,34	820	90	32	1	↑	<b>PRKCSH</b> Glucosidase 2 subunit bet
<b>45</b>	50548	4,96	1658	190	38	1	↑	<b>TUBA1C</b> Tubulin alpha-1C chain
<b>47</b>	36878	5,38	381	98	37	1	↑	<b>EIF3I</b> eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I
<b>49</b>	20992	5,12	175	92	27	1	↑	<b>GLO1</b> Lactoylglutathione lyase
<b>50</b>	23031	5,10	386	105	46	1	↑	<b>ARHGDI2</b> Rho GDP-dissociation inhibitor 2

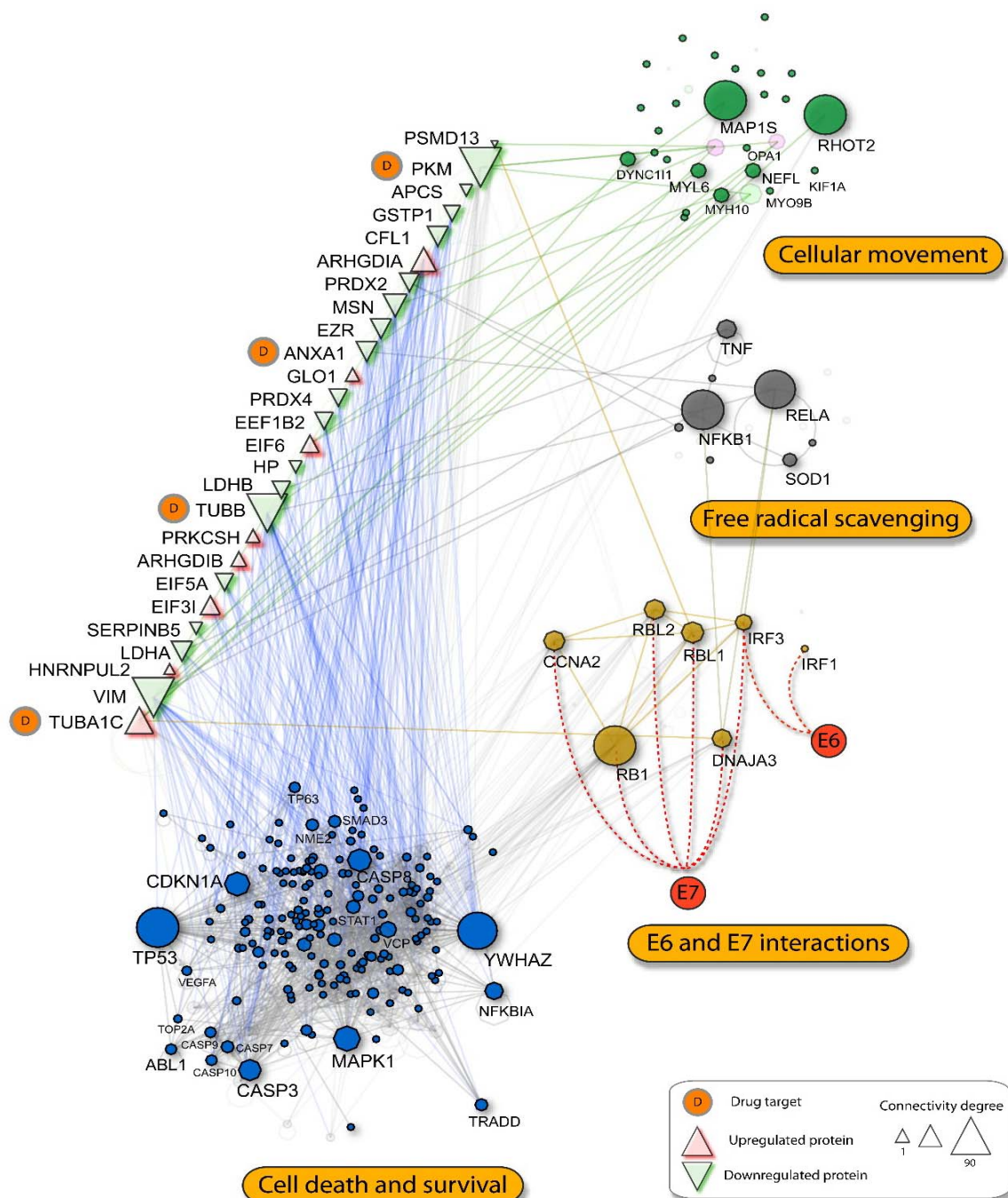
CEP- Carcinoma Epidermoide Peniano; HPV- do inglês "Human Papilloma Virus"; ↑ Nível elevado. ↓ Baixo Nível. \*Significativa homologia entre os espectros observados e teóricos do banco de dados proteicos ( $p < 0.01$ ) e FDR (Do Inglês "False Discovery Rate")  $\leq 0,96$ ; \*\*Quando comparado ao grupo de CEP HPV negativo (ANOVA;  $p < 0,05$ ).

### 4.3 BIOINFORMÁTICA

O estudo dos mapas de interações proteicas nos mostrou alguns *clusters* com funções biológicas importantes para a carcinogênese e progressão tumoral. Entre eles, se destacaram àqueles formados por proteínas antioxidantes e de adesão celular, presentes em níveis elevados nos tumores HPV negativos. Esta ferramenta também evidenciou interações significativas com as oncoproteínas virais do HPV (E6 e E7) e proteínas ativadoras da via MAPK, relacionadas com a proliferação celular (Figuras 7 e 8). A partir das análises dos interactomas, selecionamos quatro proteínas para a análise *in situ* por MALDI *Imaging*: Calreticulina (*spot* 22), 14-3-3 proteína sigma (*spot* 40), Serpina B5 (*spot* 27) e Glutathione-s-transferase (*spot* 16).



**Figura 7** - Rede de interações das proteínas diferenciais nas amostras de Carcinoma Epidermoide Peniano, tipo usual, com processos biológicos. Os triângulos indicam níveis diferenciais de proteínas entre tumores e controles, sendo os tumores a referência.



**Figura 8** - Rede de interações das proteínas diferenciais nas amostras de Carcinoma Epidermoide Peniano, tipo usual, HPV positivas, com processos biológicos. Os triângulos indicam níveis diferenciais de proteínas nos tumores penianos HPV positivos, quando comparado ao grupo HPV negativo.

#### 4.4 IMAGEAMENTO MOLECULAR POR ESPECTROMETRIA

Os dados de identificação proteica dos alvos pré-determinados, obtidos pelas análises de MALDI TOF/TOF, e seus *status* de concentração no gel 2D estão na Tabela 9. A Figura 9 ilustra a distribuição espacial dos filtros criados a partir da lista de peptídeos trípticos alvos em duas secções de carcinoma peniano, sendo uma delas HPV positivo e outra HPV negativo, e um espécime controle. Analisando apenas as imagens moleculares é possível observar que o peptídeo referente à Calreticulina (m/z 1411) foi o único que corroborou com os dados de eletroforese 2D, apresentando-se em elevada concentração nas amostras tumorais quando comparado aos controles.

Enquanto que em relação às proteínas diferenciais entre tumores com e sem associação ao HPV, apenas a análise *in situ* do peptídeo alvo m/z 1884 (Glutathione-s-transferase) demonstrou similaridade com os resultados do gel 2D, ou seja, presente em níveis elevados nos tumores HPV negativos. No entanto, estes resultados não foram confirmados estatisticamente, pois as comparações entre a intensidade de sinal dos alvos peptídicos e *status* do HPV não foram significativas ( $p > 0,05$ ; U de *Mann-Whitney*). Resultado semelhante foi obtido quando as intensidades de sinais foram avaliadas em relação às demais variáveis clinicopatológicas e grupo controle (Tabela 10). Uma exceção ocorreu em relação à intensidade de sinal do peptídeo m/z 1884 que refere-se ao peptídeo da proteína Glutathione-s-transferase, significativamente superior no grupo controle



quando comparado aos tumores penianos ( $0,45 \pm 0,13$  versus  $0,29 \pm 0,16$ ;  $p=0,002$ ; U de *Mann-Whitney*).

A estratégia de confirmação, *in silico*, da identidade proteica dos alvos peptídicos por meio da co-localização dos peptídeos teóricos demonstrou resultado satisfatório. Obtivemos pelo menos 80% de correlação entre a distribuição espacial dos peptídeos trípticos experimentais e teóricos. A Amostra 1 de CaPe foi utilizada para ilustrar os resultados de co-localização (Figuras 10 a 13). No anexo 6, estão dispostos todos os peptídeos obtidos da digestão teórica de cada proteína alvo.

A análise não supervisionada realizada nas amostras de CaPe evidenciaram *clusters* que coincidiram com as regiões tumorais e adjacentes livres de neoplasia das secções teciduais, visualizados por meio de um mapa de segmentação (Figura 14). Duas amostras de tumores penianos foram utilizadas para exemplificar o potencial do MALDI *Imaging* em definir regiões tumorais baseado em valores de  $m/z$ . Análises de PCA, utilizando os principais valores de  $m/z$  co-localizados nestas regiões do mapa de segmentação, demonstraram que este intervalo de picos foi capaz de explicar quase 90% da heterogeneidade entre as regiões (Figura 15). Na Tabela 11 é possível observar que os principais picos responsáveis por esta distinção apresentaram correlações significativas com as regiões tumorais ( $p<0,05$ ; Pearson), além de valores de AUC acima de 0,85. Na Figura 16 observa-se diferenças espectrais entre as regiões tumorais e adjacentes livres de neoplasia, destacando o pico  $1413 \pm 2,5$  Da. Este estava incluído na lista dos principais valores de  $m/z$  diferenciadores, e foi correlacionado

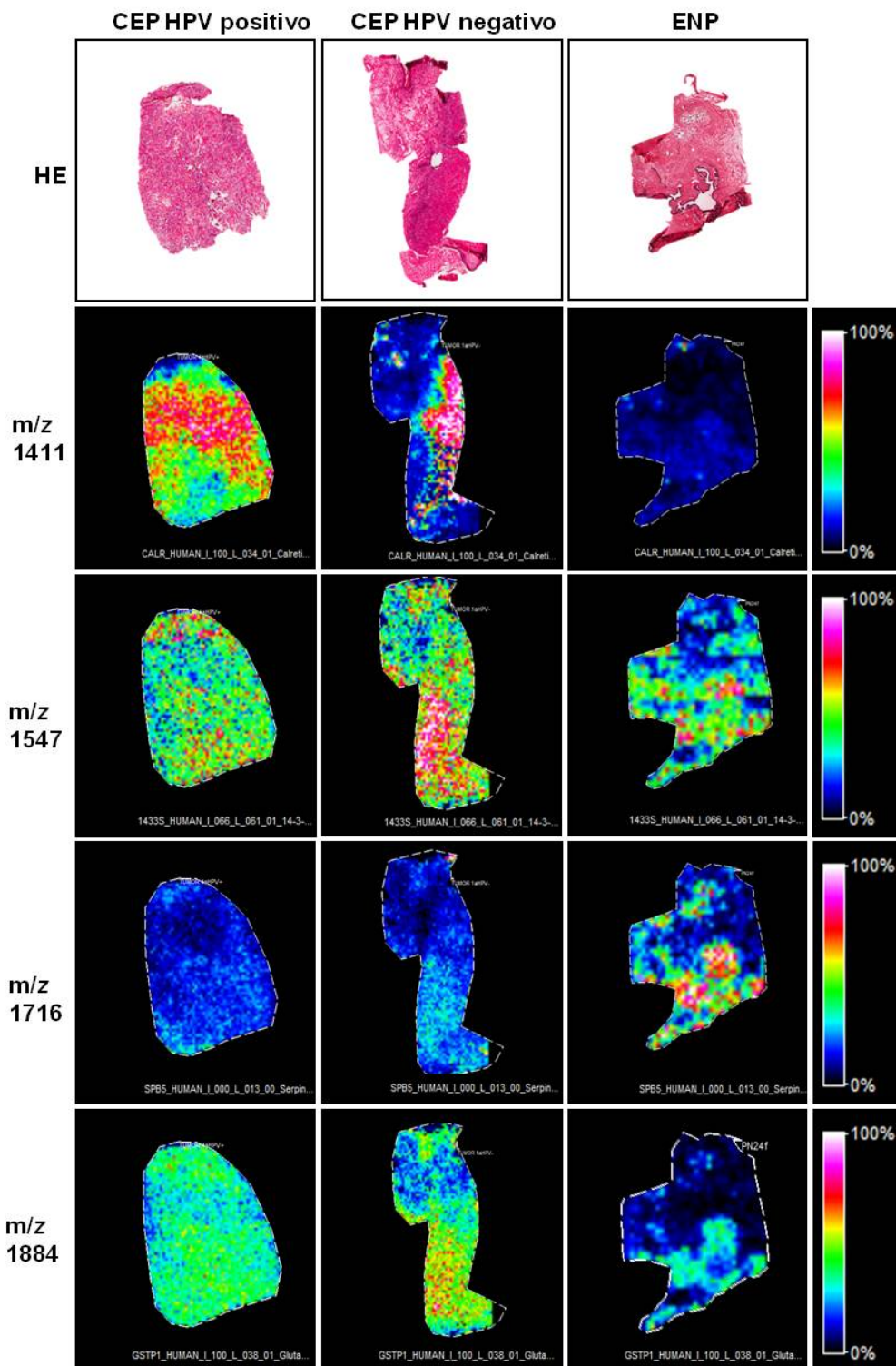
posteriormente ao peptídeo tríptico alvo da Calreticulina. A curva ROC e imagens moleculares deste peptídeo, nas amostras 1 e 2 de CaPe, podem ser observados na Figura 17. A distribuição espacial dos valores de m/z trípticos alvo nas amostras segmentadas estão dispostos na Figura 18. Apenas os peptídeos relacionados às proteínas Calreticulina e 14-3-3 sigma foram co-localizados com as regiões tumorais em ambas as amostras. Enquanto que os peptídeos da Serpina B5 e Glutathione-s-Transferase apresentaram intensidades de sinal semelhante (Amostra 1), entre as regiões, ou elevada na região adjacente livre de neoplasia (Amostra 2).

**Tabela 9** - Proteínas identificadas por MALDI TOF/TOF e selecionadas para as análises *in situ* por imageamento molecular.

Nome da proteína	Gene	ID	Peso Molecular [kDa]	Cobertura (%)	m/z	Sequência	Nível entre os grupos
Calreticulina	CALR	P27797	48,10	2,90	1410,86	EQFLDGDGWTSR	↑CEP**
14-3-3 Sigma	SFN	P31947	27,80	9,30	1546,82	SNEEGSEEKGPEVR	↑CEP**
					1054,14	EMPPTNPIR	
Serpina B5	SERPINB5	P36952	42,10	3,70	1715,75	DELNADHPFIYIIR	↑CEP HPV -*
Glutathiona-s-Transferase	GSTP1	P09211	23,30	12,90	1337,91	PPYTVVYFPVR	↑CEP HPV -*
					1884,09	FQDGLTLYQSNTILR	

\*Quando comparado ao grupo de tumores com associação ao HPV (Gel 2D).

\*\*Quando comparado aos tecidos normais (Gel 2D).



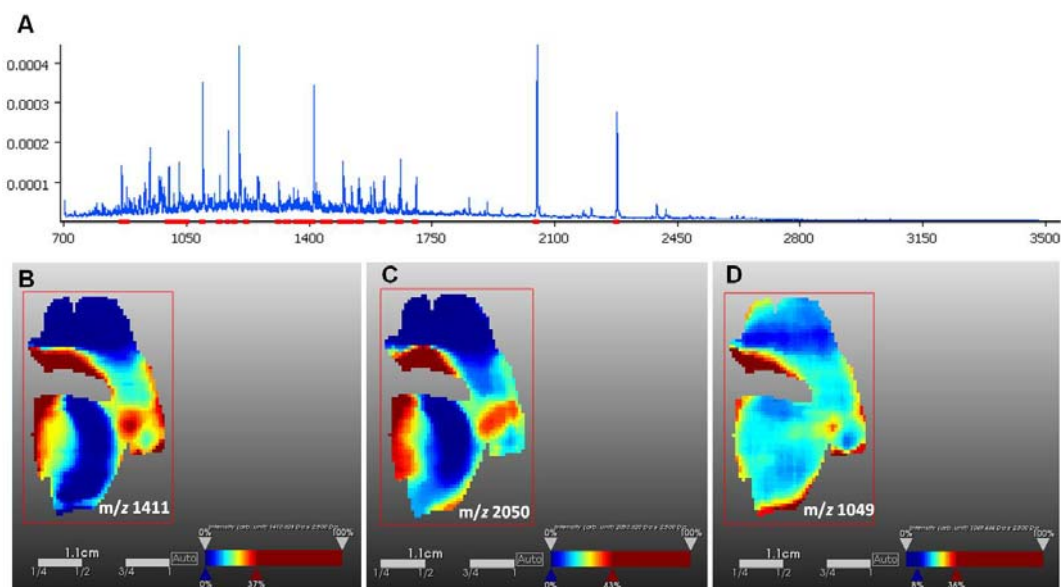
**Figura 9** - Análise *in situ* dos peptídeos trípticos alvos do estudo. Sendo referentes às rproteínas: Calreticulina (m/z 1411, EQFLDGDGWTSR), 14-3-3 sigma (m/z 1547; SNEEGSEEKGPEVR), Serpin B5 (m/z 1716; DELNADHPFIYIIR) e Glutaciona-s-Transferase (m/z 1884; FQDGLTLYQSNTILR) em amostras de tumores penianos e epitélio peniano normal (prepúcio normal). CEP-Carcinoma Epidermoide Peniano, ENP-Epitélio Normal Peniano; HE-Hematoxilina e Eosina.

**Tabela 10** - Comparação estatística das intensidades médias dos peptídeos alvos em regiões de interesse de amostras de Carcinoma Peniano de acordo com as variáveis clinicopatológicas e grupo controle.

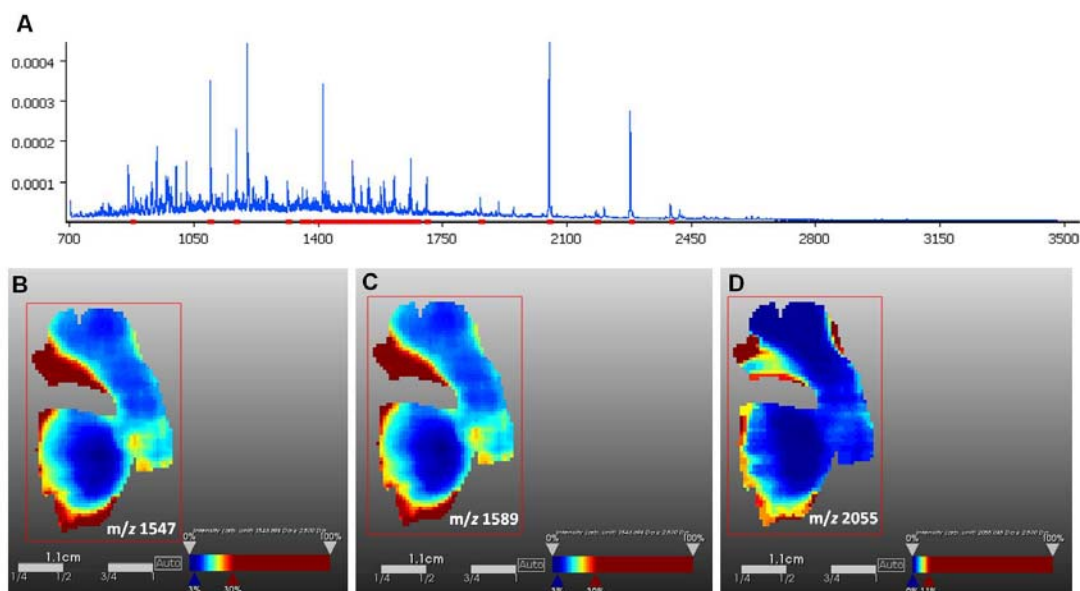
Variável	Categoria	Calreticulina m/z 1411	14-3-3 Sigma m/z 1547	Serpina B5 m/z 1716	Glutathiona-s-Transferase m/z 1884
Grupo controle	Epitélio Normal Peniano (N=10)	0,25 ± 0,17*	0,37 ± 0,10	0,43 ± 0,13	0,45 ± 0,13
	Carcinoma Peniano (N=21)	0,22 ± 0,23	0,34 ± 0,15	0,31 ± 0,19	0,29 ± 0,16
		P=0,603	P=0,546	P=0,087	<b>P=0,002</b>
Status do HPV	Positivo alto risco (N=13)	0,31 ± 0,23	0,32 ± 0,19	0,26 ± 0,20	0,26 ± 0,14
	Negativo (N=8)	0,17 ± 0,22	0,35 ± 0,13	0,33 ± 0,19	0,30 ± 0,17
		P=0,053	P=0,645	P=0,500	P=0,456
Estadiamento	I/ II (N= 9)	0,19 ± 0,25	0,32 ± 0,19	0,31 ± 0,13	0,27 ± 0,11
Clínico Final	IIIa/IIIb/IV (N=12)	0,25 ± 0,22	0,35 ± 0,13	0,30 ± 0,23	0,30 ± 0,19
		P=0,345	P=0,702	P=0,972	P=0,602
Metástase em linfonodos	Presente (N=12)	0,23 ± 0,27	0,30 ± 0,20	0,26 ± 0,13	0,26 ± 0,11
	Ausente (N=7)	0,25 ± 0,22	0,35 ± 0,13	0,30 ± 0,19	0,30 ± 0,23
		P=0,650	P=0,482	P=0,837	P=0,650

\*Intensidade média ± Desvio padrão

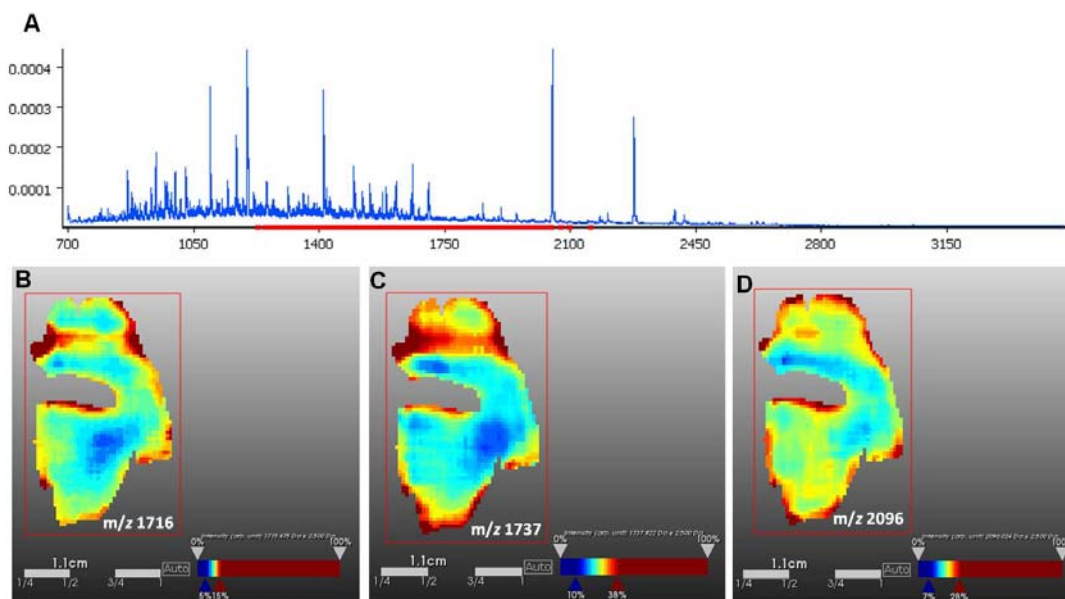
N=número de amostras.



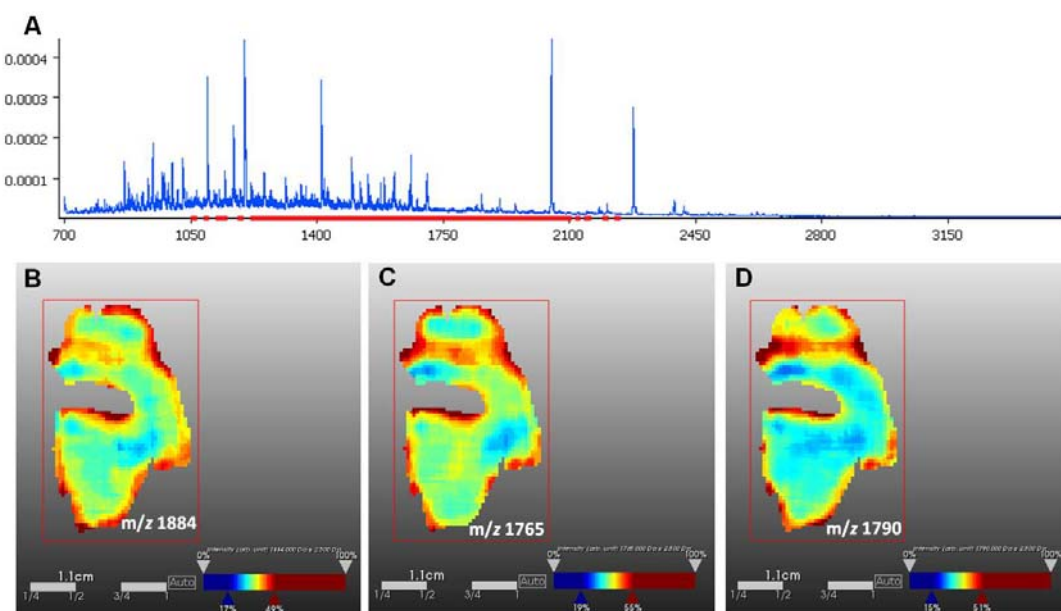
**Figura 10** - Co-localização do peptídeo experimental e teóricos da proteína Calreticulina em amostra de carcinoma peniano. (A) – Espectrograma destacando em vermelho os picos co-localizados com o íon  $m/z$  1411, (B) - Distribuição espacial do peptídeo experimental, (C) e (D) – Distribuição espacial do peptídeo  $m/z$  2050 (Seq, EQFLDGDGWTSRWIESK) e  $m/z$  1049 (Seq, AAEKQMKDK) obtidos a partir da digestão teórica da Calreticulina.



**Figura 11** - Co-localização do peptídeo experimental e teóricos da proteína 14-3-3 sigma em amostra de carcinoma peniano. Em (A) – Espectrograma destacando em vermelho os picos co-localizados com o íon  $m/z$  1547, (B) - Distribuição espacial do peptídeo experimental, (C) e (D) – Distribuição espacial do peptídeo  $m/z$  1589 (Seq, YEDMAAFMKGAVEK) e  $m/z$  2055 (Seq, RIIDSARSAYQEAMDISK) obtidos a partir da digestão teórica da proteína 14-3-3 sigma.

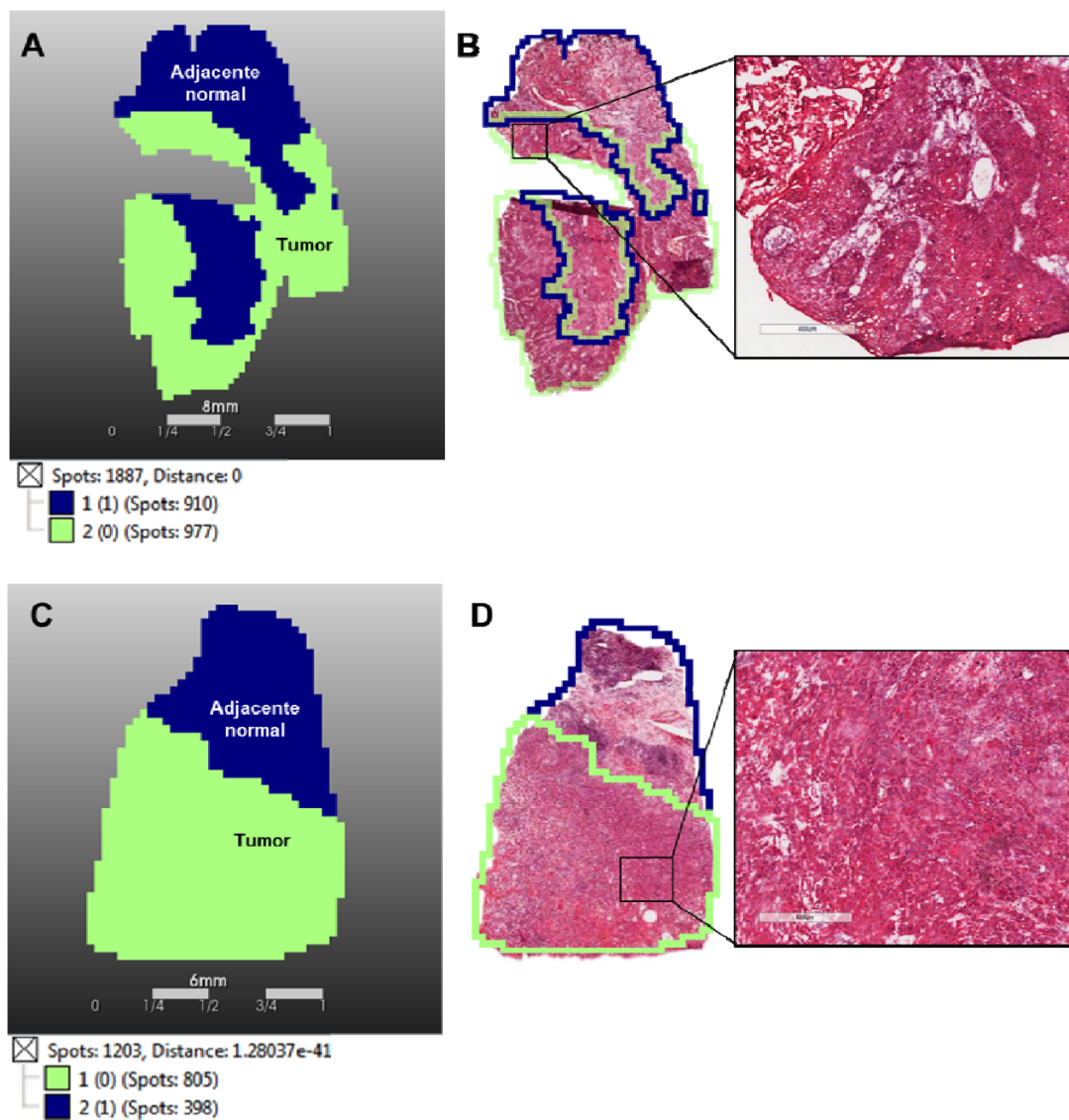


**Figura 12** - Co-localização do peptídeo experimental e teóricos da proteína Serpina B5 em amostra de carcinoma peniano. Em (A) – Espectrograma destacando, em vermelho, os picos co-localizados com o íon  $m/z$  1716, (B) - Distribuição espacial do peptídeo experimental, (C) e (D) – Distribuição espacial do peptídeo  $m/z$  1737 (Seq, VKLSIPKFK) e  $m/z$  2096 (Seq, GVALSNVIHK) obtidos a partir da digestão teórica da proteína Serpina B5.



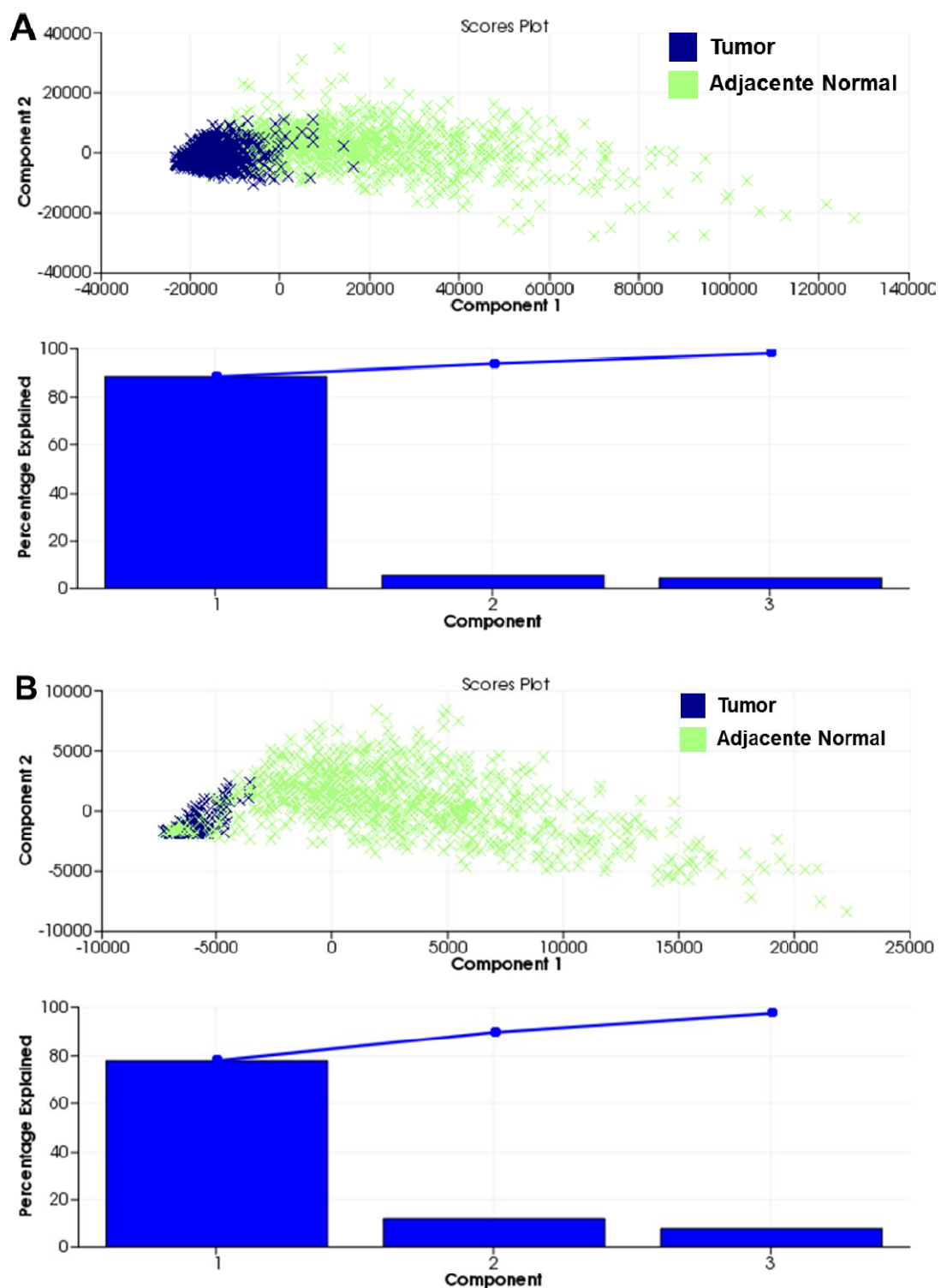
**Figura 13** - Co-localização do peptídeo experimental e teóricos da proteína Glutathione-s-transferase em amostra de carcinoma peniano. Em (A) – Espectrograma destacando, em vermelho, os picos co-localizados com o íon  $m/z$  1884, (B) - Distribuição espacial do peptídeo experimental, (C) e (D) – Distribuição espacial do peptídeo  $m/z$  1765 (Seq, TLGLYGK) e  $m/z$  1790 (Seq, DQQEALVDMVNDGVEDLR) obtidos a partir da digestão teórica da proteína Glutathione-S-Transferase.





**Figura 14** - Mapa de segmentação dos *clusters* relacionados às regiões tumorais e adjacente normais em amostras de Carcinoma Epidermoide Penianos usuais. Amostra 1 em (A) e amostra 2 em (C). Em (B) e (D), imagens histológicas dos tumores corados com hematoxilina e eosina (Magnificação original x 200).





**Figura 15** - *Score plot* e histograma do percentual de explicação das componentes utilizadas nas análises de PCA, entre regiões tumorais *versus* adjacentes normais, em amostras Carcinoma Epidermoide Penianos usuais. Em (A), amostra 1 e em (B), amostra 2. Gráficos gerados com auxílio do software SCiLS Lab 2014.b, utilizando a escala pareto e um total de três componentes.

**Tabela 11** - Principais valores de m/z co-localizados nas regiões tumorais, determinadas pelo mapa de segmentação, em amostras de Carcinomas Epidermoide Peniano, tipo usual, utilizadas no estudo.

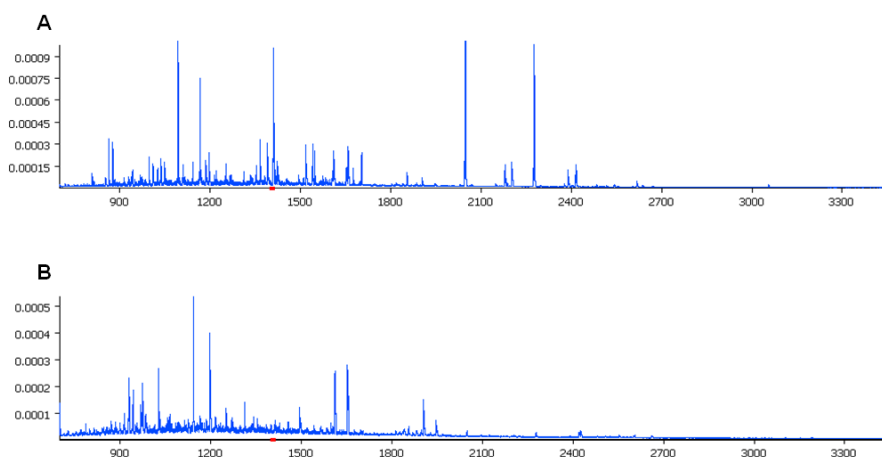
Amostra	Valor de m/z	Correlação	P valor*	AUC
1	1097 ± 2,5	0,41	0,0002	0,977
	1170 ± 2,5	0,37	0,0001	0,962
	1413 ± 2,5**	0,39	0,0002	0,962
	1543 ± 2,5	0,41	0,0001	0,953
	1858 ± 1,5	0,40	<0,0001	0,929
	2052 ± 1,5	0,43	0,0003	0,960
	2206 ± 2,5	0,32	<0,0001	0,863
	2279 ± 0,5	0,40	0,0002	0,955
	2391 ± 1,5	0,35	0,0002	0,957
	2621 ± 2,5	0,35	<0,0001	0,934
	2	1097 ± 2,5	0,35	0,0005
1370 ± 2,5		0,37	0,0001	0,992
1394 ± 2,5		0,39	0,0002	0,988
1413 ± 2,5**		0,42	0,0005	0,998
1542 ± 2,5		0,39	0,0001	0,974
1706 ± 2,5		0,38	0,0001	0,956
2049 ± 1,5		0,37	0,0006	0,974
2052 ± 1,5		0,41	0,0008	0,984
2279 ± 0,5		0,43	0,0005	0,982
2392 ± 2,5		0,42	<0,0001	0,958

± desvio de massa padrão, referente ao espectrômetro de massas.

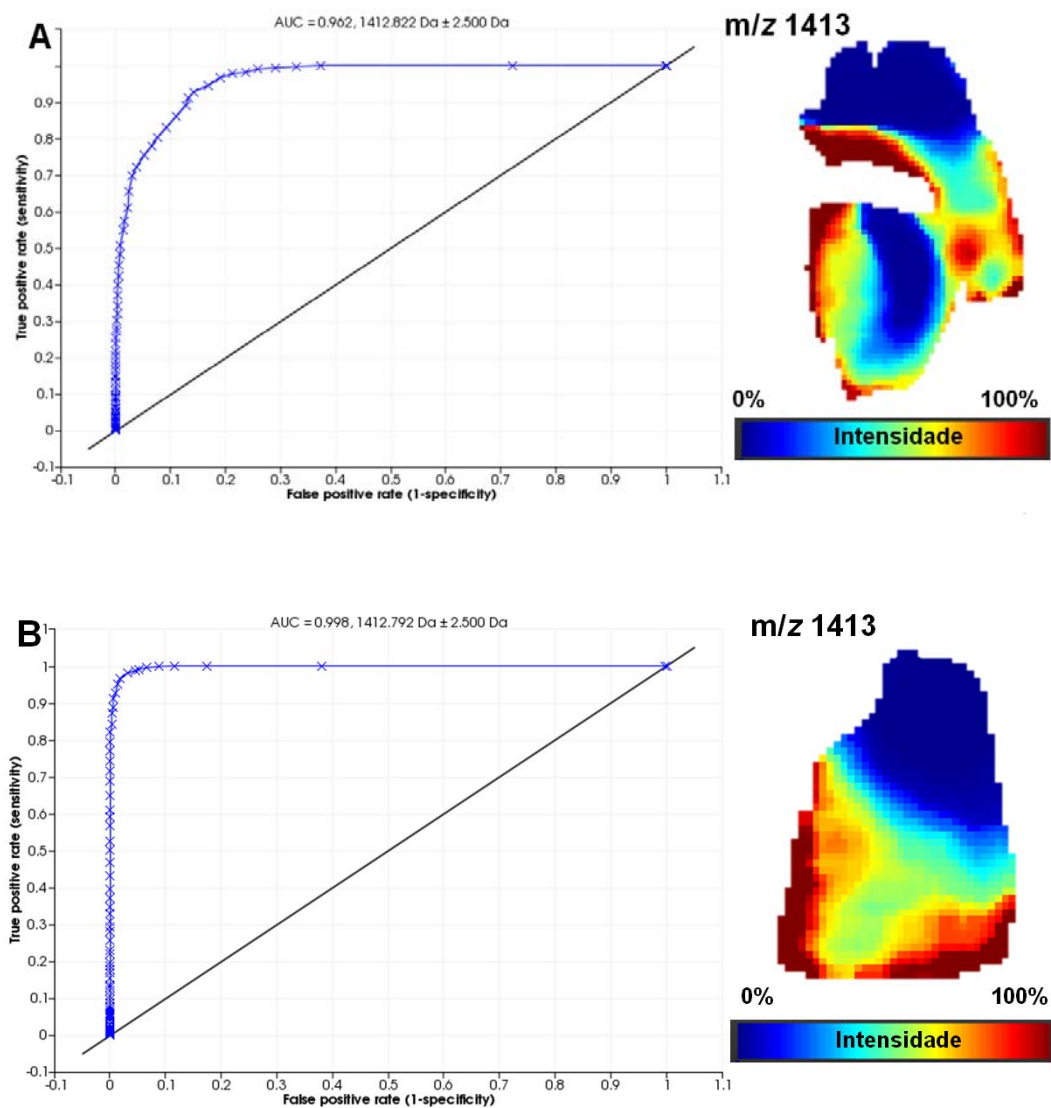
\*Correlação de Pearson, quando comparado à região adjacente normal.

\*\*m/z peptídico relacionado à proteína Calreticulina.

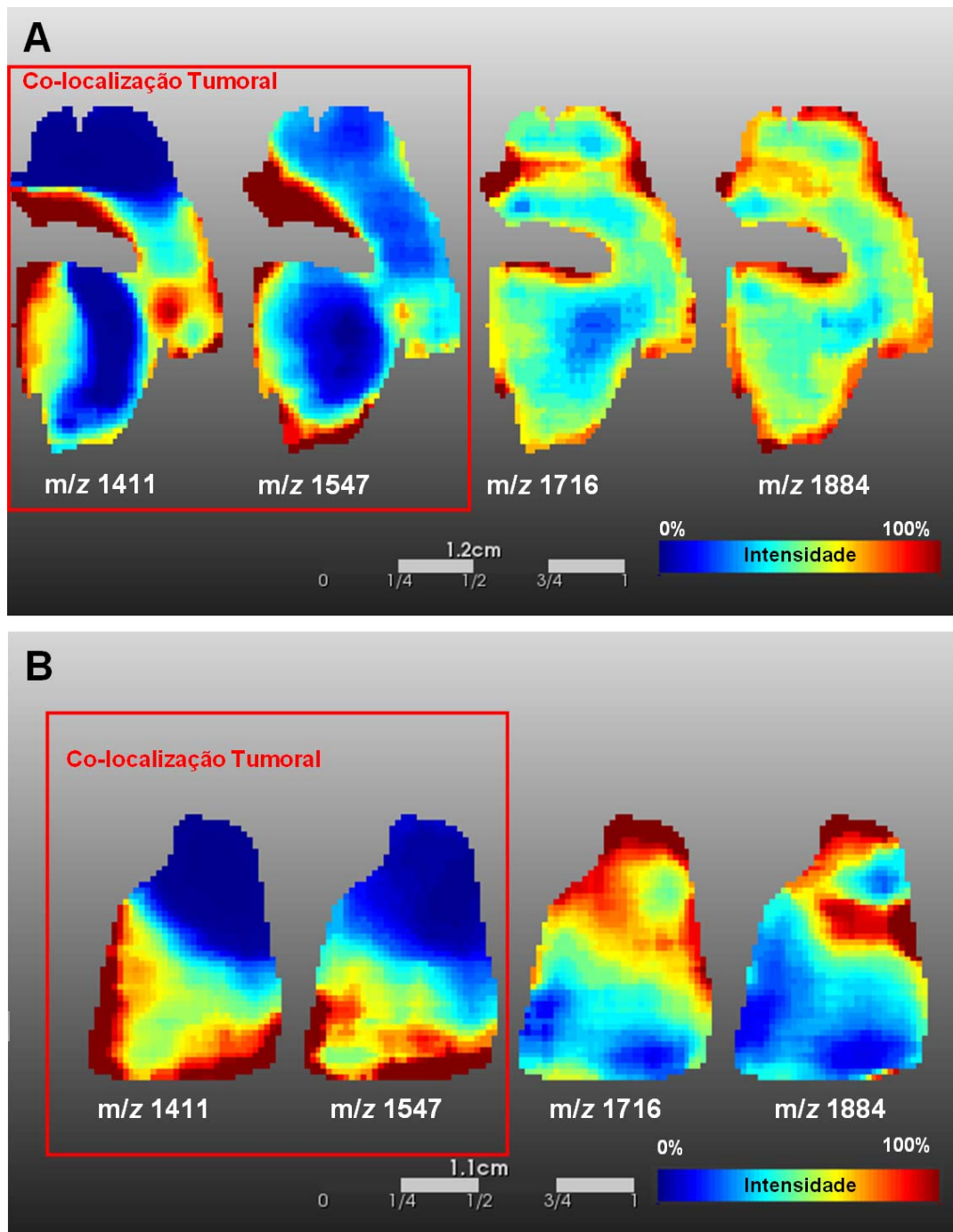
AUC- Do inglês " Area Under the Curve", obtido por meio da Curva ROC.



**Figura 16** - Espectrograma de massas das regiões do mapa de segmentação. Em (A), região tumoral e (B), margem adjacente livre de neoplásia, determinada pela análise multivariada não supervisionada da amostra 2 do grupo de tumores penianos do estudo. O ponto vermelho indica o pico referente ao peptídeo trípico da Calreticulina (m/z 1413).



**Figura 17** - Curva ROC do  $1413 \pm 2.5$  Da e imagens moleculares da sua distribuição espacial, nas amostras tumorais 1 e 2. A imagem molecular da distribuição espacial do pico na amostra 1 encontra-se em à direita em (A) e na amostra 2 em (B).



**Figura 18** - Distribuição espacial dos peptídeos trípticos alvo do estudo. Em (A), amostra 1 e em (B) amostra 2. Os picos relacionados às proteínas Calreticulina (m/z 1411) e 14-3-3 Sigma (m/z 1547) apresentaram-se co-localizadas nas regiões tumorais (secções delimitadas em vermelho), enquanto que nas regiões adjacentes normais houve predomínio dos peptídeos referentes às proteínas Serpina B5 (m/z 1716) e Glutaciona-s-transferase (m/z 1884).

## 4.5 IMUNOISTOQUÍMICA

Na etapa de validação por imunohistoquímica nos tecidos parafinados (TMA), a Calreticulina apresentou imunoreatividade citoplasmática de moderada a intensa nos tumores penianos (Figura 19). Embora os valores máximos de Hscore tenham sido apresentados pelo grupo de tumores penianos, a análise estatística não evidenciou diferença significativa imunoreatividade em CaPe quando comparado aos controles (Hscore médio  $46 \pm 59$  versus  $33 \pm 31$ ; Valor de  $p=0,863$ ; U de Mann-Whitney). A distribuição dos valores de Hscore da Calreticulina nos dois grupos pode ser visualizada na Figura 20.

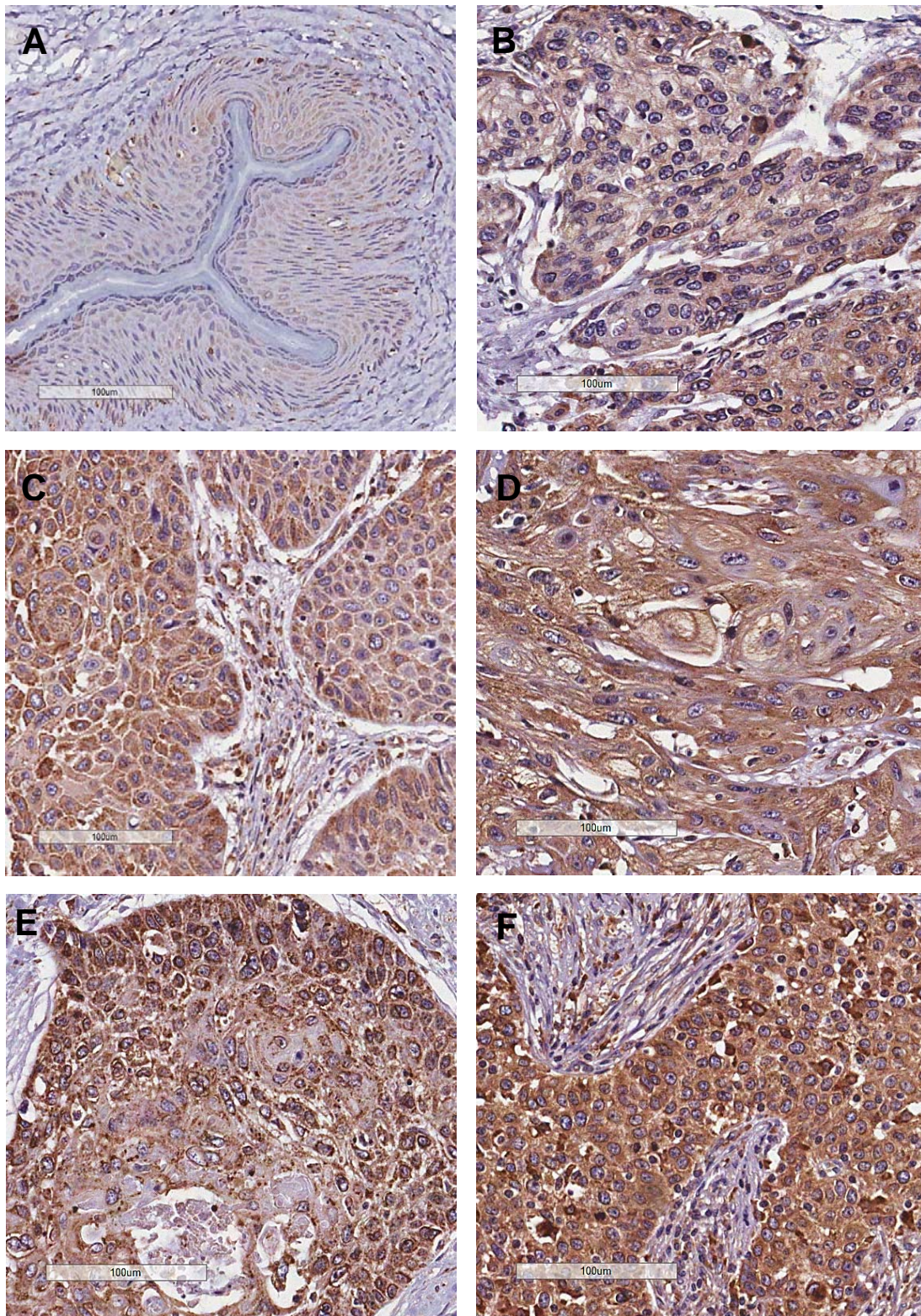
Para as análises de sobrevivência, foi estimado o valor de 35, como ponto de corte para a imunoreatividade da Calreticulina em relação à sobrevida global, e de 45, para a sobrevida câncer específica (Figura 21). Na Figura 22 é possível observar as curvas de sobrevivências, global e câncer específica, em função dos pontos de corte estimados para imunoreatividade da Calreticulina. A imunoreatividade da Calreticulina, o estadiamento clínico avançado e a presença de metástases em linfonodos influenciaram a sobrevida global e câncer específica dos pacientes, quando estas variáveis foram avaliadas individualmente ( $p<0,05$ ; Regressão de Cox simples). A invasão perineural e o grau histológico (pouco diferenciado) foram associados com menor tempo de sobrevida global e câncer específica, respectivamente ( $p<0,05$ ; Regressão de Cox simples). No modelo de regressão multivariado, a variável metástase em linfonodos foi a

única capaz de estimar o risco de morte associado e não associado à doença (Tabelas 12 e 13).

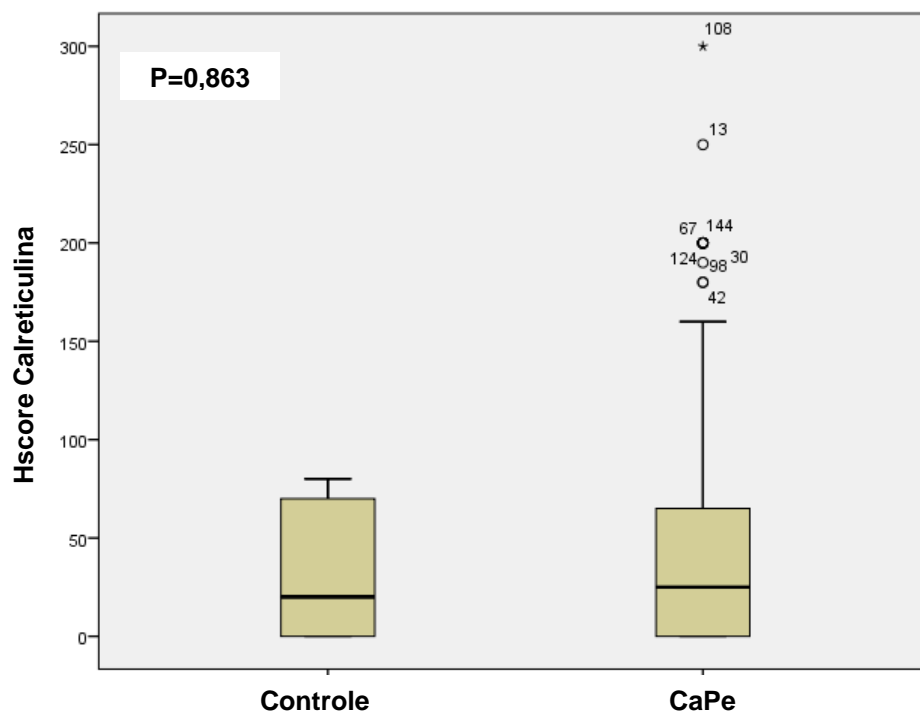
O modelo de regressão logístico simples evidenciou que os níveis da Calreticulina foi capaz de prever a presença de metástase em linfonodos nos casos de CaPe (Chance de Risco: 1,006; Intervalo de Confiança de 95%: 1,0001-1,0012;  $p=0,044$ ). De modo que para cada unidade de Hscore acrescida, espera-se um aumento de 0,6% na chance de ocorrer metástase em linfonodos. A estimativa deste risco em função dos valores de Hscore da Calreticulina pode ser visualizada graficamente na Figura 23.

As variáveis não contínuas estabelecidas pelo estudo, Hscore > 35 e Hscore >45, também apresentaram potencial para estimar a chance do risco associado à presença de metástase em linfonodos. Com intervalo de confiança de 2,6 a 7,2, o risco de o paciente ter metástase em linfonodos foi 3,4x maior quando o Hscore está acima de 35 ( $P=0,001$ ; Regressão Logística Simples). E para o Hscore > 45 este risco diminui para 2.82x, podendo variar de 1,3 a 5,9, considerando um intervalo de confiança de 95% ( $P=0,005$ ; Regressão Logística Simples).



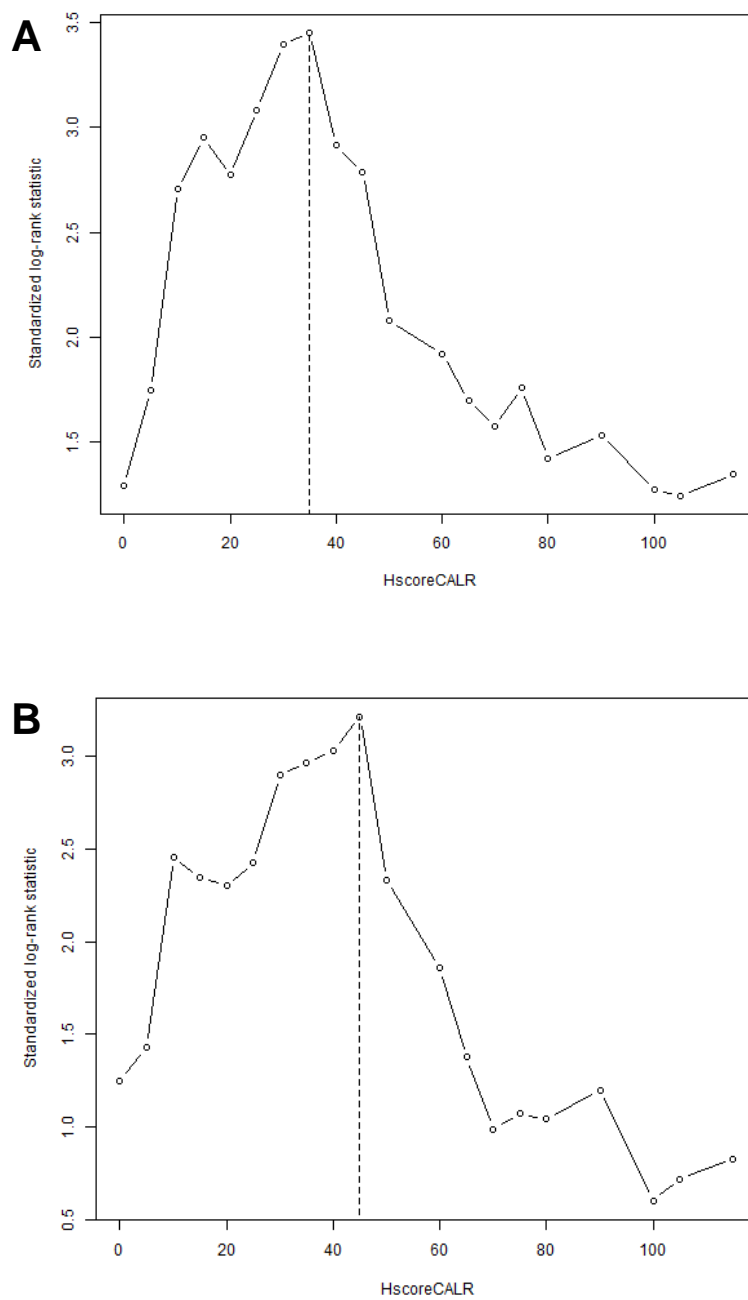


**Figura 19** - Imunoreatividade da Calreticulina no citoplasma de células do Epitélio Normal Peniano (ENP) e Carcinoma Peniano (CaPe). (A) - Imunoreatividade fraca em ENP. (B) - Imunoreatividade moderada em CaPe. (C - F) imunoreatividade forte em CaPe (Magnificação original x 800).

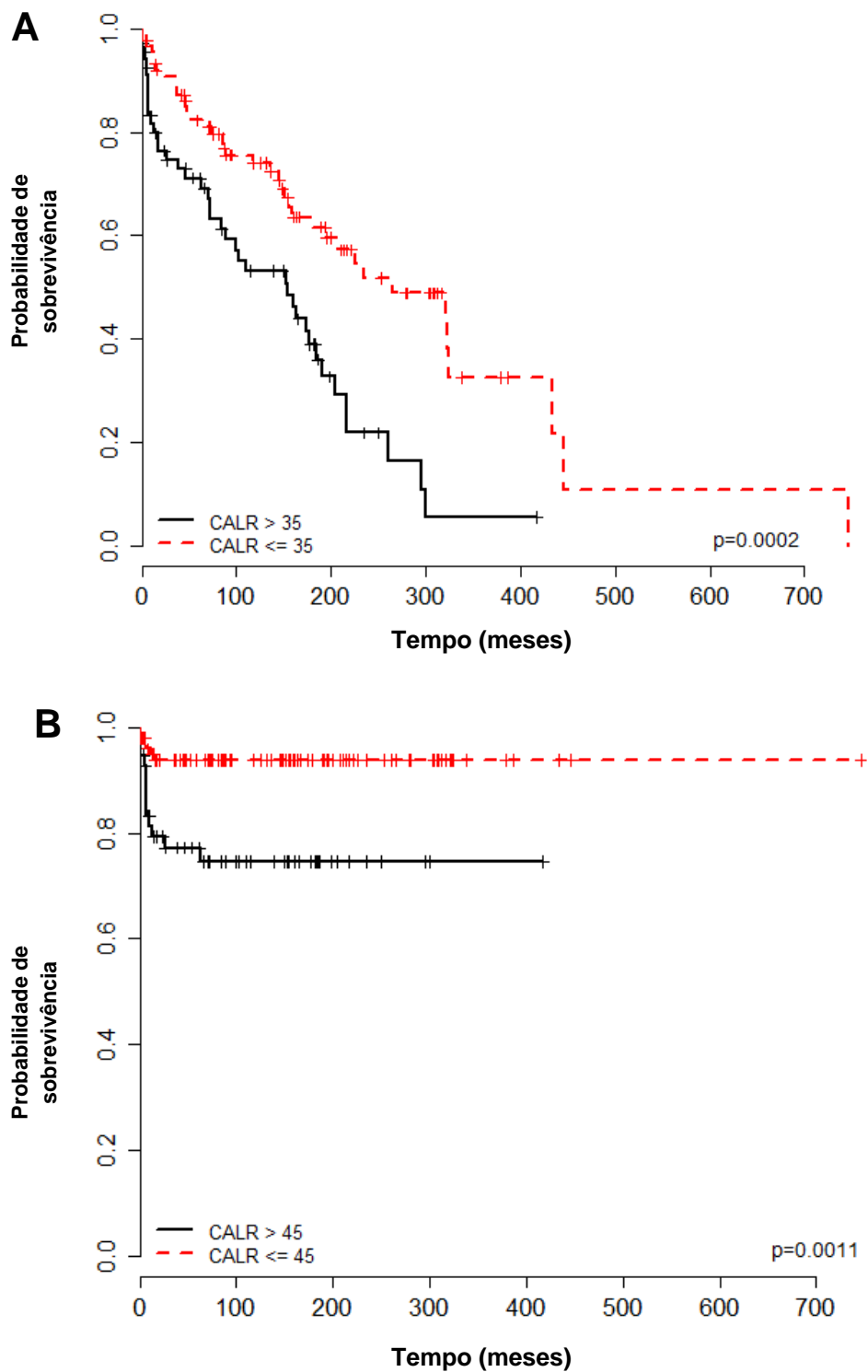


**Figura 20** - Avaliação imunoistoquímica da Calreticulina, nos tecidos parafinados de Carcinoma Penianos *versus* controles. Sendo considerado significativo valor de  $p < 0,05$ ; teste U de Mann-Whitney. CaPe-Carcinoma Peniano.





**Figura 21** - Estimativa do ponto de corte para o Hscore da Calreticulina para as análises de sobrevivência nos casos de amostras de Carcinoma Peniano parafinados. Em (A), sobrevida global e em (B) sobrevida câncer específica (*Software R*, versão 3.3.3).



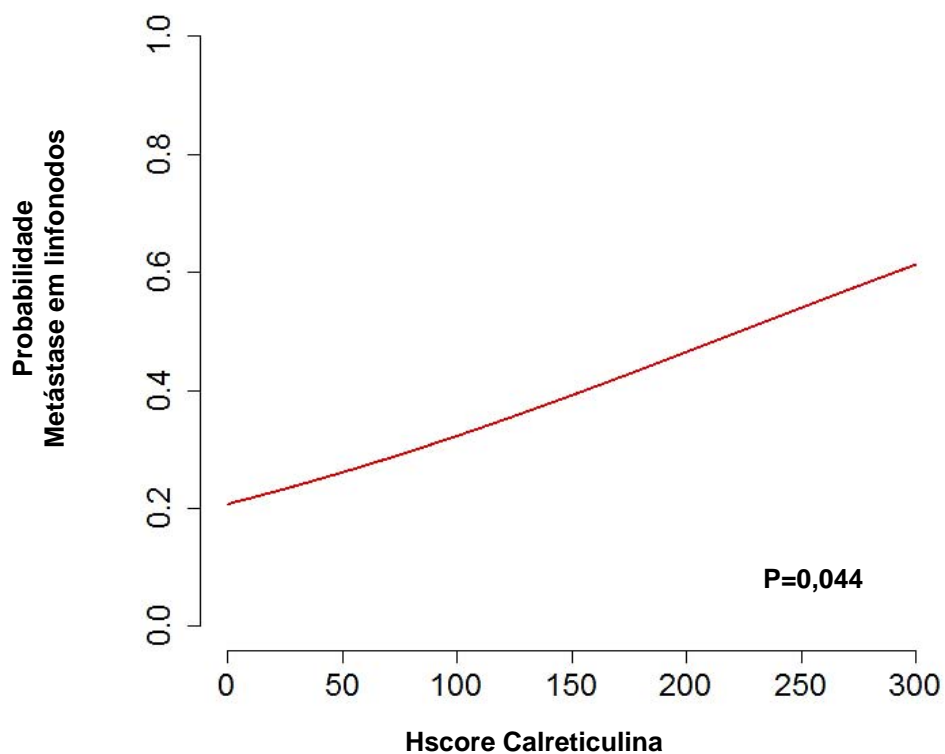
**Figura 22** - Curvas de sobrevivências em função da imunoreatividade da Calreticulina nos casos amostras de Carcinomas Penianos parafinados. Em (A), sobrevida global e em (B), câncer específica (Software R, versão 3.3.3, valor  $p < 0,05$ , teste Log-Rank). CALR-Calreticulina

**Tabela 12** - Estimativas dos parâmetros do modelo de regressão de Cox (sobrevida global), em pacientes com Carcinoma Peniano.

<b>Modelo</b>	<b>Razão de risco</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P Valor</b>	
Regressão de Cox simples				
Grau histológico				
=bem diferenciado (referência)	-	-	-	0,111
=moderadamente diferenciado	1,338	0,725	2,469	0,866
=pouco diferenciado	1,774	1,025	3,072	0,056
Invasão Vascular=presente	1,357	0,778	2,367	0,282
Invasão Perineural=presente	2,234	1,343	3,714	<b>0,002</b>
Metástases em linfonodos=presente	3,589	2,237	5,759	<b>&lt;0,001</b>
Estadiamento clínico=IIIa	4,187	1,744	10,050	<b>0,001</b>
Imunoreatividade de Calreticulina=>35	2,303	1,458	3,638	<b>&lt;0,001</b>
Regressão de Cox múltipla				
Metástases em linfonodos=presente	26,034	5,327	127,227	<b>&lt;0,001</b>
IC-Intervalo de confiança				

**Tabela 13** - Estimativas dos parâmetros do modelo de regressão de Cox (sobrevida câncer específica), em pacientes com Carcinoma Peniano.

<b>Modelo</b>	<b>Razão de risco</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P Valor</b>	
Regressão de Cox simples				
Grau histológico				
=bem diferenciado (referência)	-	-	-	<b>0,011</b>
=moderadamente diferenciado	1,59	0,27	9,54	0,610
=pouco diferenciado	6,18	1,40	27,20	<b>0,004</b>
Invasão Vascular=presente	2,08	0,78	5,54	0,163
Invasão Perineural=presente	2,30	0,89	5,96	0,090
Metástases em linfonodos=presente	16,06	5,27	48,91	<b>&lt;0,001</b>
Estadiamento clínico=avançado*	8,41	2,37	29,84	<b>&lt;0,001</b>
Imunoreatividade de Calreticulina=>45	4,37	1,66	11,51	<b>0,002</b>
Regressão de Cox múltipla				
Metástases em linfonodos=presente	14,18	3,29	61,12	<b>&lt;0,001</b>
IC-Intervalo de confiança				
*IIIa, IIIb e IV, quando agrupados,				



**Figura 23** - Probabilidade de ocorrência de metástases em linfonodos em função do Hscore da proteína Calreticulina em amostras de Carcinoma Peniano parafinadas. Calculada a partir do Modelo de regressão logística simples, software R, versão 3,3,3; P=0,044.

## 5 DESAFIOS ANALÍTICOS ENFRENTADOS

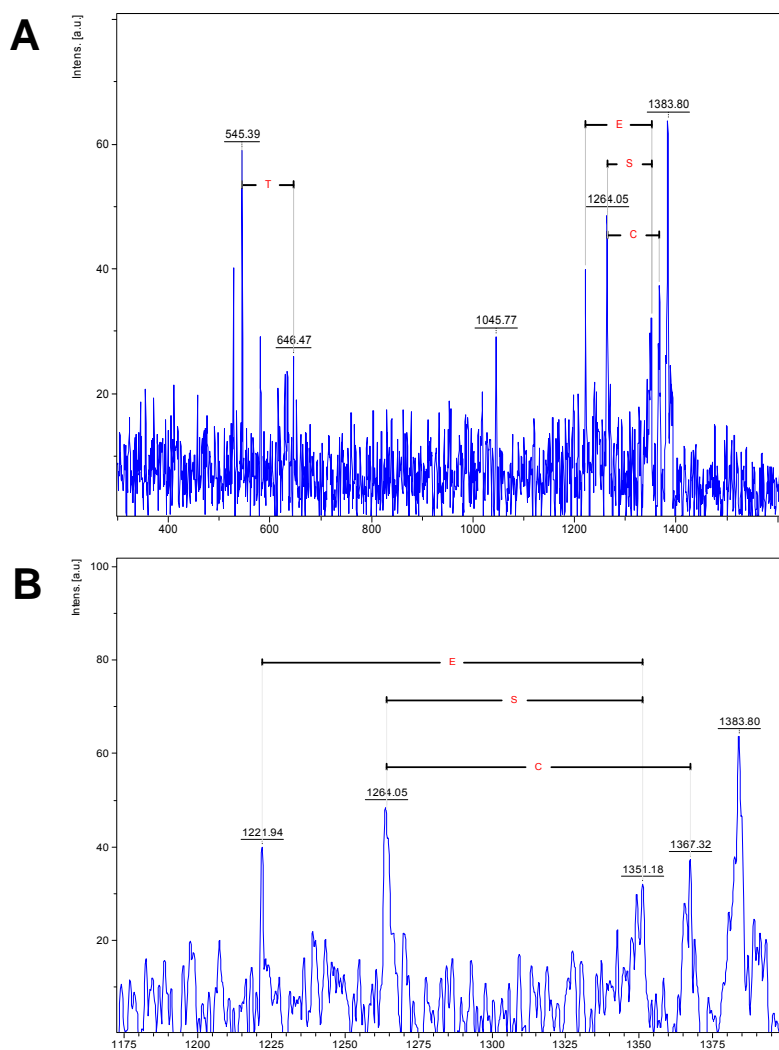
Durante a vigência do projeto a principal dificuldade foi a padronização de um método eficiente de MS/MS diretamente do tecido. Estratégias *topdown*, como o ISD (Do inglês “Ion source Decay”) e *bottom up*, como LIFT<sup>TM</sup> com auxílio do CID (Do inglês “Collision-Induced Dissociation”), foram conduzidas nas amostras de CaPe. Além disso, a aplicação da matriz por *hand spot* também foi realizada, com o intuito de aumentar a protonação dos analitos e intensidade de sinal, apesar da perda de localização espacial. Contudo, de uma maneira geral, a qualidade da fragmentação ficou aquém do esperado em todas as condições citadas acima (Dados não apresentados).

Uma vez que falhas na detecção do íon precursor foram constantes, uma possível alternativa para contornar este problema seria o uso do equipamento em modo “*fragments only*”. Neste método a mensuração do íon precursor é omitida e o imageamento por MS/MS inicia-se diretamente em módulo de fragmentação. De tal maneira que ocorre uma varredura de peptídeos previamente conhecidos, gerando imagens a partir de um fragmento específico de um precursor selecionado pelo *íon gate*.

Para tanto, as lâminas ITO foram previamente submetidas ao protocolo estabelecido de digestão *in situ* seguido de pulverização de matriz de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (7 mg/mL; 50% ACN em 0,1%TFA), com auxílio do ImagePrep<sup>TM</sup>. O método analítico de fragmentação foi criado e

otimizado para esta análise, ativando-se o modo “measure fragments only”. Sendo utilizados os seguintes parâmetros: acumulação de 2000 disparos, movimentação *random walk*, 200  $\mu\text{m}$  *raster width*, LIFT™ positivo, intensidade do laser constante a 80%. A massa do íon parental foi adicionada na janela de *Sequence properties*, ainda no software flexImaging (Bruker ®). Posteriormente, as regiões do tecido foram delimitadas e a corrida iniciada. A sequência foi analisada no software Flexanalysis (Bruker ®), no qual os picos foram normalizados e ruídos removidos com auxílio do método *Imaging\_FA33\_Small\_Molecules.FALIFT*.

A aplicação desta estratégia também resultou em limitações: pouca abundância de picos, baixa intensidade de sinal e uma elevada relação sinal/ruído. Por conseguinte, não foi possível realizar o sequenciamento das proteínas, apesar de alguns aminoácidos terem sido anotados. Um exemplo da aplicação do método pode ser visualizado na Figura 24, o espectro foi obtido partir da fragmentação da massa 1410,86 Da, relacionada à proteína Calreticulina.



**Figura 24** - Espectro adquirido a partir da fragmentação da massa parental 1410,86 Da, referente à proteína Calreticulina. Foi utilizado o modo *fragments only* em tecidos de carcinoma peniano (A), em maior aumento a faixa anotada de fragmentos obtidos entre m/z 1175 e 1375.

## 6 DISCUSSÃO

No presente estudo, a Calreticulina (CRT) mostrou-se um potencial biomarcador de valor clínico em CaPe. Este resultado é inédito para esta neoplasia. A CRT já foi estudada e demonstrou-se seu valor em outras neoplasias, como do pâncreas (SHENG et al. 2014), mama (LWIN et al. 2010) e estômago (CHEN et al. 2009). Nestas níveis elevados desta proteína nas células neoplásicas estavam associados a pior prognóstico.

A CRT é uma proteína de múltiplas funções, localizada predominantemente no Retículo Endoplasmático (RE), local onde desempenha um papel chave na homeostase dos íons de cálcio e nas etapas finais da síntese proteica (dobramento e montagem), sendo considerada uma das principais chaperonas desta organela (LU et al. 2015). Esta atividade de chaperona é realizada principalmente pelo domínio N-terminal da proteína, que também é formada por outros dois domínios: o domínio P, rico em prolina, compõe a estrutura da proteína e possui alta afinidade com os sítios de interações do  $\text{Ca}^{2+}$ , e o domínio C-terminal, que contém uma sequência KDEL responsável pela recuperação e/ou retenção da CRT no RE (GOLD et al. 2010; WANG et al. 2012).

A capacidade de translocação da CRT para fora do RE, incluindo a superfície celular e compartimentos extracelulares, é atualmente bem reconhecida na literatura (GOLD et al. 2010). Este fato faz da CRT uma proteína muito versátil, permitindo sua participação em diversas funções



biológicas, como adesão celular (COPPOLINO et al. 1997), proliferação celular (YI et al. 2016), angiogênese (SHU et al. 2014) e resposta imune (DE BRUYN et al. 2015).

Mecanismos de adesão à matriz extracelular sustentam a vida multicelular, e são predominantemente mediados por uma família de receptores de membrana chamados integrinas (HAMIDI et al. 2016). A CRT pode modular a adesão celular ligando-se ao domínio C-terminal citoplasmático da integrina (DU et al. 2009) ou regulando a expressão gênica de proteínas associadas à adesão focal, como fibronectina e vinculina, por meio de vias de sinalização do RE para o núcleo (JOHNSON et al. 2001; VILLAGOMEZ et al. 2009). No câncer, os mecanismos mediados pela integrina são explorados pelas células tumorais para promover invasão, propiciando um microambiente favorável para o crescimento tumoral e metástase (HAMIDI et al. 2016). YI et al. (2016) demonstraram que, quando a superexpressão de CRT era induzida por transfecção de plasmídeo, células de leucemias humanas (HL-60) aumentavam a habilidade de invasão. Enquanto que a hiporregulação da CRT por RNA de interferência resultou na inibição da proliferação das células HL-60.

A desregulação da proliferação celular sustenta o crescimento tumoral. Muitos estudos têm evidenciado que a manipulação dos níveis de CRT afeta significativamente a proliferação celular em diversos tipos de células tumorais (LU et al. 2015; FENG et al. 2015). Em linhagens de células de carcinoma de esôfago, níveis elevados de CRT promoveram ativação de uma via reguladora do ciclo celular, a via do PI3K/AKT (DU et al. 2009).

Previamente, outro grupo de pesquisa teve como achado o aumento de níveis da CRT em relação ao tecido adjacente normal, por análises de gel 2D em pacientes diagnosticados com esta mesma neoplasia (NISHIMORI et al. 2006).

A CRT no contexto intracelular está associada ao pior prognóstico em diversos tipos de câncer (EGGLETON et al. 2016). Conforme discutido, o aumento da capacidade de invasão e proliferação celular mediada pela CRT pode justificar a aquisição de um fenótipo mais agressivo nos tumores, contribuindo para o surgimento de metástases. Dessa forma, não é incomum a correlação positiva entre níveis de CRT e prognóstico desfavorável em vários tumores.

Em nosso estudo, níveis elevados de CRT esteve associada significativamente com um menor tempo de sobrevida global e câncer específica, sendo a probabilidade de sobreviver em 5 anos estimada em 0,7 e 0,8, respectivamente. Em contrapartida, o risco de morte associado ou não à doença foi quase zero naqueles pacientes cujos tumores apresentaram níveis baixos de CRT. As análises de sobrevivência também indicaram que a presença de metástase em linfonodos aumentou em mais de 10 vezes o risco de óbito por câncer e, na análise multivariada, foi a única variável considerada como fator prognóstico independente nesta casuística. Ou seja, é a variável que melhor estimou a sobrevida dos pacientes, tanto no contexto global como em relação ao óbito decorrente da doença. Em uma série de 83 pacientes diagnosticados com CaPe, LOPES et al. (2002) também evidenciou uma diminuição significativa do tempo de sobrevida em

função do status linfonodal. O risco de óbito por câncer relacionado com esta variável também se manteve elevada em pacientes acometidos por CaPe, mesmo após a recorrência da doença (RIEKEN et al. 2014).

De fato, a presença de metástase em linfonodos é reconhecida como o fator prognóstico mais relevante na prática clínica para o CaPe (DA COSTA et al. 2015). O tratamento do CaPe é baseado na excisão do tumor primário e, se a presença de metástase em linfonodos for confirmada, os pacientes são submetidos à remoção radical dos linfonodos regionais e/ou pélvicos (linfadenectomia), dependendo de outros parâmetros patológicos (SHABBIR et al. 2014). Embora seja o procedimento mais efetivo para tratar estas metástases, as linfadenectomias são acompanhadas de elevadas taxas de morbidade (BOUCHOT et al. 2004).

Em cerca de 50% dos casos de CaPe que apresentam confirmação clínica de presença de linfonodos metastáticos (linfonodos palpáveis), não há evidências histopatológicas de tumor (GUIMARÃES et al. 2011). Em contrapartida, de 10% a 20% dos pacientes apresentam metástases ocultas, mesmo quando clinicamente foram considerados livres de comprometimento linfonodal (HORENBLAS et al. 2016). Não há alternativas na prática clínica que possam evitar a ocorrência desses falsos positivos e negativos. Mesmo exames de imagem, como o  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT, apresentam baixa sensibilidade (56%) na detecção de micrometástases (SADEGHI et al. 2012).

Neste contexto, a identificação de fatores prognósticos no tumor primário capazes de prever a presença de metástase em linfonodos

auxiliaria na seleção dos pacientes para os tratamentos mais agressivos (GUIMARÃES et al. 2011). Mais ainda, evitaria a ressecção desnecessária de linfonodos e conseqüentemente o risco de complicações. No presente trabalho, a imunoreatividade da CRT, mensurada pelo Hscore, apresentou um potencial significativo na predição de metástases em linfonodos ( $P=0,04$ ; Regressão logística).

Muitos marcadores moleculares foram investigados em relação à predição de progressão da doença, no entanto, nenhum deles foi inserido na rotina clínica até o presente momento (THOMA 2016). Em um desses estudos, HARTZ et al. (2016) avaliaram o potencial dos microRNAs (miR), que são reguladores da expressão gênica, em predizer a presença de metástases nos linfonodos em CaPe. Eles analisaram a expressão de um painel de miRs em 24 amostras de tumores primários, sendo 11 casos não metastáticos e 13 metastáticos. Neste último grupo, o produto da ressecção dos linfonodos inguinais metastáticos também foi avaliado. Os níveis de expressão do miR-1, miR-101 e miR-204 estavam reduzidos nos tumores metastáticos primários e também em seus respectivos linfonodos, quando comparado aos tecidos onde a metástase não estava presente ( $P<0,05$ ). Além disso, a hipoexpressão desses três miRs foram correlacionados com menor tempo de sobrevida.

Trabalhos publicados em nossa instituição também têm demonstrado o potencial de alguns marcadores na seleção de pacientes com maior risco de progressão tumoral. A imunoreatividade da proteína p53 foi considerada um fator prognóstico independente para a presença de metástase em

linfonodo (LOPES et al. 2002). GUIMARÃES et al. (2006) evidenciaram que o padrão histológico do fronte de invasão foi capaz de estimar o risco de desenvolvimento de metástase em linfonodos em pacientes com CaPe. Este fator histológico parece ser importante até na predição de sobrevida nos pacientes que não apresentam linfonodos comprometidos (AITA et al. 2015). Estudando marcadores de Transição Epitélio-Mesênquima (TEM), WERNECK et al. (2016) mostrou que a ocorrência do fenótipo completo da TEM está diretamente associada com pior prognóstico, incluindo metástase em linfonodos. A imunoreatividade da proteína Superóxido-Desmutase 2 (SOD2), também foi capaz de predizer a presença de metástases em linfonodo em uma série de 125 tumores penianos, tipo usual (TERMINI et al. 2015).

Enquanto a localização citoplasmática da CRT tem sido correlacionada com pior prognóstico em diversos tumores, a sua presença na membrana e na matriz extracelular parece desencadear mecanismos imunogênicos que poderiam contribuir para a eliminação do tumor. Dentro deste grupo destacam-se: mecanismos de reconhecimento de células alvo mediada por linfócitos T citotóxicos, ativação do sistema complemento e indução de apoptose via complexo TRAIL-DISC (MICHALAK et al. 2009; DE BRUYN et al. 2015). Estas funções não apenas justificam a correlação positiva entre melhor prognóstico e níveis elevados da proteína em determinados tipos de tumor, como próstata (ALUR et al. 2009) e Pulmão (LIU et al. 2016), como fazem da CRT um possível alvo terapêutico (EGGLETON et al. 2016).

O potencial uso da CRT como fator prognóstico e preditivo de metástase linfonodal demonstrado em nosso estudo abriu uma nova oportunidade de pesquisas clínicas na instituição, que poderá validar nossos achados em um grupo maior de amostras de CaPe. Além de gerar insumos para a utilização deste marcador como possível alvo terapêutico para a doença.

A escolha da CRT como principal alvo do estudo foi amparada inicialmente pelos interactomas elaborados em etapas anteriores do projeto. Estes mapas de interações também destacaram proteínas significativamente associadas com mecanismos celulares essenciais para sobrevivência e progressão tumoral.

A proteína 14-3-3 Sigma (14-3-3  $\sigma$ ), codificada pelo gene SFN, apresentou interações de primeiro grau com redes proteicas relacionadas à movimentação celular e resposta inflamatória que podem contribuir para o processo de invasão tumoral. A 14-3-3  $\sigma$  foi o segundo alvo selecionado e apresentou níveis elevados nos tumores penianos quando comparado aos controles pelas análises de gel 2D.

Assim como os outros membros da família 14-3-3, a isoforma  $\sigma$  atua ligando-se a resíduos fosforilados de serina/treonina de proteínas alvo, modulando suas funções (SHERBET 2013). Uma vez que a fosforilação e desfosforilação de proteínas constituem um mecanismo chave na transdução de sinal de diversas vias celulares, este grupo de proteínas acaba regulando um amplo espectro de funções biológicas, incluindo proliferação celular e progressão tumoral (FREEMAN e MORRISON 2011).

Por muitos anos a 14-3-3  $\sigma$  foi reconhecida apenas como supressora tumoral, pelo seu envolvimento positivo na regulação da proteína p53 e na mediação do checkpoint G2/M, após a ocorrência de danos no DNA. Estudos recentes também sugerem o envolvimento desta proteína na inibição da reprogramação metabólica, mecanismo adjuvante da carcinogênese (PHAN et al 2015). Contudo, seu papel no surgimento de metástase já foi evidenciado em diversos tumores (LI et al. 2009). WU et al. (2012) mostrou que a presença de 14-3-3  $\sigma$  em colangiocarcinomas estava diretamente correlacionada com metástases em linfonodos. A associação entre 14-3-3  $\sigma$  e pior prognóstico também foi demonstrada em câncer gástrico (LI et al. 2015). A habilidade de invasão dos tumores mediada pela 14-3-3  $\sigma$  parece estar associada com sua participação no processo de remodelagem do citoesqueleto de actina, importante para a migração das células metastáticas (FREEMAN e MORRISON 2011).

Proteínas associadas à resposta inflamatória também apresentaram interações com o alvo 14-3-3  $\sigma$ . A inflamação é uma das maiores fontes de sinalização pró carcinogênese. Células imunes presentes no microambiente peri-tumoral podem interagir com as células tumorais por meio de citocinas e receptores de fator de crescimento, que culminam na ativação de cascatas de transcrição gênica, como a via JAK/STAT3, promovendo a proliferação celular. Ao mesmo tempo o sistema imune também é capaz de direcionar mecanismos citotóxicos contra as células tumorais (SHALAPOUR e KARIN 2015). Assim como a proteína CRT, a atuação da 14-3-3  $\sigma$  no microambiente peri-tumoral parece promover uma ação de supressora.

INGLÉS-ESTEVE et al. (2012) demonstraram que a perda de expressão da 14-3-3  $\sigma$  estava diretamente associada com a capacidade de metástase em células de tumores de mama, por meio da regulação negativa do NF-KB, uma via de transcrição gênica que pode ser ativada pelo infiltrado de linfócitos T.

Em nossa casuística, 64% dos 45 casos genotipados para o HPV apresentaram variantes virais de alto risco. Esta associação não é incomum na literatura, que refere que cerca de 50% dos casos CaPe são relacionados ao HPV (BACKES et al. 2009; CALMON et al. 2011). Embora o *status* do HPV não tenha um valor prognóstico estabelecido (HERNANDEZ et al. 2014; DE SOUSA et al. 2015), é sabido que alguns estudos sugerem que a presença viral poderia conferir um efeito protetor nos pacientes com CaPe e também em pacientes acometidos por carcinomas de orofaringe (WEINBERGER et al. 2006; DJAJADININGRAT et al. 2015).

Em nosso estudo não foi possível encontrar evidências clínicas que comprovassem tal hipótese, visto que o *status* do HPV não influenciou os parâmetros clinicopatológicos, incluindo àqueles que indicariam progressão da doença, como a presença de metástase em linfonodos. Isto se deve, possivelmente ao baixo número amostral. Contudo, analisando o mapa de interações proteicas elaborado de acordo com o *status* do HPV, nota-se que o nível mais alto de conexões foi obtido entre proteínas hiporreguladas em CaPe HPV positivo, ou seja, presentes em elevados níveis nas amostras HPV negativas, e aquelas relacionadas com resistência à apoptose e sobrevivência celular. Outros mecanismos estiveram no ponto central de



interações com proteínas com níveis elevados em CaPe HPV negativo, como perda de adesão celular e ganho de ação antioxidante, que contribuiriam para a metástase e resistência ao stress oxidativo, respectivamente (YILMAZ et al. 2007; DANG 2012).

Alterações metabólicas sustentam o crescimento e sobrevivência das células tumorais, induzindo a produção de ATP por glicólise aeróbica, mesmo em condições de hipóxia. O stress oxidativo resultante do metabolismo tumoral alterado promove uma mudança na habilidade das células em lidar com espécies reativas de oxigênio (GUARAGNELLA et al. 2014). Nesse contexto, a capacidade antioxidante da célula tumoral vai influenciar profundamente sua resposta ao stress metabólico, protegendo-a da morte induzida por stress oxidativo e, conseqüentemente, ocasionando resistência à terapia associada ao aumento de antioxidantes (DANG 2012). Os aspectos moleculares envolvidos no controle redox da célula tumoral e a carcinogênese mediada pelo HPV vêm sendo estudados por diversos grupos de pesquisa (DE MARCO et al. 2012; DE MARCO 2013; WILLIAMS et al. 2014; FOPPOLI et al. 2014).

O possível efeito protetor induzido pela presença do HPV nas amostras de CaPe, poderia ser explicado pela imunovigilância contra antígenos virais específicos de células tumorais e aumento dos níveis da proteína supressora de tumor p16<sup>INK4a</sup>, mediada pela oncoproteína viral E7 (PAI e WESTRA 2009; TOLSTOV et al. 2014). Além disso, WILLIAMS et al. (2014) demonstrou *in vitro* que a expressão da oncoproteína viral E6 aumentou o stress oxidativo e induziu danos no DNA nas células

hospedeiras de carcinomas cervicais. A expressão de E6 nas culturas de células tumorais HPV positivo também foi relacionada com uma diminuição de expressão de proteínas antioxidantes, como a Glutathione Peroxidase. Assim, tumores HPV positivos estariam mais susceptíveis a morte celular, proporcionando menor chance de progressão tumoral e prognóstico favorável neste grupo de tumores.

Neste contexto, nossos achados proteômicos corroboram com a hipótese de que a ausência da infecção viral seria um fator facilitador da progressão tumoral em CaPe, visto que muitas vias de sinalização relacionadas ao avanço da doença estavam hiperreguladas neste grupo, incluindo agentes antioxidantes. Estes facilitariam a ocorrência de fenótipos mais agressivos da doença.

Agentes antioxidantes representaram cerca de 30% das proteínas presentes em níveis elevados nas amostras de CaPe HPV negativo. Deste grupo destacamos membros da família das peroxiredoxinas, cujos efeitos anti-apoptóticos já foram descritos na literatura (LI et al. 2013). Outra proteína com atividade antioxidante e abundante em CaPe HPV negativo foi a Glutathione-S-Transferase P1 (GST), cujo aumento da atividade está associado à resistência a quimioterápicos, como a cisplatina e agentes alquilantes em tumores de mama (O'REILLY et al. 2015), pulmão, ovário e oral (LABORDE 2010).

A GST já foi identificada em tumores penianos associados ao HPV (KOIFMAN et al. 2014). Esta proteína faz parte de uma família de enzimas mais conhecidas por seus efeitos protetores em condições de stress

oxidativo intracelular (SINGH 2015). Além disso, quando inativada em cultura de células de mama, prejudica a carcinogênese por meio de alterações no metabolismo energético da célula tumoral, levando à diminuição da produção de ATP e da sinalização oncogênica mediada pela via mTOR (LOUIE et al. 2016).

Neste contexto, a hiporregulação da GST encontrada nas amostras de CaPe HPV positivas, poderia indicar um mecanismo molecular plausível para justificar a associação entre a infecção pelo HPV e melhor prognóstico em tumores penianos, conforme discutido anteriormente (LONT et al. 2006; DJAJADININGRAT et al. 2015). A análise *in situ* do alvo peptídico referente à GST não implicou em correlações clínicas significativas que pudessem sugerir uma associação prognóstica desta proteína em nossa casuística de acordo com o *status* do HPV. Por outro lado, adicionou um fato relevante para o estudo: indícios de que níveis elevados de GST no CaPe parece ser originária, sobretudo, do microambiente peri - tumoral.

O microambiente tumoral também expõe células não malignas a níveis elevados de espécies reativas de oxigênio. A resposta adaptativa dessas células ao stress oxidativo pode incluir o aumento nos níveis intracelulares das glutations, um dos maiores agentes antioxidantes da célula (KHRAMTSOV e GILLIES 2014). Tal condição justificaria o aumento da intensidade de sinal da GST no microambiente peri-tumoral do CaPe quando comparado à região tumoral. Esta observação também pode explicar o aumento significativo da intensidade de sinal da GST nos controles. Uma vez que nas análises *in situ* por imageamento o

microambiente peri - tumoral foi negligenciado devido à utilização apenas das regiões tumorais delimitadas, podendo ter ocasionado uma associação falso-positiva.

A capacidade de evasão de sinalizações pró-apoptótica é considerada um dos pilares do câncer. Uma das estratégias mais comuns utilizadas pelos tumores para este fim é a perda da função do gene supressor tumoral TP53, resultando em distúrbios no controle de danos no DNA e conseqüente eliminação de um dos mecanismos indutores de apoptose. Alternativamente, os tumores também podem aumentar os níveis de proteínas anti-apoptóticas (HANAHAN e WEINBERG 2011). A proteína Serpina B5 (SB5), hiporregulada nos tumores HPV positivos, apresentou conexões de primeiro grau com proteínas relacionadas aos mecanismos acima citados, sendo escolhida também como alvo do estudo.

Serpinas constituem um grupo de proteínas com estruturas moleculares semelhantes reconhecidas pela função de inibidor de proteases. A SB5, também é conhecida como Maspin (Do inglês “Mammary Serine Proteinase Inhibitor”). Ela foi inicialmente definida como supressora tumoral, pela sua ação inibitória na migração celular, angiogênese e metástase (SILVERMAN et al. 2001). Esta função poderia justificar o fato do peptídeo referente à Serpina ter apresentado maior intensidade de sinal no tecido livre de neoplasia, quando as imagens moleculares foram visualmente comparadas ao grupo de tumores.

Ainda existe muita controvérsia relacionada ao papel da Serpina na carcinogênese. MENG et al. (2015) mostrou que a hiporregulação da SB5

está associada com a redução de susceptibilidade de desenvolver câncer de esôfago, tanto em cultura de células como nos tecidos saudáveis. Entretanto, outros estudos recentes demonstraram que para certos tipos de tumores a SB5 pode desempenhar uma ação inversa. Numa série de 46 pacientes diagnosticadas com adenocarcinoma uterino, NOSAKA et al. (2015) mostrou que as menores taxas de sobrevivência estavam correlacionadas com o *status* de positividade citoplasmática da SB5. Evidências na literatura têm sugerido que a localização da SB5 (nuclear ou citoplasmática) está diretamente relacionado com sua ação nos tumores (JOENSUU et al. 2009).

De uma maneira geral, as análises *in situ* por imageamento não demonstraram diferenças nas intensidades de sinal dos alvos peptídicos, em relação aos parâmetros clínicos avaliados. Diante de tal situação, falhas no processamento analítico devem ser consideradas. Sabe-se que algumas biomoléculas são preferencialmente protonadas durante a etapa de ionização, apresentando-se em elevada abundância no espectrograma, em detrimento de outras, que podem apresentar-se com intensidades relativamente mais baixas em relação às suas verdadeiras concentrações na amostra. Tal fenômeno é conhecido como “supressão de sinal”. Dessa forma, embora as intensidades relativas de uma proteína possam ser comparadas entre amostras, a reprodutibilidade destas comparações pode ser prejudicada, pois a eficiência de ionização pode ter diferido entre os preparos destas amostras (SEELEY e CAPRIOLI 2008).

A heterogeneidade intrínseca das amostras biológicas e a expansão clonal das células tumorais também podem ter contribuído para a ausência

de correlação. Ressaltamos que a rarefação de amostras congeladas de CaPe e o esgotamento de alguns casos nas etapas iniciais do estudo determinaram casuísticas específicas para cada técnica aplicada. Por conseguinte, nossa casuística foi formada por pacientes de diversas regiões do país. Muito embora tal situação não tenha resultado em elevada discrepância nas características clinicopatológicas, diferenças moleculares que não são visíveis na histologia clássica podem ter sido reveladas pelo imageamento molecular (DEININGER et al. 2008).

Na casuística final, houve predominância de pacientes acima de 45 anos, tanto no grupo composto por tecidos congelados quanto por parafinados. Um estudo epidemiológico publicado por CHRISTODOULIDOU et al. (2015) mostrou que a incidência de CaPe aumenta com a idade, sendo o intervalo de 50 a 70 anos o que apresenta as maiores taxas de acometimento, mesmo quando considerado diferentes raças e grupos étnicos. No entanto, a presença de pacientes abaixo dos 35 anos não é infrequente no Brasil (FAVORITO et al. 2008; COUTO et al. 2014). Em nosso estudo cerca de 25% dos pacientes tinham entre 24 e 38 anos. Este fato reafirma a importância de ações públicas que possam investigar lesões suspeitas na população de adultos jovens, a fim de aumentar o diagnóstico precoce do CaPe.

Dentro dos subtipos histológicos utilizados no estudo, o carcinoma epidermoide, tipo usual, foi a principal variante na casuística final. Esteve presente em 100% os tecidos congelados e em 75% dos casos inclusos no TMA. Estudos epidemiológicos têm indicado que o carcinoma epidermoide

do tipo usual costuma ser a variante mais presente nos casos de tumores penianos (GUIMARÃES et al. 2009).

Estágios avançados da doença (T2-T3) prevaleceram nos grupos de tecidos congelados, com presença de metástase em linfonodos em torno de 50%. Tal situação pode ser explicada pelo diagnóstico tardio do CaPe, sobretudo pela falta de informação da população que busca atendimento médico quando o grau de acometimento já se encontra elevado. Outros estudos nacionais evidenciaram estágios avançados do CaPe e sobrevida geral baixa (KOIFMAN et al. 2011; COUTO et al. 2014). A maior parte dos tumores penianos deste grupo apresentaram-se com padrão bem diferenciado, sendo a glândula o sítio anatômico mais frequente, comumente associada ao prepúcio e corpo peniano. Este perfil de localização do CaPe se repete em outros trabalhos (FAVORITO et al. 2008; COUTO et al. 2014; KOIFMAN et al. 2014).

O estadiamento da doença está relacionado principalmente ao grau de diferenciação e número de sítios anatômicos comprometidos (VELAZQUEZ et al. 2008). Nas amostras incluídas no TMA, a metástase em linfonodos só esteve presente em 26% dos casos e teve maioria de estágios iniciais da doença (T1a-T1b). Contudo, neste grupo, a invasão do corpo cavernoso estava presente em quase metade dos casos. Tal ocorrência tem sido associada a um pior prognóstico (SHABBIR et al. 2014). Outro parâmetro clínico que influencia o prognóstico, embora não seja considerado para o estadiamento da doença, é o grau histológico (GUIMARÃES et al. 2011).

Em nosso estudo, dos 158 casos adicionados ao grupo de tecidos parafinados, cerca de 40% correspondiam a tumores pouco diferenciados. Em contrapartida, na casuística de tecidos congelados, houve prevalência de tumores bem diferenciados. O grau de diferenciação celular está comumente relacionado à progressão tumoral e, conseqüentemente, influencia a sobrevida dos pacientes. Em CaPe, tumores pouco diferenciados foram significativamente associados ao aumento da incidência de metástase linfonodal e mortalidade (GUIMARÃES et al. 2009). Todavia, há relatos na literatura de tumores penianos que, apesar de caracterizados como bem diferenciados, demonstram capacidade de infiltração superior àqueles definidos como pouco diferenciados (CHAUX 2015).

Controvérsias, como as citadas acima, ainda persistem nas diversas áreas da conduta clínica dos tumores penianos, desde estratégias de prevenção e tratamento de lesões pré-malignas, até a avaliação e manejo da doença metastática (SHABBIR et al. 2014). Avanços na compreensão do CaPe ainda são limitados pela raridade da doença, que implica em séries com o número amostral reduzido, dificultando a validação dos marcadores prognósticos (THOMA 2016).

Neste cenário, nossa proposta inicial foi avaliar a utilização do MALDI *Imaging* na busca de novos biomarcadores para o CaPe. Uma vez que a proteômica clássica (ex. gel 2D e LC-MS/MS) não é capaz de refletir a distribuição espacial de proteínas no tecido, o uso do MALDI *Imaging* representaria uma estratégia eficiente para este fim. Pois obter informações



da localização de uma dada proteína é de extrema relevância para doenças complexas como o câncer (EGGELING et al. 2012).

Dentre as novas tecnologias de imageamento molecular disponíveis, o MALDI *Imaging* representa um potencial candidato para uso na rotina histopatológica. Uma revisão, publicada por MERLOS RODRIGO et al. (2014), destacou o crescente uso do MALDI *Imaging* na investigação de biomarcadores relacionados com o câncer de mama, bexiga, ovário, pulmão e gastrointestinal. Ressaltamos que na literatura há um único trabalho demonstrando a aplicação do MALDI *Imaging* em tumores penianos (FLATLEY et al. 2015).

A grande maioria das pesquisas científicas tem caracterizado o imageamento molecular por espectrometria de massas como uma ferramenta potente para distinguir subtipos histológicos e regiões intratumorais, baseando-se, sobretudo, em valores de  $m/z$ . Em um levantamento realizado por MAIER et al. (2013), das centenas de publicações envolvendo a tecnologia, apenas 22 deles apresentavam dados de identificação de proteínas.

O fato do imageamento molecular apresentar problemas para identificação das proteínas relacionadas aos valores de  $m/z$  tem originado preocupações. Questiona-se o valor geral do uso dos valores de  $m/z$  como instrumento biomarcador quando da ausência de identificação proteica (MAIER et al. 2013). Isto porque para validar e desenvolver uma ferramenta útil na rotina clínica é imprescindível conhecer a identidade do biomarcador.

A identificação *in situ* de proteínas direto por MALDI *Imaging* MS/MS é possível, porém muito difícil (LONGUESPÉE et al. 2016). Em nosso trabalho, todas as estratégias falharam na obtenção de dados de MS/MS com padrões de fragmentação eficientes para o sequenciamento de proteínas e, conseqüentemente, confirmação dos achados da análise *in situ* por MALDI *Imaging*. Por conseguinte, a co-localização dos peptídeos trípticos teóricos e a imunistoquímica foram as únicas técnicas utilizadas com sucesso para confirmação da identidade das proteínas por meio dos peptídeos experimentais alvo.

Existem algumas razões analíticas que podem justificar a incapacidade da técnica em identificar proteínas. A primeira delas é o fato da mensuração de uma massa proteica ou de seus fragmentos pelo MALDI *Imaging* não ser um bom indicador para revelar a identidade da proteína. Isto ocorre, pois tal massa pode ter sido gerada por qualquer sequência proteica próxima, haja vista que a acurácia deste tipo de experimento costuma variar de 1 a 2 (MAIER et al. 2013). Dessa forma, a acurácia da técnica não acompanha a complexidade da amostra biológica, composta por diversos analitos co-localizados em um mesmo ponto da secção tecidual. Além da acurácia, a sensibilidade e resolução dos instrumentos em modo MS/MS ainda precisam de aprimoramentos para possibilitar, inclusive, a identificação de proteínas presentes em baixa estequiometria (MERLOS RODRIGO et al. 2014).

O enfrentamento de dificuldades na aquisição de espectros de MS/MS diretamente do tecido nos levaram a acoplar outras técnicas

analíticas ao imageamento molecular. Na estratégia desenvolvida, proteínas foram extraídas de tecidos congelados penianos, separadas por gel 2D e identificadas por LC-MS/MS. Análises de bioinformática serviram de base para seleção de alguns alvos proteicos. Em seguida, estes alvos pré-determinados foram analisados por MALDI TOF/TOF. Os peptídeos tripticos identificados foram correlacionados aos dados de MS do MALDI *Imaging*, permitindo a visualização da distribuição espacial de quatro proteínas de valor clínico significativo. Uma correlação retrógrada, por meio do uso de eletroforese bidimensional, também foi proposta por LONGUESPÉE et al. (2014b). Este grupo desenvolveu um método para acoplar sinais de MS do imageamento com identificação de proteínas. Para tanto, as proteínas foram extraídas com auxílio do composto HexaFluoroIsoPropanol (HFIP), separadas por eletroforese 2D (CTAB-SDS-PAGE) e identificadas por MALDI TOF/TOF.

Se por um lado a estratégia proposta por nosso estudo tenha cumprido o seu propósito principal, o de permitir a análise *in situ* de peptídeos alvo pelo imageamento, por outro não foi capaz de evidenciar associações clínicas significativas. Sabendo que possíveis vieses biológicos e/ou analíticos pudessem estar relacionados ao baixo rendimento dessas análises, optamos por realizar uma análise não supervisionada amostra por amostra. Esta avaliação adicionou uma nova forma de explorar os dados adquiridos pelo MALDI *Imaging* em amostras de CaPe.

O retorno destas análises foi bastante positivo, pois os *clusters* obtidos coincidiram significativamente com as regiões tumorais e adjacentes

normais das secções teciduais. Estes dados demonstraram um potencial uso do imageamento como ferramenta diagnóstica para o CaPe. Além disso, também se mostrou eficiente para a busca de candidatos a biomarcadores, uma vez que na lista de valores diferenciais de valores de m/z foi encontrado o peptídeo tríptico da CRT, que se apresentou co-localizado nas regiões tumorais. Em seguida, os resultados das análises de PCA e Curva ROC confirmaram a capacidade desse peptídeo na distinção de regiões tumorais e não tumorais. Estes dados culminaram na escolha da CRT como alvo para a etapa de validação por imunistoquímica.

As limitações inerentes ao MALDI *Imaging* prejudicaram a definição das estratégias para alcançar os objetivos iniciais do projeto. Embora o uso do *target approach* tenha sido eficaz para a análise *in situ* dos alvos peptídicos, mostrou-se pouco útil na busca de biomarcadores da doença. Enquanto isto, a análise não supervisionada associada à correlação retrógada dos alvos peptídicos foi de grande valia neste sentido, pois resultou na indicação da CRT como potencial marcador prognóstico para o CaPe.

A avaliação exploratória realizada nos tumores penianos, por meio do MALDI *Imaging* e da proteômica clássica, servirá de base para futuras investigações em nosso grupo de pesquisa. Entre elas, a busca pela identidade proteica dos outros valores de m/z diferenciais evidenciados pelo imageamento, por meio da extração *in situ* de proteínas, seguido de separação em sistema de nanoHPLC e análises de *shotgun*. Ressaltamos que ainda não há relatos na literatura de associação entre a maioria das

proteínas diferenciais indicadas pelo gel 2D e o CaPe, estas também podem ser alvo de validações por imunohistoquímica.

Os achados clínicos relacionados à CRT adicionaram uma nova frente de trabalho para o desenvolvimento de testes prognósticos com valor clínico significativo. Todavia, sabemos que nossos dados precisam ser validados em outras séries de tumores penianos. Isto porque se tratou de um estudo retrospectivo cujos pacientes foram tratados em diferentes momentos por uma mesma instituição, fato que pode ter gerado viés de análise.

O papel imunogênico da CRT também pode ser explorado como alvo terapêutico por meio de ensaios funcionais. É importante salientar que já existem algumas linhagens celulares de tumores penianos (NAUMANN et al 2012; CHEN et al. 2016). Recentemente, uma cultura primária de tumor verrucoso de pênis foi desenvolvida e caracterizada por integrantes da nossa instituição em parceria com a Unesp (MUÑOZ et al. 2016).

E finalmente, os resultados da proteômica podem ser integrados à ferramentas de biologia molecular a fim de contribuir no delineamento da sequência dos eventos moleculares envolvidos no desenvolvimento e progressão dos tumores penianos, de acordo o *status* do HPV. Um exemplo disto seria o estudo da regulação da expressão proteica mediada pelos miRNAs. Esta integração mostra-se extremamente relevante, pois apesar das alterações no genoma serem transcritas, são eventos pós-transcricionais, que definem o proteoma, determinando o fenótipo do câncer (BOJA e RODRIGUEZ 2014).

## 7 CONCLUSÃO

O presente trabalho destacou algumas moléculas como potenciais biomarcadores, além de adicionar novas perspectivas para busca de marcadores diagnósticos, prognósticos e/ou preditivos de resposta terapêutica para o Carcinoma Peniano (CaPe). Em que pese a necessidade de aprimoramento analítico das técnicas aplicadas, nossos resultados permitiram demonstrar a utilidade do uso de uma tecnologia robusta como instrumento complementar na rotina histopatológica, a fim de evidenciar novos biomarcadores com valor clínico significativo para o CaPe.

Assim, foi possível:

- Demonstrar um padrão diferencial de níveis de proteínas em função do *status* do HPV, realizada pela proteômica clássica e bioinformática, sugerindo que as amostras de CaPe HPV-negativos parecem superexpressar genes relacionados com proteínas envolvidas na progressão tumoral.
- Demonstrar que a estratégia de integração da proteômica clássica com o MALDI *Imaging* pode representar uma ferramenta útil para avaliar a distribuição espacial de alvos pré-determinados.
- Confirmar, como alternativa útil, a identidade dos filtros proteicos, por meio da co-localização de peptídeos teóricos *in silico*.
- Evidenciar a utilidade emergente da técnica do MALDI *Imaging* na rotina histopatológica, pela elaboração não supervisionada dos mapas

de segmentação, o que permitiu não apenas delimitar com precisão as regiões tumorais e adjacentes livres de neoplasia, como também, indicar possíveis candidatos a biomarcadores, como exemplificado pela proteína calreticulina.

- Validar o valor prognóstico da calreticulina por imunistoquímica, uma vez que sua imunoreatividade esteve associada com menor tempo de sobrevida (global e câncer específica) em pacientes acometidos com o CaPe. Adicionalmente, essa imunoreatividade foi capaz de prever a presença de metástase em linfonodos, a qual configura o parâmetro mais importante na conduta clínica da doença.

Por fim, as abordagens de proteômica utilizadas neste estudo foram eficientes na avaliação exploratória do perfil proteico dos tumores penianos, auxiliando na compreensão de mecanismos moleculares envolvidos na doença, além de evidenciar a proteína calreticulina como potencial marcador prognóstico para o CaPe.

## 8 PLANO DE PUBLICAÇÃO

Uma vez que o presente estudo forneceu grande quantidade de dados, pretendemos fazer quatro publicações em separado:

- Apresentar os dados de *shotgun* e os mapas de interações protéicas obtidos pelas técnicas de proteômica clássica em 14 casos e 10 controles (eletroforese 2D, LC MS/MS) e analisadas com programas de bioinformática, conforme item 3.5. O objetivo desta publicação será o de apresentar um panorama de proteínas diferenciais no CaPe, tanto em relação ao epitélio escamoso de controle, quanto em relação ao status do HPV. Este foi o pilar central de nossa proposta inicial.
- Levando em consideração que a Calreticulina tem sido reportada na literatura como tendo valor prognóstico, relacionado à progressão tumoral, e que não há dados sobre o impacto biológico dessa proteína em CaPe, pretendemos realizar uma publicação incluindo os 158 casos de tecido parafinado organizados em TMA + 10 controles. Essa proteína foi identificada nos mapas de rede realizados no item acima, como estando em níveis elevados em carcinomas. Dentre os casos de CaPe, imunreatividade dessa proteína está relacionada com os dados clinicopatológicos de maior agressividade tumoral.
- Utilizando a análise não supervisionada baseada na razão  $m/z$  e a análise *in situ* por imageamento molecular, pretendemos publicar os dados de 21 casos + 10 controles, com o objetivo de avaliar a *performance* dessas abordagens em relação às sub-regiões definidas pela histopatologia clássica.
- Artigo de revisão discutindo as aplicações e limitações analíticas na aplicação dessas técnicas na pesquisa biomédica. Os três anos trabalhando com as mesmas, com a ajuda de vários profissionais de instituições diferentes, contornando dificuldades e solucionando problemas, permitem-nos divulgar de forma prática, informações que poderão ser úteis aos que se iniciam nesse campo.



## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aebersold R, Mann M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. **Nature** 2016; 537:347-55.

Aita G, Da Costa WH, De Cassio Zequi S, et al. Pattern of invasion is the most important prognostic factor in patients with penile cancer submitted to lymph node dissection and pathological absence of lymph node metastasis. **BJU Int** 2015; 116:584-9.

Alur M, Nguyen MM, Eggener SE, et al. Suppressive roles of calreticulin in prostate cancer growth and metastasis. **Am J Pathol** 2009; 175:882-90.

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

Bleeker MCG, Heideman DAM, Snijders PJF, et al. Penile cancer: epidemiology, pathogenesis and prevention. **World J Urol** 2009; 27:141-50.

Boja ES, Rodriguez H. Proteogenomic convergence for understanding cancer pathways and networks. **Clin Proteomics** 2014; 11:22.

Bouchot O, Rigaud J, Maillet F, Hetet JF, Karam G. Morbidity of inguinal lymphadenectomy for invasive penile carcinoma. **Eur Urol** 2004; 45:761-6.

Bravo R, Celis J. Catalog of HeLa cell proteins. In: Celis J, editor. **Two-dimensional gel electrophoresis of proteins: methods and applications**. New York: Academic Press; 1984. p.475-6.

Brown KR, Otasek D, Ali M, et al. NAViGaTOR: network analysis, visualization and graphing Toronto. **Bioinformatics** 2009; 25:3327-9.

Brunoro GVF, Ferreira AT da S, Trugilho MR de O, et al. Potential correlation between tumor aggressiveness and protein expression patterns of nipple aspirate fluid (NAF) revealed by gel-based proteomic analysis. **Curr Top Med Chem** 2014;14:359-68.

Busso-Lopes F, Marchi F, Kuasne H, et al. Genomic profiling of human penile carcinoma predicts worse prognosis and survival. **Cancer Prev Res** 2014; 8:149-56.

Calderaro A, Piergianni M, Montecchini S, et al. MALDI-TOF mass spectrometry as a potential tool for *Trichomonas vaginalis* identification. **BMC Infect Dis** 2016; 16:2-8.

Calmon MF, Tasso Mota M, Vassallo J, Rahal P. Penile carcinoma: risk factors and molecular alterations. **Sci World J** 2011; 11:269-82.

Cameron LC. Mass spectrometry imaging: Facts and perspectives from a non-mass spectrometrists point of view. **Methods** 2012; 57:417-22.

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

Caprioli RM, Farmer TB, Gile J. Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. **Anal Chem** 1997; 69:4751-60.

Cazares LH, Troyer D, Mendrinos S, et al. Imaging mass spectrometry of a specific fragment of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase kinase 2 discriminates cancer from uninvolved prostate tissue. **Clin Cancer Res** 2009; 15:5541-51.

Chaurand P. Imaging mass spectrometry of thin tissue sections: A decade of collective efforts. **J Proteomics** 2012; 75:4883-92.

Chaux A, Reuter V, Lezcano C, et al. Autopsy findings in 14 patients with penile squamous cell carcinoma. **Int J Surg Pathol** 2011; 19:164-9.

Chaux A, Velazquez EF, Algaba F, et al. Developments in the pathology of penile squamous cell carcinomas. **Urology** 2010; 76:S7-14.

Chaux A. Clinicopathologic and outcome features of superficial high-grade and deep low-grade squamous cell carcinomas of the penis. **Springer Plus** 2015; 4:248.

Chen C-N, Chang C-C, Su T-E, et al. Identification of calreticulin as a prognosis marker and angiogenic regulator in human gastric cancer. **Ann Surg Oncol** 2009; 16:524-33.

Chen J, Yao K, Li Z, Deng C. Establishment and characterization of a penile cancer cell line, pen11, with a deleterious TP53 mutation as a paradigm of HPV-negative penile carcinogenesis. **Oncotarget** 2016; 7:51687-98.

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

Cillero-Pastor B, Heeren RMA. Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry imaging for peptide and protein analyses: a critical review of on- tissue digestion. **J Proteome Res** 2014; 131:325-35.

Coblentz TR, Theodorescu D. Morbidity of modified prophylactic inguinal lymphadenectomy for squamous cell carcinoma of the penis. **J Urol** 2002; 168:1386-9.

Coppolino MG, Woodside MJ, Demaurex N, Grinstein S, St-Arnaud R, Dedhar S. Calreticulin is essential for integrin-mediated calcium signalling and cell adhesion. **Nature** 1997; 386:843-7.

Couto TC Do, Arruda RMB, Couto MC, Barros FD. Epidemiological study of penile cancer in Pernambuco: experience of two reference centers. **Int Braz J Urol** 2014; 40:738-44.

Crecelius AC, Schubert US, von Eggeling F. MALDI mass spectrometric imaging meets “omics”: recent advances in the fruitful marriage. **Analyst** 2015; 140:5806-20.

Cubilla AL, Lloveras B, Alejo M, et al. The basaloid cell is the best tissue marker for human papillomavirus in invasive penile squamous cell carcinoma: a study of 202 cases from Paraguay. **Am J Surg Pathol** 2010; 34:104-14.

Da Costa WH, Rosa de Oliveira RA, Santana TB, et al. Prognostic factors in patients with penile carcinoma and inguinal lymph node metastasis. **Int J Urol** 2015; 22:669-73.

Dang CV. Links between metabolism and cancer. **Genes Dev** 2012; 26:877-90.

De Bruyn M, Wiersma VR, Helfrich W, Eggleton P, Bremer E. The ever expanding immunomodulatory role of calreticulin in cancer immunity. **Front Oncol** 2015; 5:35.

De Marco F, Bucaj E, Foppoli C, et al. Oxidative stress in HPV-driven viral carcinogenesis: Redox proteomics analysis of HPV-16 dysplastic and neoplastic tissues. **PLoS One** 2012; 7: e34366.

De Marco F. Oxidative stress and HPV carcinogenesis. **Viruses** 2013; 5:708-31.

De Sousa IDB, Vidal FCB, Branco Vidal JPC, et al. Nascimento M, Brito LMO. Prevalence of human papillomavirus in penile malignant tumors: viral genotyping and clinical aspects. **BMC Urol** 2015; 15:13.

Deininger S-O, Ebert MP, Fütterer A, Gerhard M, Röcken C. MALDI Imaging combined with hierarchical clustering as a new tool for the interpretation of complex human cancers. **J Proteome Res** 2008; 7:5230-6.

Dierig A, Frei R, Egli A. The fast route to microbe identification. **Pediatr Infect Dis J** 2015; 34:97-9.

Diorio GJ, Giuliano AR. The role of human papilloma virus in penile carcinogenesis and preneoplastic lesions: a potential target for vaccination and treatment strategies. **Urol Clin North Am** 2016; 43:419-25.

Djajadiningrat RS, Jordanova ES, Kroon BK, et al. Human papillomavirus prevalence in invasive penile cancer and association with clinical outcome. **J Urol** 2015; 193:526-31.

Du X-L, Yang H, Liu S-G, et al. Calreticulin promotes cell motility and enhances resistance to anoikis through STAT3-CTTN-Akt pathway in esophageal squamous cell carcinoma. **Oncogene** 2009; 28:3714-22.

Dwinovan J, Colella AD, Chegeni N, et al. Proteomic analysis reveals downregulation of housekeeping proteins in the diabetic vascular proteome. **Acta Diabetol** 2016.

Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7<sup>th</sup> Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM. **Ann Surg Oncol** 2010; 17:1471-4.

Eggeling VF, Crecelius AC, Schubert US, et al. MALDI-Imaging: What can be expected? **Eur J Radiol** 2012; 81:183-4.

Eggleton P, Bremer E, Dudek E, Michalak M. Calreticulin, a therapeutic target? **Expert Opin Ther Targets** 2016; 20:1137-47.

Favorito L, Nardi C, Ronalsa M, et al. Epidemiologic study on penile cancer in brazil editorial comment. **Int Brazilian J Urol** 2008; 34:587-93.

Favorito L. Penile cancer: the Importance to predict lymph node metastasis. **Int Braz J Urol** 2016; 42:1056-7.

Feng M, Chen JY, Weissman-Tsukamoto R, et al. Macrophages eat cancer cells using their own calreticulin as a guide: roles of TLR and Btk. **Proc Natl Acad Sci USA** 2015; 112:2145-50.

Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization-principles and practice. **Mass Spectrom Rev** 1990; 9:37-70.

Ferrández-Pulido C, de Torres I, García-Patos V. Penile squamous cell carcinoma. **Actas Dermo-Sifiliográficas** 2012; 103:478-87.

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

Flatley B, Quaye C, Johnson E, et al. Distribution analysis of the putative cancer marker S100A4 across invasive squamous cell carcinoma penile tissue. **EuPA Open Proteomics** 2015; 7:1-10.

Fonseca AG da, Soares FA, Burbano RR, et al. Human Papilloma Virus: Prevalence, distribution and predictive value to lymphatic metastasis in penile carcinoma. **Int Braz J Urol** 2013; 39:542-50.

Foppoli C, De Marco F, Cini C, Perluigi M. Redox control of viral carcinogenesis: the human papillomavirus paradigm. **Biochim Biophys Acta - Gen Subj** 2014; 1850:1622-32.

Freeman AK, Morrison DK. 14-3-3 Proteins: diverse functions in cell proliferation and cancer progression. **Semin Cell Dev Biol** 2011; 22:681-7.

Gold LI, Eggleton P, Sweetwyne MT, et al. Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease. **Faseb J** 2010; 24:665-83.

Golijanin D, Tan J-Y, Kazior A, et al. Cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase-1 are overexpressed in squamous cell carcinoma of the penis. **Clin Cancer Res** 2004; 10:1024-31.

Guaragnella N, Giannattasio S, Moro L. Mitochondrial dysfunction in cancer chemoresistance. **Biochem Pharmacol** 2014; 92:62-72.

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

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

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

Hamidi H, Pietilä M, Ivaska J. The complexity of integrins in cancer and new scopes for therapeutic targeting. **Br J Cancer** 2016; 115:1017-23.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell** 2011; 144:646-74.

Hartz JM, Engelmann D, Fürst K, et al. Integrated Loss of miR-1/miR-101/miR-204 discriminates metastatic from nonmetastatic penile carcinomas and can predict patient outcome. **J Urol** 2016; 196:570-8.

Heideman DAM, Bleeker MCG, Ahmed HU, et al. Molecular biology of penile cancer. In: Muneer et al. **Textbook of penile cancer**. London: Hardcover; 2012. p.12-25.

Hernandez BY, Goodman MT, Unger ER, et al. Human papillomavirus genotype prevalence in invasive penile cancers from a registry-based United States population. **Front Oncol** 2014; 4:1-7.

Hillenkamp F, Karas M. Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization. **Methods Enzymol** 1990; 193:280-95.



Horenblas S, Minhas S, Urol F. Minimal invasive management of lymph nodes. **Urol Clin North Am** 2016; 43:449-56.

[IARC]. International Agency for Research on Cancer (CI5 I-X). **Cancer incidence in five continents-Vol X: penile cancer incidence (C60)**. 2014. Available from: <URL:[http://ci5.iarc.fr/CI5I-X/Pages/table2\\_sel.aspx](http://ci5.iarc.fr/CI5I-X/Pages/table2_sel.aspx)> [2016 out 25].

Inglés-Esteve J, Morales M, Dalmases A, et al. Inhibition of specific NF- $\kappa$ B activity contributes to the tumor suppressor function of 14-3-3 $\sigma$  in breast cancer. **PLoS One** 2012; 7:e38347.

Joensuu KM, Leidenius MHK, Andersson LC, Heikkilä PS. High expression of maspin is associated with early tumor relapse in breast cancer. **Hum Pathol** 2009; 40:1143-51.

Johnson S, Michalak M, Opas M, Eggleton P. The ins and outs of calreticulin: From the ER lumen to the extracellular space. **Trends Cell Biol** 2001; 11:122-9.

Kayes O, Ahmed HU, Arya M, Minhas S. Molecular and genetic pathways in penile cancer. **Lancet Oncol** 2007; 8:420-9.

Khramtsov V V, Gillies RJ. Janus-faced tumor microenvironment and redox. **Antioxid Redox Signal** 2014; 21:729-32.

Koifman L, Ornellas P, Ornellas AA, et al. Proteomics analysis of tissue samples from patients with squamous cell carcinoma of the penis and positive to human papillomavirus. **Int Braz J Urol** 2014; 41:642-54.

Koifman L, Vides AJ, Koifman N, Carvalho JP, Ornellas AA. Epidemiological aspects of penile cancer in Rio de Janeiro: evaluation of 230 cases. **Int Braz J Urol** 2011; 37:231-40.

Kondo T, Kawai A. A proteomics approach for the development of sarcoma biomarkers. **EuPA Open Proteomics** 2014; 4:121-8.

Kriegsmann M, Casadonte R, Kriegsmann J, et al. Reliable entity subtyping in non-small cell lung cancer by MALDI imaging mass spectrometry on formalin-fixed paraffin-embedded tissue specimens. **Mol Cell Proteomics** 2016; 15:3081-9.

Kuasne H, Cólus IMDS, Busso AF, et al. Genome-wide methylation and transcriptome analysis in penile carcinoma: uncovering new molecular markers. **Clin Epigenetics** 2015; 7:46.

Kuzmanov U, Guo H, Buchsbaum D, et al. Global phosphoproteomic profiling reveals perturbed signaling in a mouse model of dilated cardiomyopathy. **Proc Natl Acad Sci** 2016; 113:12592-7.

Laborde E. Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. **Cell Death Differ** 2010; 17:1373-80.

Lausen B, Schumacher M. Maximally selected rank statistics. **Biometrics** 1992; 48:73-85.

Li L, Zhang Y-G, Chen C-L. Anti-apoptotic role of peroxiredoxin III in cervical cancer cells. **FEBS Open Bio** 2013; 3:51-4.

Li Y-L, Liu L, Xiao Y, Zeng T, Zeng C. 14-3-3 $\sigma$  is an independent prognostic biomarker for gastric cancer and is associated with apoptosis and proliferation in gastric cancer. **Oncol Lett** 2015; 9:290-4.

Li Z, Liu J-Y, Zhang J-T. 14-3-3 sigma, the double-edged sword of human cancers. **Am J Transl Res** 2009; 1:326-40.

Liu X, Li J, Liu Y, et al. Calreticulin acts as an adjuvant to promote dendritic cell maturation and enhances antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses against non-small cell lung cancer cells. **Cell Immunol** 2016; 300:46-53.

Longuespée R, Casadonte R, Kriegsmann M, et al. MALDI mass spectrometry imaging: A cutting-edge tool for fundamental and clinical histopathology. **Proteomics Clin Appl** 2016; 10:701-19.

Longuespée R, Fléron M, Pottier C, et al. Tissue proteomics for the next decade? Towards a molecular dimension in histology. **OMICS** 2014a; 18:539-52.

Longuespée R, Tastet C, Desmons A, et al. HFIP extraction followed by 2D CTAB/SDS-PAGE separation: a new methodology for protein identification from tissue sections after MALDI Mass Spectrometry Profiling for Personalized Medicine Research. **OMICS** 2014b; 18:374-84.

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

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

Lopes A, Bezerra ALR, Pinto CAL, 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.

Louie SM, Grossman EA, Crawford LA, et al. GSTP1 is a driver of triple-negative breast cancer cell metabolism and pathogenicity. **Cell Chem Biol** 2016; 23:567-78.

Lu Y-C, Weng W-C, Lee H. Functional roles of calreticulin in cancer biology. **Biomed Res Int** 2015; 2015:526524.

Lwin Z-M, Guo C, Salim A, et al. Clinicopathological significance of calreticulin in breast invasive ductal carcinoma. **Mod Pathol** 2010; 23:1559-66.

Maes E, Mertens I, Valkenburg D, et al. Proteomics in cancer research: Are we ready for clinical practice?. **Crit Rev Oncol Hematol** 2015; 96:437-48.

Maier SK, Hahne H, Gholami AM, et al. Comprehensive identification of proteins from MALDI imaging. **Mol Cell Proteomics** 2013; 12:2901-10.

Martin-Lorenzo M, Balluff B, Sanz-Maroto A, et al. 30µm spatial resolution protein MALDI MSI: In-depth comparison of five sample preparation protocols applied to human healthy and atherosclerotic arteries. **J Proteomics** 2014; 108:465-8.

Mayne J, Ning Z, Zhang X, et al. Bottom-Up proteomics (2013-2015): keeping up in the era of systems biology. **Anal Chem** 2016; 88:95-121.

Meding S, Martin K, Gustafsson OJR, et al. Tryptic peptide reference data sets for MALDI imaging mass spectrometry on formalin-fixed ovarian cancer tissues. **J Proteome Res** 2013; 12:308-15.

Meng H, Guan X, Guo H, Xiong G. Association between SNPs in Serpin gene family and risk of esophageal squamous cell carcinoma. **Tumor Biol** 2015; 36:6231-8.

Merlos Rodrigo MA, Zitka O, Krizkova S, Moulick A, Adam V, Kizek R. MALDI-TOF MS as evolving cancer diagnostic tool: a review. **J Pharm Biomed Anal** 2014; 95:245-55.

Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, Gold LI, Opas M. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. **Biochem J** 2009; 417:651-66.

Milioli HH, Sousa KS, Kaviski R, et al. Comparative proteomics of primary breast carcinomas and lymph node metastases outlining markers of tumor invasion. **Cancer Genomics Proteomics** 2015; 12:89-102.

Mohri Y, Toiyama Y, Kusunoki M. Progress and prospects for the discovery of biomarkers for gastric cancer: a focus on proteomics. **Expert Rev Proteomics** 2016; 13:1131-9.

Morita Y, Ikegami K, Goto-Inoue N, et al. Imaging mass spectrometry of gastric carcinoma in formalin-fixed paraffin-embedded tissue microarray. **Cancer Sci** 2010; 101:267-73.

Motoyama A, Yates JR. Multidimensional LC separations in shotgun proteomics. **Anal Chem** 2008; 80:7187-93.

Muñoz JJ, Drigo SA, Kuasne H, et al. A comprehensive characterization of cell cultures and xenografts derived from a human verrucous penile carcinoma. **Tumor Biol** 2016; 37:11375-84.

Nascimento JM, Garcia S, Saia-Cereda VM, et al. Proteomics and molecular tools for unveiling missing links in the biochemical understanding of schizophrenia. **Proteomics - Clin Appl** 2016; 10:1148-58.

Naumann CM, Sperveslage J, Hamann MF, et al. Establishment and characterization of primary cell lines of squamous cell carcinoma of the penis and its metastasis. **J Urol** 2012; 187:2236-42

Nedelkov D. Mass spectrometry protein tests: ready for prime time (or not). **Expert Rev Proteomics** 2016; 14:1-7.

Nicholson S, Kayes O, Minhas S. Clinical trial strategy for penis cancer. **BJU Int** 2013;113:852-3.

Nishimori T, Tomonaga T, Matsushita K, et al. Proteomic analysis of primary esophageal squamous cell carcinoma reveals downregulation of a cell adhesion protein, periplakin. **Proteomics** 2006; 6:1011-8.

Nosaka K, Horie Y, Shiomi T, et al. Cytoplasmic maspin expression correlates with poor prognosis of patients with adenocarcinoma of the uterine cervix. **Yonago Acta Med** 2015; 58:151-6.

O'Reilly EA, Gubbins L, Sharma S, et al. The fate of chemoresistance in triple negative breast cancer (TNBC). **BBA Clin** 2015; 3:257-75.

Oppenheimer SR, Mi D, Sanders ME, Caprioli RM. Molecular analysis of tumor margins by MALDI mass spectrometry in renal carcinoma. **J Proteome Res** 2010; 9:2182-90.

Ornellas P, Ornellas AA, Chinello C, et al. Downregulation of C3 and C4A / B complement factor fragments in plasma from patients with squamous cell. **Int Braz J Urol** 2012; 38:739-49.

Ou L, Przybilla MJ, Whitley CB. Proteomic analysis of mucopolysaccharidosis I mouse brain with two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Mol Genet Metab** 2016; 16:30207-4.

Pagliari LC, Williams DL, Daliani D, et al. Neoadjuvant paclitaxel, ifosfamide, and cisplatin chemotherapy for metastatic penile cancer: a phase II study. **J Clin Oncol** 2010; 28:3851-7.

Pai S, Westra W. Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. **Annu Rev Pathol** 2009; 4:49-70.

Phan L, Chou P-C, Velazquez-Torres G, et al. The cell cycle regulator 14-3-3 $\sigma$  opposes and reverses cancer metabolic reprogramming HHS. **Nat Commun** 2015; 6:7530.

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

Rieken M, Djajadiningrat RS, Kluth LA, et al. Predictors of cancer-specific mortality after disease recurrence in patients with squamous cell carcinoma of the penis. **Eur Urol** 2014; 66:811-4.

Rocha RM, Ignácio JA, Jordán J, et al. A clinical, pathologic, and molecular study of p53 and murine double minute 2 in penile carcinogenesis and its relation to prognosis. **Hum Pathol** 2012; 43:481-8.

Rodney S, Feber A, Arya M, Muneer A. Molecular markers in penile cancer. **Curr Probl Cancer** 2015; 39:137-45.

Rogowska-Wrzesinska A, Le Bihan M-C, Thaysen-Andersen M, Roepstorff P. 2D gels still have a niche in proteomics. **J Proteomics** 2013; 88:4-13.

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

Sadeghi R, Gholami H, Zakavi SR, Kakhki VRD, Horenblas S. Accuracy of 18 F-FDG PET / CT for diagnosing inguinal lymph node involvement in penile squamous cell carcinoma. **Clin Nucl Med** 2012; 37:436-41.

Salphati L, Alicke B, Heffron TP, et al. Brain distribution and efficacy of the brain penetrant PI3K I=inhibitor GDC-0084 in orthotopic mouse models of human glioblastoma. **Drug Metab Dispos** 2016; 44:1881-9.

Savas S, Geraci J, Jurisica I, Liu G. A comprehensive catalogue of functional genetic variations in the EGFR pathway: protein-protein interaction analysis reveals novel genes and polymorphisms important for cancer research. **Int J Cancer** 2009; 125:1257-65.

Schwamborn K, Caprioli RM. MALDI imaging mass spectrometry - painting molecular pictures. **Mol Oncol** 2010; 4:529-38.

Seeley EH, Caprioli RM. Molecular imaging of proteins in tissues by mass spectrometry. **Proc Natl Acad Sci** 2008; 105:18126-31.



Shabbir M, Kayes O, Minhas S. Challenges and controversies in the management of penile cancer. **Nat Rev Urol** 2014; 11:702-11.

Shalapour S, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil. **J Clin Invest** 2015; 125:3347-55.

Sheng W, Chen C, Dong M, et al. Overexpression of calreticulin contributes to the development and progression of pancreatic cancer. **J Cell Physiol** 2014; 229:887-97.

Sherbet GV. **Therapeutic strategies in cancer biology and pathology**. New York: Elsevier; 2013; Maspin (SerpinB5): a postulated tumour suppressor; p.129-32.

Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. **Anal Chem** 1996; 68:850-8.

Shipitsin M, Small C, Choudhury S, et al. Identification of proteomic biomarkers predicting prostate cancer aggressiveness and lethality despite biopsy-sampling error. **Br J Cancer** 2014; 111:1-12.

Shu Q, Li W, Li H, Sun G. Vasostatin inhibits VEGF-induced endothelial cell proliferation, tube formation and induces cell apoptosis under oxygen deprivation. **Int J Mol Sci Int J Mol Sci** 2014; 15:6019-30.

Silva AM, Lisboa BCG, Cunha IW, et al. Comment on: EGFR mutational status in Brazilian patients with penile carcinoma. **Expert Opin Ther Targets** 2013; 17:857-9.

Silverman G, Bird PI, Carrell RW, et al. The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins: evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. **J Biol Chem** 2001; 276:33293-6.

Singh S. Cytoprotective and regulatory functions of glutathione S-transferases in cancer cell proliferation and cell death. **Cancer Chemother Pharmacol** 2015; 75:1-15.

Tanaka K, Waki H, Ido Y, et al. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom** 1988; 2:151-3.

Termini L, Fregnani JH, Boccardo E, et al. SOD2 immunoexpression predicts lymph node metastasis in penile cancer. **BMC Clin Pathol** 2015; 15:3.

Thoma C. Ongoing search for molecular prognostic markers. **Nat Publ Gr** 2016; 13:184.

Tolstov Y, Hadaschik B, Pahernik S, Hohenfellner M, Duensing S. Human papillomaviruses in urological malignancies: a critical assessment. **Urol Oncol** 2014; 32:46.e19-27.

Tonry CL, Leacy E, Raso C, et al. The role of proteomics in biomarker development for improved patient diagnosis and clinical decision making in prostate cancer. **Diagnostics (Basel, Switzerland)** 2016; 6:27.

Tran JC, Zamdborg L, Ahlf DR, et al. Mapping intact protein isoforms in discovery mode using top down proteomics. **Nature** 2012; 480:254-8.

Vassallo J, Rodrigues AFF, Campos AHJFM, et al. Pathologic and immunohistochemical characterization of tumoral inflammatory cell infiltrate in invasive penile squamous cell carcinomas: Fox-P3 expression is an independent predictor of recurrence. **Tumor Biol** 2015; 36:2509-16.

Velazquez EF, Cubilla AL. Penile squamous cell carcinoma: anatomic, pathologic and viral studies in Paraguay (1993-2007). **Anal Quant Cytol Histol** 2007; 29:185-98.

Velazquez EF, Ayala G, Liu Hm, et al. Histologic grade and perineural invasion is more important than tumor thickness as predictor of nodal metastasis in penile squamous cell carcinoma invading 5 to 10mm. **Am J Surg Pathol** 2008; 32:974-9.

Villagomez M, Szabo E, Podcheko A, Feng T, Papp S, Opas M. Calreticulin and focal-contact-dependent adhesion. **Biochem Cell Biol** 2009; 87:545-56.

Vuichoud C, Klap J, Loughlin KR. The emerging role and promise of biomarkers in penile cancer. **Urol Clin North Am** 2016; 43:135-43.

Wang W-A, Groenendyk J, Michalak M. Calreticulin signaling in health and disease. **Int J Biochem Cell Biol** 2012; 44:842-6.

Watson JT, Sparkman OD. **Introduction to mass spectrometry: instrumentation, applications, and strategies for data interpretation**. 4<sup>th</sup> ed. New York: Wiley; 2007. Introduction; p.1-45.

Webber JP, Spary LK, Mason MD, et al. Prostate stromal cell proteomics analysis discriminates normal from tumour reactive stromal phenotypes. **Oncotarget** 2016; 7:20124-39.

Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, et al. Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus- associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. **J Clin Oncol** 2006; 24:736-47.

Werneck I, Cunha D, Souza MJL, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenotype at invasion front of squamous cell carcinoma of the penis influences oncological outcomes. **Urol Oncol Semin Orig Investig** 2016; 34:433.e19-26.

Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, et al. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Biotechnology (NY)** 1996; 14:61-5.

Williams VM, Filippova M, Filippov V, et al. Human papillomavirus type 16 e6\* induces oxidative stress and DNA damage. **J Virol** 2014; 88:6751-61.

Woo YL, Damay I, Stanley M, et al. The use of HPV Linear Array Assay for multiple HPV typing on archival frozen tissue and DNA specimens. **J Virol Methods** 2007; 142:226-30.

Wu Q, Liu CZ, Tao LY, et al. The clinicopathological and prognostic impact of 14-3-3 protein isoforms expression in human cholangiocarcinoma by immunohistochemistry. **Asian Pacific J Cancer Prev** 2012; 13:1253-9.

Yates JR. Mass spectrometry and the age of the proteome. **J Mass Spectrom** 1998; 33:1-19.

Ye F, Xin Z, Han W, et al. Quantitative proteomics analysis of the hepatitis C virus replicon high-permissive and low-permissive cell lines. **PLoS One** 2015; 10:1-21.

Yi L, Shan J, Chen X, et al. Involvement of calreticulin in cell proliferation, invasion and differentiation in diallyl disulfide-treated HL-60 cells. **Oncol Lett** 2016; 2:1861-7.

Yilmaz M, Christofori G, Lehembre F. Distinct mechanisms of tumor invasion and metastasis. **Trends Mol Med** 2007; 13: 535-41.

Zequi SD, Guimarães GC, da Fonseca FP, et al. Sex with animals (SWA): behavioral characteristics and possible association with penile cancer: a multicenter study. **J Sex Med** 2012; 9:1860-7.

Zhang S, Zhu Y, Ye D. Phase II study of docetaxel, cisplatin, and fluorouracil in patients with distantly metastatic penile cancer as first-line chemotherapy. **Oncotarget** 2015; 6:32212-9.

Zhu Y, Ye D-W, Yao X-D, et al. The value of squamous cell carcinoma antigen in the prognostic evaluation, treatment monitoring and followup of patients with penile cancer. **J Urol** 2008; 80:2019-23.

## Anexo 1 - Classificação e estadiamento TNM dos tumores penianos.

### Classificação

**T** - Tumor primário

Tx: tumor primário não pode ser avaliado

T0: não há evidência de tumor primário

Tis: carcinoma "in situ"

Ta: carcinoma verrucoso não invasivo

T1a: tumor invade o tecido conjuntivo subepitelial, sem invasão vascular linfática e não é pouco diferenciado

T1b: tumor invade o tecido conjuntivo subepitelial com invasão vascular linfática ou pouco diferenciado

T2 : tumor invade corpos esponjosos ou cavernosos

T3: tumor invade uretra ou próstata

T4: tumor invade estruturas adjacentes

**N** - Linfonodos Regionais

Nx: linfonodos não podem ser avaliados

N0: ausência de metástases

N1:metástase em um único linfonodo inguinal superficial

N2 :metástases em linfonodos múltiplos ou bilaterais inguinais superficiais

N3: metástases em linfonodos regionais inguinais profundos ou pélvicos, uni ou bilaterais

**M** - Metástases à distância

M0:ausência de metástase

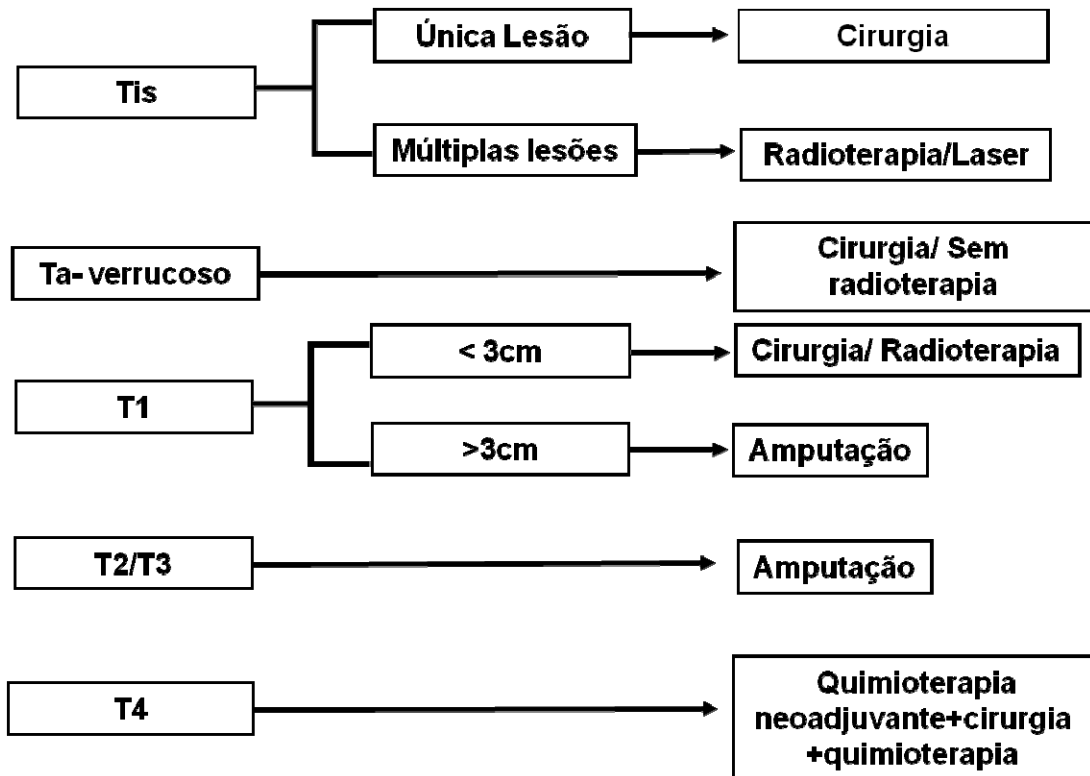
M1: presença de metástases

### Estadiamento

0	Tis	N0	M0
	Ta	N0	M0
I	T1a	N0	M0
II	T1b	N0	M0
	T2	N0	M0
	T3	N0	M0
IIIa	T1-3	N1	M0
IIIb	T1-3	N2	M0
IV	T4	Qualquer N	M0
	Qualquer T	N3	M0
	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: Adaptado de GUIMARÃES et al. (2010).

**Anexo 2 - Algoritmo de tratamento do tumor primário peniano.**



Fonte: Adaptado de GUIMARÃES et al. (2011).

## Anexo 3 - Termo de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



**Comitê de Ética em  
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 26 de setembro de 2012.

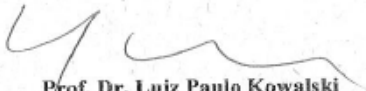
Ao  
**Dr. José Vassalo.**

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1369/10-E  
"Análise *in situ* de proteínas diferencialmente expressas em carcinomas epidermóides penianos por espectrometria de massas utilizando *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI)*"

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 25/09/2012, **tomaram conhecimento e aprovaram** a seguinte solicitação e documento:

- Solicitação de inclusão da aluna de Doutorado Elisângela de Jesus Silva no projeto acima mencionado e solicitação de dispensa de apreciação ética do mesmo, pelo fato de estar inserido no projeto temático intitulado "O *Carcinoma de Pênis: Estudo de um Problema Brasileiro Abordando da Morfologia aos Mecanismos Moleculares*" (registro CEP 1369/10), em carta datada de 05 de setembro de 2012;
- Projeto de Doutorado, datado de 05 de setembro de 2012.

Atenciosamente,



**Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1



## Anexo 4 - Cartilha de procedimentos cirúrgicos.



A.C. Camargo  
Cancer Center

Restrito

Documento 1.1

### **Procedimentos Operacionais Padrão para Coleta de Amostras, Acondicionamento e Armazenamento para o Projeto “O Carcinoma de Pênis: Estudo de um Problema Brasileiro Abordando da Morfologia aos Mecanismos Moleculares”.**

Elaborado por: Dr. Antônio Hugo J. F. M. Campos (Biobanco do Hospital A C Camargo).

**A- Propósito:** 1- Descrever os procedimentos para coleta, acondicionamento e armazenamento de amostras de carcinoma de pênis e tecido não-neoplásico correspondente, de pacientes que consentiram em participar do estudo; 2- Assegurar a preservação ideal dos tecidos para avaliação futura dentro dos objetivos do projeto; 3- Uniformizar a qualidade do material biológico obtido a partir dos vários centros colaboradores.

#### **B- Material requerido:**

1. Luvas de proteção.
2. Óculos de proteção.
3. Máscara cirúrgica.
4. Lâminas de bisturi
5. Criotubos estéreis de 2ml, pré-codificados com códigos de barras, nas cores verde e vermelha.
6. Nitrogênio líquido em container próprio OU caixa de isopor contendo gelo seco ou gelo em cubos.
7. Formulário padrão de preenchimento da coleta de casos.

**C) Precauções de segurança:**

C.1) Utilize luvas.

C.2) Proteja a vista ao manipular o tecido a ser coletado, e também ao colocar o(s) criotubo(s) com a(s) amostra(s) de tecido(s) no container contendo nitrogênio líquido.

C.3) Após terminar o procedimento, descarte apropriadamente todo o material contaminante e perfuro-cortante.

**D- Procedimentos:**

D.1) No dia anterior à coleta, organizar o material necessário e contactar o pessoal envolvido no procedimento.

D.2) A coleta padronizada para este projeto envolve no mínimo uma amostra de tecido tumoral e, se possível, uma amostra de tecido não-neoplásico correspondente. Caso seja possível coletar mais de uma amostra, utilizar mais de um tubo para cada amostra, para evitar que variações de temperatura após o congelamento afetem todos os espécimes simultaneamente ao se manipular um apenas um criotubo.

D.3) É ideal ter o container de nitrogênio líquido fornecido pelo projeto dentro da sala de cirurgia, ou próximo à ela, para reduzir ao máximo o tempo de isquemia fria (decorrido entre a retirada da amostra de tecido para colocação no criotubo e o seu congelamento). Se isto não for possível, providenciar uma caixa de isopor contendo gelo seco ou gelo em cubos para colocar os criotubos contendo as amostras até que seja possível o congelamento em nitrogênio líquido.

D.4) O tempo de isquemia fria (decorrido entre a retirada da amostra de tecido para colocação no criotubo e o seu congelamento) deve ser anotado. O ideal, para este projeto, é que o mesmo **seja inferior a 60 minutos**.

D.5) Para a coleta das amostras, siga o esquema ilustrado na **figura 1**. As amostras de tumor devem ser colocadas em criotubos com tampa de cor **VERDE**. As amostras de tecido não-neoplásico correspondente devem ser colocadas em criotubos de cor **VERMELHA**. Sempre que possível, siga as dimensões mostradas na figura para a obtenção dos fragmentos de tecido para o projeto.

D.6) **Feche completamente a tampa do criotubo, para evitar que o nitrogênio líquido entre em contato com as amostras.**

D.7) Utilize o container de nitrogênio líquido para congelamento rápido das amostras. Após, as mesmas devem ser transferidas para um freezer criogênico (a  $-80^{\circ}\text{C}$ ). Se isto não for possível, as mesmas poderão ser mantidas no container de nitrogênio líquido utilizado para congelamento rápido, devendo-se tomar medidas para que o nível de nitrogênio no mesmo seja mantido.

D.8) Preencha adequadamente o registro de coleta das amostras (documento 1.2 anexo).

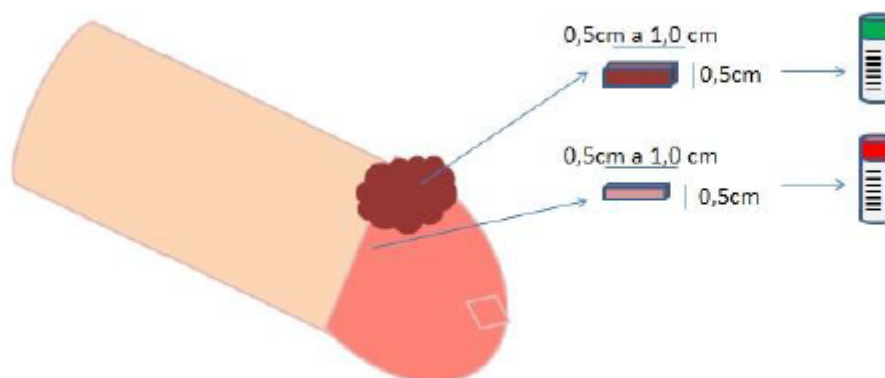


Figura 1: Coleta de amostra de tecido tumoral e de tecido não neoplásico correspondente para colocação nos criotubos.

Documento 1.2

**Formulário de registro de casos para o Projeto “O Carcinoma de Pênis: Estudo de um Problema Brasileiro Abordando da Morfologia aos Mecanismos Moleculares”.**

Elaborado por: Dr. Antônio Hugo J. F. M. Campos (Biobanco do Hospital A C Camargo).

### EXEMPLO

Centro Colaborador: A C Camargo Cancer Center	
Nome do paciente (INICIAIS): I.A.M.	
Número de registro hospitalar: 02.0001-5	Data de coleta:
Local da lesão: Borda	28/03/2013
Número de código de barras para tubo de tumor (VERDE): <input checked="" type="checkbox"/> 043111 <input checked="" type="checkbox"/> 043115 <input type="checkbox"/>	Número de código de barras para tubo de tecido não-neoplásico (VERMELHA): <input checked="" type="checkbox"/> 043125 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

**Anexo 5 - Metodologias aplicadas em cada amostra congelada do estudo (N=55).**

Amostra*	ID	Tipo de ensaio experimental		
		Tipagem HPV (N=55)	Gel 2D (N=14)	MALDI <i>Imaging</i> (N=21)
1	CEP			
2	CEP			
3	CEP			
4	CEP			
5	CEP			
6	CEP			
7	CEP			
8	CEP			
9	CEP			
10	CEP			
11	CEP			
12	CEP			
13	CEP			
14	CEP			
15	CEP			
16	CEP			
17	CEP			
18	CEP			
19	CEP			
20	CEP			
21	CEP			
22	CEP			
23	CEP			
24	CEP			
25	CEP			
26	CEP			
27	CEP			
28	CEP			

29	CEP			
30	CEP			
31	CEP			
32	CEP			
33	CEP			
34	CEP			
35	CEP			
36	CEP			
37	CEP			
38	CEP			
39	CEP			
40	CEP			
41	CEP			
42	CEP			
43	CEP			
44	CEP			
45	CEP			
46	MAN			
47	MAN			
48	MAN			
49	MAN			
50	MAN			
51	MAN			
52	MAN			
53	PN			
54	PN			
55	PN			

\*As amostras submetidas às metodologias descritas em cada coluna estão marcadas com a cor cinza. CEP - Carcinoma Epidermoide Peniano; MAN - Margem Adjacente Não Neoplásica; PN - Prepúcio Normal

\*Sendo considerados como referência o grupo tumoral, nas comparações tumor *versus* controle, e grupo HPV positivo, nas comparações entre tumores HPV positivos *versus* negativos.

**Anexo 6** - Listas de peptídeos trípticos teóricos das proteínas alvo do estudo.

<b>CALRETICULINA (CALR)</b>				
<b>Nº</b>	<b>Intervalo</b>	<b>Mono MH+</b>	<b>Clivagens parciais</b>	<b>Sequência</b>
124	[386-391]	750.279	0	EDDEDK
82	[273-278]	772.410	0	GEWKPR
109	[369-374]	778.310	0	EEEEEDK
103	[361-366]	804.348	0	QDEEQR
95	[352-358]	805.424	1	AAEKQMK
11	[42- 48]	818.416	1	HKSDFGK
47	[152-159]	885.552	1	GKNVLINK
19	[56- 62]	887.378	0	FYGDEEK
110	[369-375]	906.405	1	EEEEEDKK
8	[37- 43]	927.505	1	WIESKHK
25	[65- 73]	975.485	0	GLQTSQDAR
121	[378-385]	978.390	0	EEEEAEDK
85	[279-286]	992.468	0	QIDNPDYK
107	[367-374]	1019.489	1	LKEEEEDK
43	[144-151]	1019.567	0	VHVIFNYK
104	[361-368]	1045.527	1	QDEEQRLK
101	[359-366]	1047.470	1	DKQDEEQR
96	[352-360]	1048.546	2	AAEKQMKDK
111	[369-376]	1062.506	2	EEEEEDKKR
50	[154-162]	1084.647	1	NVLINKDIR
119	[377-385]	1106.485	1	KEEEEAEDK
20	[56- 64]	1130.500	1	FYGDEEKDK
108	[367-375]	1147.584	2	LKEEEEDKK
41	[143-151]	1147.662	1	KVHVIFNYK
44	[144-153]	1204.684	1	VHVIFNYKGGK
23	[63- 73]	1218.607	1	DKGLQTSQDAR
31	[88- 98]	1219.705	0	GQTLVVQFTVK
127	[392-401]	1.252.43	0	DEDEEDEEDK
117	[376-385]	1262.586	2	RKEEEEAEDK
48	[152-162]	1269.764	2	GKNVLINKDIR
14	[44- 55]	1271.663	1	SDFGKFLSSGK
102	[359-368]	1288.649	2	DKQDEEQRLK
51	[154-164]	1315.751	2	NVLINKDIRCK
42	[143-153]	1332.779	2	KVHVIFNYKGGK
4	[25- 36]	1410.628	0	EQFLDGDGWTSR
34	[99-111]	1419.632	0	HEQNIDCGGGYVK
99	[356-366]	1434.664	2	QMKDKQDEEQR
9	[37- 48]	1461.748	2	WIESKHKSDFGK

130	[402-414]	1474.618	0	EEDEEEDVPGQAK
12	[42- 55]	1536.817	2	HKSDFGKFLSSGK
70	[210-222]	1.559.66	0	DPDASKPEDWDER
17	[49- 62]	1.605.78	1	FVLSSGKFGYDDEEK
28	[74- 87]	1.607.77	0	FYALSASFEPFSNK
122	[378-391]	1.709.65	1	EEEEAEDKEDDEDK
83	[273-286]	1.745.86	1	GEWKPRQIDNPDYK
71	[210-224]	1.758.79	1	DPDASKPEDWDERAK
68	[208-222]	1.800.84	1	IKDPDASKPEDWDER
105	[361-374]	1.804.82	2	QDEEQRLKEEEDK
131	[402-417]	1.831.77	1	EEDEEEDVPGQAKDEL
120	[377-391]	1.837.74	2	KEEEEAEDKEDDEDK
18	[49- 64]	1.848.90	2	FVLSSGKFGYDDEEKDK
45	[144-159]	1.886.10	2	VHVIFNYKGKNVLINK
66	[207-222]	1.928.93	2	KIKDPDASKPEDWDER
125	[386-401]	1.983.69	1	EDDEDKDEDEEEDK
69	[208-224]	1.999.97	2	IKDPDASKPEDWDERAK
5	[25- 41]	2.053.96	1	EQFLDGDGWTSRWIESK
21	[56- 73]	2.086.96	2	FGYDDEEKDKGLQTSQDAR
15	[44- 62]	2.140.02	2	SDFGKFLSSGKFGYDDEEK
6	[25- 43]	2.319.11	2	EQFLDGDGWTSRWIESKHK
61	[186-206]	2.391.09	0	IDNSQVESGSLEDDWDFLPPK
62	[186-207]	2.519.19	1	IDNSQVESGSLEDDWDFLPPKK
1	[1- 24]	2.527.49	0	MLLSVPLLLGLLGLAVAEPVYFK
26	[65- 87]	2.564.24	1	GLQTSQDARFYALSASFEPFSNK
58	[165-185]	2.568.26	0	DDEFTHLYTLIVRPDNTYEVK
32	[ 88-111]	2.620.31	1	GQTLVVQFTVKHEQNIDCGGGYVK
128	[392-414]	2.708.03	1	DEDEEEDKEEEDVPGQAK
76	[225-248]	2.760.26	0	IDDPTDSKPEDWDKPEHIPDPAK
63	[186-209]	2.760.37	2	IDNSQVESGSLEDDWDFLPPKKIK
56	[163-185]	2.799.36	1	CKDDEFTHLYTLIVRPDNTYEVK
24	[63- 87]	2.807.36	2	DKGLQTSQDARFYALSASFEPFSNK
29	[74- 98]	2.808.46	1	FYALSASFEPFSNKGQTLVVQFTVK
123	[378-401]	2.943.06	2	EEEEAEDKEDDEDKDEDEEEDK
74	[223-248]	2.959.39	1	AKIDDPTDSKPEDWDKPEHIPDPAK
79	[249-272]	2.960.29	0	KPEDWDEEMDGEWEPPIQNPEYK
129	[392-417]	3.065.18	2	DEDEEEDKEEEDVPGQ AKDEL
54	[160-185]	3.183.57	2	DIRCKDDEFTHLYTLIVRPDNTYEVK
91	[323-351]	3.268.49	0	SGTIFDNFLITNDEAYAEFFGNETWG VTK
37	[112-142]	3.399.497	0	LFPNSLDQTMHGDSEYNIMFGPDIC GPGTK
126	[386-414]	3.439.29	2	EDDEDKDEDEEEDKEEEDVPGQ GQAK



<b>14-3-3 SIGMA (SFN)</b>				
<b>Nº</b>	<b>Intervalo</b>	<b>Mono MH+</b>	<b>Clivagens parciais</b>	<b>Sequência</b>
28	[57- 60]	503.272	0	AAWR
16	[28- 32]	503.282	0	GAVEK
37	[78- 82]	557.304	0	GPEVR
4	[ 4-9]	659.409	0	ASLIQK
52	[118-122]	669.397	0	VFYLK
58	[125-129]	673.294	0	GDYYR
70	[143-148]	674.383	0	IIDSAR
41	[83- 87]	724.362	1	EYREK
25	[50- 56]	729.400	0	NVVGQQR
10	[12- 18]	816.421	0	LAEQAER
68	[142-148]	830.484	1	RIIDSAR
49	[110-117]	834.359	0	EAGDAESR
5	[4- 11]	858.541	1	ASLIQKAK
31	[61- 68]	903.515	0	VLSSIEQK
22	[42- 49]	907.525	0	NLLSVAYK
53	[118-124]	928.532	1	VFYLKMK
56	[123-129]	932.429	1	MKGDYYR
66	[141-148]	958.579	2	KRIIDSAR
38	[78- 85]	1.005.511	1	GPEVREYR
34	[69- 77]	1.008.412	0	SNEEGSEEK
8	[10- 18]	1.015.553	1	AKLAEQAER
19	[33- 41]	1.051.436	0	GEELSCEER
79	[161-169]	1.054.535	0	EMPPTNPIR
2	[1-9]	1.075.593	1	MERASLIQK
13	[19- 27]	1.105.469	0	YEDMAAFMK
61	[130-140]	1.181.568	0	YLAEVATGDDK
77	[160-169]	1.182.630	1	KEMPPTNPIR
88	[215-224]	1.189.661	0	DSTLIMQLLR
26	[50- 60]	1.213.655	1	NVVGQQRRAAWR
73	[149-159]	1.242.567	0	SAYQEAMDISK
39	[78- 87]	1.262.649	2	GPEVREYREK
3	[1- 11]	1.274.725	2	MERASLIQKAK
62	[130-141]	1.309.663	1	YLAEVATGDDKK
74	[149-160]	1.370.662	1	SAYQEAMDISKK
29	[57- 68]	1.387.769	1	AAWRVLSSIEQK
63	[130-142]	1.465.765	2	YLAEVATGDDKKR
50	[110-122]	1.484.738	1	EAGDAESRVFYLK
17	[28- 41]	1.535.701	1	GAVEKGEELSCEER
35	[69- 82]	1.546.698	1	SNEEGSEEKGPEVR
54	[118-129]	1.582.809	2	VFYLKMKGDYYR

14	[19- 32]	1.589.734	1	YEDMAAFMKGAVEK
23	[42- 56]	1.617.907	1	NLLSVAYKNVVGGQR
6	[4- 18]	1.655.944	2	ASLIQKAKLAEQAER
51	[110-124]	1.743.873	2	EAGDAESRVFYLKMK
59	[125-140]	1.835.845	1	GDYYRYLAEVATGDDK
32	[61- 77]	1.892.908	1	VLSSIEQKSNEEGSEEK
71	[143-159]	1.897.932	1	IIDSARSAYQEAMDISK
11	[12- 27]	1.902.872	1	LAEQAERYEDMAAFMK
20	[33- 49]	1.939.943	1	GEELSCEERNLLSVAYK
60	[125-141]	1.963.940	2	GDYYRYLAEVATGDDK
36	[69- 85]	1.994.905	2	SNEEGSEEKGPEVREYR
72	[143-160]	2.026.027	2	IIDSARSAYQEAMDISK
69	[142-159]	2.054.034	2	RIIDSARSAYQEAMDISK
57	[123-140]	2.094.980	2	MKGDYYRYLAEVATGDDK
27	[50- 68]	2.098.152	2	NVVGGQRAAWRVLSSIEQK
9	[10- 27]	2.102.005	2	AKLAEQAERYEDMAAFMK
24	[42- 60]	2.102.162	2	NLLSVAYKNVVGGQRAAWR
85	[196-214]	2.173.959	0	TTFDEAMADLHTLSEDSYK
30	[57- 77]	2.377.163	2	AAWRVLSSIEQKSNEEGSEEK
46	[88-109]	2.382.258	0	VETELQGVCDTVLGLLDSHLIK
12	[12- 32]	2.387.137	2	LAEQAERYEDMAAFMKGAVEK
75	[149-169]	2.406.179	2	SAYQEAMDISKKEMPPTNPIR
18	[28- 49]	2.424.208	2	GAVEKGEELSCEERNLLSVAYK
33	[61- 82]	2.431.195	2	VLSSIEQKSNEEGSEEKGPEVR
90	[225-248]	2.529.101	0	DNLTLWTADNAGEEGGEAPQEPQS

<b>SERPINA B5 (SERPINB5)</b>				
<b>Nº</b>	<b>Intervalo</b>	<b>Mono MH+</b>	<b>Clivagens parciais</b>	<b>Sequência</b>
1	[1- 17]	529.382	0	MDALQLANSFAVDLFDK
2	[1- 22]	557.366	1	MDALQLANSFAVDLFDKQLCEK
4	[18- 22]	592.328	0	QLCEK
7	[23- 47]	603.317	0	EPLGNVLFSPICLSTSLSLAQVGAK
10	[48- 64]	619.330	0	GDTANEIGQVLHFENVK
13	[65- 79]	620.307	0	DVPFGFQTVTSDVVK
14	[65- 87]	634.367	1	DVPFGFQTVTSDVVKLSSFYSLK
16	[80- 87]	637.356	0	LSSFYSLK
17	[80- 90]	638.398	1	LSSFYSLKLIK
18	[80- 91]	650.387	2	LSSFYSLKLIKIR
20	[88- 91]	651.292	1	LIKIR
21	[88- 96]	655.363	2	LIKRLYVDK
23	[91- 96]	784.529	1	RLYVDK
24	[91-109]	793.457	2	RLYVDKSLNLSTEFISSTK
25	[92- 96]	827.378	0	LYVDK
26	[92-109]	832.529	1	LYVDKSLNLSTEFISSTK
28	[97-109]	838.482	0	SLNLSTEFISSTK
29	[97-114]	862.452	1	SLNLSTEFISSTKRPYAK
31	[110-114]	873.479	0	RPYAK
32	[110-122]	944.509	1	RPYAKELETVDFK
33	[110-124]	955.473	2	RPYAKELETVDFKDK
34	[115-122]	959.523	0	ELETVDFK
35	[115-124]	960.518	1	ELETVDFKDK
36	[115-129]	980.494	2	ELETVDFKDKLEETK
38	[123-129]	992.498	1	DKLEETK
39	[123-137]	1.037.610	2	DKLEETKGQINNSIK
40	[125-129]	1.059.692	0	LEETK
41	[125-137]	1.095.631	1	LEETKGQINNSIK
43	[130-137]	1.101.630	0	GQINNSIK
46	[138-158]	1.147.720	0	DLTDGHFENILADNSVNDQTK
49	[159-170]	1.188.735	0	ILVVNAAYFVGK
50	[159-173]	1.198.702	1	ILVVNAAYFVGKWMK
51	[159-174]	1.221.548	2	ILVVNAAYFVGKWMKK
53	[171-174]	1.223.615	1	WMKK
54	[171-181]	1.234.686	2	WMKKFSESETK
56	[174-181]	1.272.645	1	KFSESETK
57	[174-186]	1.293.757	2	KFSESETKCEPFR
58	[175-181]	1.298.772	0	FSESETK
59	[175-186]	1.400.688	1	FSESETKCEPFR

60	[175-189]	1.426.742	2	FSESETKECPFRVNK
61	[182-186]	1.454.873	0	ECPFR
62	[182-189]	1.459.652	1	ECPFRVNK
70	[216-224]	1.473.791	0	IIELPFQNK
71	[216-234]	1.474.828	1	IIELPFQNKHLSMFILLPK
73	[225-234]	1.529.793	0	HLSMFILLPK
74	[225-245]	1.544.817	1	HLSMFILLPKDVEDESTGLEK
76	[235-245]	1.587.747	0	DVEDESTGLEK
77	[235-248]	1.591.770	1	DVEDESTGLEKIEK
80	[246-268]	1.595.843	1	IEKQLNSESLSQWTNPSTMANAK
82	[249-268]	1.653.812	0	QLNSESLSQWTNPSTMANAK
83	[249-270]	1.715.875	1	QLNSESLSQWTNPSTMANAKVK
86	[269-275]	1.716.913	1	VKLSIPK
87	[269-277]	1.738.971	2	VKLSIPKFK
88	[271-275]	1.800.859	0	LSIPK
89	[271-277]	1.823.927	1	LSIPKFK
90	[271-280]	1.838.965	2	LSIPKFKVEK
92	[276-280]	1.853.947	1	FKVEK
93	[276-285]	1.867.066	2	FKVEKMIDPK
95	[278-285]	1.870.929	1	VEKMIDPK
96	[278-294]	1.901.023	2	VEKMIDPKACLENLGLK
97	[281-285]	1.917.817	0	MIDPK
98	[281-294]	1.959.933	1	MIDPKACLENLGLK
100	[286-294]	2.042.092	0	ACLENLGLK
103	[295-311]	2.045.080	0	HIFSEDTSDFSGMSETK
106	[312-321]	2.095.072	0	GVALSNVIHK
109	[322-340]	2.201.181	0	VCLEITEDGGDSIEVPGAR
110	[322-345]	2.207.040	1	VCLEITEDGGDSIEVPGARILQHK
112	[341-345]	2.281.314	0	ILQHK
113	[341-359]	2.335.256	1	ILQHKDELNADHPFIYIIR
115	[346-359]	2.346.084	0	DELNADHPFIYIIR
116	[346-362]	2.352.221	1	DELNADHPFIYIIRHNK
117	[346-364]	2.401.232	2	DELNADHPFIYIIRHNKTR
119	[360-364]	2.434.203	1	HNKTR
120	[360-371]	2.455.236	2	HNKTRNIIFFGK
122	[363-371]	2.544.374	1	TRNIIFFGK
123	[363-375]	2.577.261	2	TRNIIFFGKFCSP
124	[365-371]	2.579.303	0	NIIFFGK
125	[365-375]	2.579.313	1	NIIFFGKFCSP

<b>GLUTATIONA-S-TRANSFERASE P1 (GSTP1)</b>				
<b>Nº</b>	<b>Intervalo</b>	<b>Mono MH+</b>	<b>Clivagens parciais</b>	<b>Sequência</b>
1	[1- 12]	533.286	0	MPPYTVVYFPVR
2	[1- 14]	639.298	1	MPPYTVVYFPVRGR
3	[1- 19]	671.420	2	MPPYTVVYFPVRGRCAALR
5	[13- 19]	746.409	1	GRCAALR
6	[13- 30]	751.435	2	GRCAALRMLLADQQQSWK
7	[5- 19]	912.599	0	CAALR
8	[15- 30]	1.079.555	1	CAALRMLLADQQQSWK
10	[20- 30]	1.214.700	0	MLLADQQQSWK
13	[31- 45]	1.276.635	0	EEVTVETWQEGSLK
16	[46- 55]	1.468.766	0	ASCLYGQLPK
19	[56- 71]	1.534.779	0	FQDGLTLYQSNTILR
20	[56- 75]	1.681.888	1	FQDGLTLYQSNTILRHLGR
23	[72- 82]	1.733.859	1	HLGRTLGLYGK
25	[76- 82]	1.765.883	0	TLGLYGK
28	[83-101]	1.790.904	0	DQQEAALVDMVNDGVEDLR
29	[83-103]	1.883.950	1	DQQEAALVDMVNDGVEDLRCK
32	[102-116]	2.004.027	1	CKYISLIYTNYEAGK
33	[102-121]	2.032.050	2	CKYISLIYTNYEAGKDDYVK
34	[104-116]	2.116.982	0	YISLIYTNYEAGK
35	[104-121]	2.126.160	1	YISLIYTNYEAGKDDYVK
37	[117-121]	2.155.059	0	DDYVK
40	[122-141]	2.196.157	0	ALPGQLKPFETLLSQNQGGK
46	[184-189]	2.273.229	0	LSARPK
47	[184-191]	2.347.215	1	LSARPKLK
50	[190-210]	2.348.086	1	LKAFLASPEYVNLPIGNGKQ
51	[192-210]	2.386.164	0	AFLASPEYVNLPIGNGKQ