

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde

Dissertação de Mestrado

**DETERMINAÇÃO DE TRANSCRITOS DE  
PROSTASINA EM NEOPLASIA DE OVÁRIO: UM  
POTENCIAL MARCADOR TUMORAL**

**FERNANDA PIRES COSTA**

Orientador: Prof. Dr. Bernardo Garicochea

Porto Alegre, agosto de 2006.

C837d Costa, Fernanda Pires

Determinação de transcritos de prostasina em neoplasia de ovário: um potencial marcador tumoral / Fernanda Pires Costa; orient. Bernardo Garicochea. Porto Alegre: PUCRS, 2006.  
37f.: gráf. II. tab.

Dissertação(Mestrado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de Concentração: Oncologia.

1. NEOPLASIAS OVARIANAS/diagnóstico. 2. MARCADORES BIOLÓGICOS DE TUMOR/análise. 3. MARCADORES BIOLÓGICOS DE TUMOR/sangue. 4. PROSTASINA. I. Garicochea, Bernardo. II. Título.

C.D.D. 616.99265  
C.D.U. 618.11-006

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde

Dissertação de Mestrado

**DETERMINAÇÃO DE TRANSCRITOS DE  
PROSTASINA EM NEOPLASIA DE OVÁRIO: UM  
POTENCIAL MARCADOR TUMORAL**

**FERNANDA PIRES COSTA**

Orientador: Prof. Dr. Bernardo Garicochea

Dissertação para postular o Título de Mestre em Clínica Médica. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, concentração em oncologia, Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do sul

Porto Alegre, agosto de 2006.

“A utopia está lá no horizonte. Me aproximo dois passos, ela se afasta dois passos. Caminho dez passos e o horizonte corre dez passos. Por mais que eu caminhe, jamais alcançarei. Para que serve a utopia? Serve para isso: para que eu não deixe de caminhar”

*Eduardo Hughes Galeano*

Para meus pais Fernando e Sandra e minha irmã  
Betânia, pela confiança, pelos ensinamentos, pelo apoio  
e incentivo aos meus projetos e sonhos, meu eterno  
amor e reconhecimento.

## **AGRADECIMENTOS**

Meus Sinceros Agradecimentos:

Primeiramente ao meu orientador, Dr. Bernardo Garicochea, por sua orientação e pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

À equipe do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS: Silvana Lunardini Alves, Gabriela Devenz e Denise Cantarelli Machado pelas valiosas contribuições na realização deste estudo.

Às alunas Andréa Simões Martins e Camila Coreixas pelo auxílio nas atividades de coleta de dados e de laboratório.

Ao Dr. Manoel Afonso Gonçalves pelo seu empenho no encaminhamento das pacientes para este estudo.

Ao Dr. Carlos Henrique Barrios, em quem tento constantemente me espelhar como profissional e como ser humano, pelo incentivo no meu desenvolvimento na área de pesquisa clínica e pelas valiosas e permanentes contribuições na minha formação.

A todos os queridos membros do Serviço de Oncologia da PUCRS pelo apoio e carinho que recebi durante a realização deste trabalho.

Ao Centro de Pesquisa em Oncologia da PUCRS, por me proporcionar, diariamente, tamanha satisfação profissional e simplesmente por me demonstrar de maneira incansável que este caminho vale a pena.

Ao funcionário Sr. Nilton Ribeiro pela sua gentileza e disponibilidade tornando possível o armazenamento adequado das amostras.

À Dra. Alice Zelmanowicz pelas valiosas e incansáveis contribuições na análise dos resultados deste estudo.

Ao CNPQ pela bolsa de mestrado concedida.

Em especial agradeço enormemente aos professores Eraldo Luiz Batista Junior e Diógenes Santiago Santos do Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CP-BMF) da PUCRS pelas imprescindíveis contribuições, sem as quais a realização deste trabalho não teria sido possível.

E principalmente a todas as pacientes que participaram deste estudo, pois sem elas ele não teria sido possível.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	x
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xi
RESUMO .....	xiii
ABSTRACT .....	xv
1 INTRODUÇÃO .....	1
1.2 Marcadores tumorais .....	5
1.2.1 CA 125 .....	6
1.2.1.1 CA 125 combinado com outros marcadores .....	8
1.2.1.2 CA 125 combinado com US .....	9
1.2.2 Novos possíveis marcadores tumorais para neoplasia epitelial de ovário .....	11
1.2.2.1 Prostatina .....	11
2 OBJETIVOS .....	15
3 PACIENTES E MÉTODOS .....	16
3.1 Pacientes .....	16
3.2 Coleta das Amostras .....	16
3.3 Isolamento e Caracterização do RNA .....	16
3.4 Síntese de DNA complementar (cDNA) .....	17
3.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR) .....	18
3.6 Reação em cadeia da polimerase em tempo real para quantificação relativa (QT-PCR) .....	19
4 RESULTADOS .....	21
4.1 Características das Pacientes .....	21
4.2 Presença da Prostatina nas Amostras (PCR) .....	23
4.3 QT-PCR .....	24
4.3.1 Cálculo da Eficiência e Validação do Ensaio Quantitativo .....	24
4.3.2 Quantificação da Prostatina nas Amostras (QT-PCR em tempo real) .....	26
4.3.3 Quantificação da prostatina nas amostras que apresentaram superexpressão. ...	27
4.3.4 Quantificação da prostatina nas amostras epiteliais .....	27
5 DISCUSSÃO .....	29
6 CONCLUSÕES .....	33
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	34

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estadiamento da FIGO para tumores de ovário .....	3
Tabela 2 - Sub-tipos histológicos das amostras do grupo 1 .....	21
Tabela 3 - Sub-tipos histológicos das amostras do grupo 2 .....	22
Tabela 4 - Relação dos tipos histológicos, idade, EC, expressão e quantificação da prostatina em relação à próstata na totalidade das amostras em estudo. ....	23
Tabela 5 - Expressão da prostatina no grupo 1 .....	24
Tabela 6 - Total de amostras com superexpressão de prostatina .....	27
Tabela 7 - Amostras epiteliais com superexpressão de prostatina .....	28

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Análise da eficiência da reação de amplificação. ....	25
Figura 2. Quantificação relativa da prostasina .....	26

## LISTA DE ABREVIATURAS

µg	micrograma
µl	microlitro
CA 125	cancer antigen 125
CA15-3	cancer antigen 15-3
CA 72-4	cancer antigen 72-4
CA 19-9	cancer antigen 19-9
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
DNA	deoxyribonucleic acid
Ct	cycle treshold
DEPC	dietilpirocarbonato
DO	densitometria ótica
EC	estágio clínico
EDRN	Early Detection Research Network
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FIGO	International Federation of Gynecology and Obstetrics
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
HSL-PUCRS	Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
IC	intervalo de confiança
kDa	kilodalton
LASA	lipidic associated sialic acid
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
mg	miligrama

MgCl <sub>2</sub>	cloreto de magnésio
mL	mililitro
mM	micromolar
mRNA	messenger ribonucleic acid
MW	molecular weight
nm	nanomol
ng	nanograma
PCR	polymerase chain reaction
pmoles	picomoles
RIA	radioimmunoassay
RNA	ribonucleic acid
rpm	rotações por minuto
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
US	ultrassonografia
VPP	valor preditivo positivo
U	unidades

## RESUMO

**Introdução:** Pacientes com neoplasia epitelial de ovário geralmente são diagnosticadas tardiamente, o que significa uma sobrevida em 5 anos de menos de 30%. A dificuldade em se diagnosticar precocemente esta neoplasia ocorre devido à falta de sintomas característicos, à ausência de um teste adequado de rastreamento e detecção precoce e ao fato de a localização dos ovários ser profunda na pelve, tornando a biópsia difícil, sendo necessário para isto, procedimentos cirúrgicos invasivos. A descoberta de um marcador tumoral que fosse detectado precocemente no sangue destas pacientes permitiria um diagnóstico precoce. A prostasina é uma protease que em condições normais está superexpressa somente na glândula prostática e no líquido seminal. Um estudo prévio sugere que a neoplasia epitelial de ovário possa superexpressar esta protease. O presente trabalho avalia a prostasina como um possível candidato a marcador tumoral em neoplasia epitelial de ovário.

**Pacientes e Métodos:** Amostras tumorais de pacientes com neoplasia epitelial de ovário (n: 12 - grupo 1) e de outros tumores ovarianos (n: 3 – grupo 2), operadas nos hospitais São Lucas da PUCRS, Fêmina e Conceição, foram analisadas através das técnicas de RT-PCR e RT-PCR em tempo real para detectar e quantificar, respectivamente, a presença da prostasina. Todas as amostras foram coletadas prospectivamente, após a assinatura do termo de consentimento. Nenhuma das pacientes possuía diagnóstico prévio de outras neoplasias e nunca tinham recebido qualquer forma de tratamento oncológico para a neoplasia de ovário. Amostras de tecido prostático foram utilizadas como controle para a expressão da prostasina.

**Resultados:** A análise da presença de prostasina em amostras de tumores epiteliais e não epiteliais de ovário através da técnica de RT-PCR demonstra que ela está presente na

grande maioria das amostras e que este não é um método adequado para a diferenciação destes tumores. Já a quantificação deste potencial marcador através de RT-PCR em tempo real sugere uma superexpressão da prostasina em amostras de tumores epiteliais encorajando novos estudos para investigação da mesma como um marcador tumoral para a patologia em estudo.

**Conclusão:** Os resultados sugerem que os tumores epiteliais de ovário superexpressam a prostasina e que esta deva ser melhor estudada como um novo marcador tumoral em neoplasia de ovário.

**Unitermos:** marcadores tumorais, prostasina, neoplasia de ovário.

## ABSTRACT

**Background:** The diagnosis of epithelial ovarian cancer is generally performed in advanced stages of the disease. The main hurdle for early diagnosis of ovarian cancer is the lack of characteristic symptoms and efficient screening tests. The development of a tumor marker that could detect early curable stages of this disease is therefore of utmost importance. Prostasin is a protease that in normal tissues is highly expressed only in the prostate gland and in seminal fluid. A previous study has indicated that epithelial ovarian cancer may overexpress prostasin. The present study sought to further evaluate prostasin as a possible candidate tumor marker in epithelial ovarian cancer.

**Patients and Methods:** Fresh tumor samples of ovarian epithelial cancers (n: 12) and non-epithelial ovarian cancers (n: 3) were analyzed for the expression of prostasin mRNA. The samples were analyzed for prostasin expression by conventional PCR and real time quantitative PCR. As a standard control indicating high expression of prostasin in normal tissue, prostate samples were analyzed.

**Results:** Using conventional PCR, prostasin was detected in all samples (epithelial and non-epithelial) except in 1 case of epithelial cancer. Using quantitative PCR, prostasin was overexpressed in the samples from epithelial ovarian cancer compared to prostate samples whereas it was not in the non-epithelial tumors.

**Conclusion:** Prostasin mRNA is overexpressed in epithelial ovarian cancer and the findings warrant further studies of prostasin as a biomarker candidate for the early detection of ovarian epithelial cancer. Quantitative PCR may add specificity as a tumor marker method of analysis.

**Key words:** tumor markers, prostasin, ovarian cancer.

# 1 INTRODUÇÃO

De acordo com as estatísticas americanas, a neoplasia epitelial de ovário corresponde à segunda neoplasia mais comum e a primeira em mortalidade nas mulheres que desenvolvem um câncer ginecológico. Além disso, esta neoplasia corresponde à quarta causa mais comum de morte por câncer em geral em mulheres, sendo que 50% de todos os casos ocorrem acima dos 65 anos. O ovário também pode estar envolvido com neoplasias de linhagem não epitelial, como originárias de células germinativas e estromais, e com neoplasias metastáticas de diversos sítios como câncer de mama e tumores do trato gastrointestinal (adenocarcinoma com células em anel-de-sinete metastático – tumor de *Krukenberg*)<sup>(1,2,3)</sup>. Nos Brasil, os dados divulgados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) não definem a exata situação das neoplasias malignas do ovário, mas a deixam entre as de baixa incidência. As mesmas ficam além do 11º lugar dentre aquelas que acometem as mulheres<sup>(4)</sup>. Registros brasileiros de 1982, feitos com base em diagnósticos histopatológicos - não estimativos como os do INCA - dão incidência para o câncer do ovário de 715 casos anuais, para uma população que na época era de 59.924.7662 mulheres (estimativa de 1999 igual a 79.624.134). Naquela época, o ovário era o 8º órgão no acometimento neoplásico geral para as mulheres<sup>(5,6)</sup>. Porém, tanto os dados de 1999 do INCA, quanto os de 1982 da Campanha Nacional de Combate ao Câncer, são unânimes em situar as neoplasias malignas do ovário como sendo a 3ª em ordem de incidência dentre aquelas que acometem os órgãos genitais femininos, ficando abaixo das lesões do colo e do corpo do útero<sup>(4,5,6)</sup>. O INCA publicou as taxas estimativas de 1999, as quais foram obtidas dos dados registrados no período de 1980 a 1996. À semelhança da estatística de incidência, as de mortalidade também não mostram discriminação do número de óbitos em decorrência da doença, mas a mesma situa-se além da 6ª posição<sup>(4,6)</sup>. Apesar de não ser a

neoplasia feminina mais comum, a ovariana lidera a *causa mortis* dentre as do câncer ginecológico. Seu patamar fica junto com as de alta mortalidade anual (esôfago, pulmão e estômago), com taxas acima de 50%<sup>(6)</sup>.

A taxa de mortalidade extremamente alta de pacientes com carcinoma de ovário se dá, indiscutivelmente, devido ao diagnóstico tardio desta doença. A sobrevida em 5 anos para aquelas pacientes com esta neoplasia com estágios clínicos (EC) iniciais gira em torno de 90%. Porém, menos de 25% das mulheres se apresentam com a doença neste estágio. Para os 75% das mulheres que se apresentam com a doença em estágios clínicos avançados a taxa de sobrevida em 5 anos cai para menos de 30%<sup>(7)</sup>.

O estadiamento da neoplasia de ovário é feito cirurgicamente de acordo com a *International Federation of Gynecologic Oncologists (FIGO)*<sup>(8)</sup> (Tabela 1)

**Tabela 1 - Estadiamento da FIGO para tumores de ovário**

<b>Estágios FIGO</b>	<b>Característica</b>
I	Tumor limitado aos ovários
IA	Tumor limitado a um ovário; cápsula intacta, ausência de tumor na superfície ovariana. Ausência de células malignas no líquido de ascite ou no lavado peritoneal.
IB	Tumor limitado a ambos os ovários; cápsula intacta, ausência de tumor na superfície ovariana. Ausência de células malignas no líquido de ascite ou no lavado peritoneal.
IC	Tumor limitado a um ou ambos os ovários e qualquer um dos seguintes: cápsula rota, tumor na superfície ovariana, presença de células malignas no líquido de ascite ou no lavado peritoneal.
II	Tumor envolve um ou ambos os ovários com extensão pélvica
IIA	Extensão e/ou implantes no útero e/ou trompa(s). Ausência de células malignas no líquido de ascite ou no lavado peritoneal.
IIB	Extensão para outros tecidos pélvicos. Ausência de células malignas no líquido de ascite ou no lavado peritoneal.
IIC	Extensão pélvica (2A ou 2B) com células malignas no líquido de ascite ou no lavado peritoneal.
III	Tumor envolve um ou ambos os ovários com metástases peritoneais microscopicamente confirmadas fora da pelve e/ou em linfonodos regionais.
IIIA	Metástases peritoneais microscópicas além da pelve.
IIIB	Metástases peritoneais macroscópicas além da pelve com 2 cm ou menos na sua maior dimensão.
IIIC	Metástases peritoneais macroscópicas além da pelve com mais de 2 cm na sua maior dimensão e/ou em linfonodos regionais.
IV	Metástases à distância (excluindo metástases peritoneais)

Fonte: The new FIGO stage grouping for primary carcinoma of the ovary (1985). *Gynecol Oncol* 1986, 25: 383-385.

A dificuldade em se diagnosticar precocemente esta neoplasia ocorre, principalmente, devido à falta de sintomas característicos e devido à ausência de um teste adequado de rastreamento e detecção precoce <sup>(9)</sup>.

Um agravante na dificuldade diagnóstica e conseqüentemente no rastreamento, é o fato de a localização dos ovários ser profunda na pelve, tornando a biópsia difícil, sendo necessário para isto, procedimentos muito invasivos, como laparotomia ou laparoscopia.

Existem sugestões na literatura que, para um teste de rastreamento de câncer de ovário ser adequado, será necessário um valor preditivo positivo (VPP) de aproximadamente 10% (10 procedimentos cirúrgicos para cada 1 câncer). Como esta neoplasia é incomum na população em geral, com uma prevalência de aproximadamente 40 casos para cada 100.000 mulheres acima de 50 anos, será necessária uma especificidade de 99,7% para um teste de rastreamento atingir um VPP de 10%, com uma sensibilidade de 67% <sup>(10)</sup>. Ou seja, devido a baixa prevalência de câncer de ovário, o VPP de um teste de rastreamento não é afetado por mudanças na sensibilidade do teste, pois o aumento da sensibilidade para 100% não alteraria substancialmente a especificidade necessária para se atingir um VPP de 10%. Portanto, o importante, no caso do câncer de ovário, é a busca de testes de rastreamento com alta especificidade <sup>(11)</sup>.

O único estudo randomizado para rastreamento de câncer de ovário publicado foi de Jacobs II e colaboradores. Os autores realizaram um estudo piloto randomizado para acessar o impacto do uso do CA 125 e da ultrassonografia (US) pélvica no rastreamento desta doença. Mulheres pós-menopáusicas foram randomizadas para o grupo controle (n=10.977) ou para o grupo de rastreamento (n=10.958). As mulheres randomizadas para o rastreamento foram submetidas a dosagem sérica de CA 125 trimestralmente e realizaram US pélvica se o nível de CA 125 fosse de 30 U/mL ou mais. A sobrevida média das mulheres que tiveram câncer no grupo rastreado foi de 72,9 meses enquanto que no grupo controle foi de 41,8 meses (p=0.011). O número de mortes por câncer de ovário não foi significativamente diferente entre os 2 grupos, sendo 18 no grupo controle e 9 no grupo rastreado (IC - 95% 0,78 – 5,13). O VPP deste protocolo de rastreamento foi de 20,7%.

Os autores ponderam que este estudo foi desenhado para demonstrar a viabilidade de um programa de rastreamento de câncer de ovário com CA 125 e US e não para avaliar impacto em sobrevida. Calcularam que, para se atingir um poder de 80% na detecção de

uma diminuição de mortalidade de 30% em um estudo randomizado controlado, se necessitaria de 120.000 mulheres sendo acompanhadas por aproximadamente 6 anos <sup>(12)</sup>.

De acordo com a revisão da literatura, constatamos a inexistência de estudos randomizados e controlados demonstrando que o rastreamento de câncer de ovário com os métodos presentemente sugeridos (CA 125 e US pélvica) tenha qualquer impacto em aumento de sobrevivência e, até que tais estudos sejam publicados, este rastreamento não pode ser recomendado para a população em geral fora do contexto de um estudo clínico.

Como já citamos acima, a dificuldade em desenvolver um teste de rastreamento adequado para a enfermidade em questão se dá principalmente devido à baixa incidência da doença na população, em geral, e ao difícil acesso aos ovários sem que seja preciso um procedimento oneroso e invasivo, como uma laparotomia e/ou laparoscopia. Estas duas características combinadas exigem que um teste tenha um valor preditivo positivo de pelo menos 10% para que seja justificável. Acreditamos que o empenho para a descoberta de marcadores tumorais com alta especificidade para o câncer de ovário seja o melhor caminho neste sentido, dada à acessibilidade e a pouca invasibilidade destes testes.

## **1.2 Marcadores tumorais**

Marcadores tumorais são substâncias secretadas ou liberadas pelas células tumorais, que migram para o sangue, urina ou outros sítios facilmente acessíveis, podendo ser usados como marcadores de rastreamento isoladamente ou em combinação, com uma invasibilidade muito pequena <sup>(11)</sup>.

Os marcadores tumorais têm o potencial de contribuir com o rastreamento, diagnóstico e prognóstico de tumores em geral. Além de contribuir na avaliação de resposta das neoplasias aos tratamentos ou de indicar recorrência de doença durante o seguimento <sup>(9)</sup>.

O *Early Detection Research Network* (EDRN) do Instituto Nacional do Câncer Americano estabeleceu 5 critérios para o desenvolvimento e avaliação de biomarcadores <sup>(13)</sup>:

- 1) uma fase pré-clínica exploratória para identificar as direções promissoras.
- 2) uma análise clínica e uma fase de validação para avaliar a habilidade do teste em detectar a doença estabelecida.
- 3) uma fase retrospectiva/longitudinal para determinar a habilidade do biomarcador em detectar a doença pré-clínica e definir uma regra para se considerar o teste como “rastreamento positivo”.
- 4) uma fase prospectiva de rastreamento para identificar a extensão e características da doença detectada pelo teste e as taxas de falso positivo.
- 5) um estudo prospectivo randomizado para determinar o impacto do rastreamento em reduzir as conseqüências da doença na população em geral.

Conforme será citado a seguir, diversos marcadores foram testados em neoplasia de ovário através das mais diversas técnicas, sendo que o mais amplamente estudado é o antígeno CA 125.

### ***1.2.1 CA 125***

O CA 125 é uma glicoproteína que está expressa no epitélio celômico durante o desenvolvimento embrionário. Foi descoberta após a hibridização somática de células do baço de camundongos imunizados com uma linhagem celular de carcinoma epitelial de ovário <sup>(14)</sup>.

O CA 125 tem um peso molecular acima de 200.000 MW e está distribuído no endotélio das trompas, endométrio, endocérvix e também em ovários normais. Além disso, é encontrado nas células mesoteliais da pleura, pericárdio e peritônio. A concentração sérica está elevada pela invasão vascular, destruição tecidual e inflamação associadas com

a doença maligna em mais de 90% das mulheres com câncer de ovário avançado e em 40% de todos os pacientes com neoplasia intra abdominal avançada. Os níveis séricos também podem estar elevados durante a menstruação, gravidez e em outras condições benignas como endometriose, peritonite ou cirrose, particularmente com ascite <sup>(15)</sup>.

O CA125 é o marcador mais investigado em câncer de ovário e tem um papel bem estabelecido na monitoração de resposta aos tratamentos realizados para esta neoplasia, na detecção de recorrências do tumor, bem como fator prognóstico <sup>(16, 17, 18,19)</sup>.

Porém, o problema do CA 125 como teste de rastreamento de neoplasia de ovário na população em geral é, primeiramente, a baixa prevalência da doença e, em segundo lugar, a baixa especificidade do teste, como se pode perceber de acordo com os dados descritos acima. Estes dois fatores associados rendem um VPP muito baixo à determinação sérica de CA 125 isoladamente <sup>(15)</sup>.

Desde a década de 80, os estudos já demonstravam a fragilidade deste marcador para rastreamento de câncer de ovário. Primeiramente Bast e colaboradores, em 1983, demonstraram que os níveis séricos do CA 125 estavam elevados (> 35 U/mL) em 82% das 101 mulheres com câncer de ovário presentes no seu estudo. Porém o CA 125 também estava elevado no sangue de 6% das 143 pacientes com doenças benignas, de 1% das 888 mulheres sadias e de 29% das pacientes com carcinomas originários de outros órgãos como pâncreas, pulmão, mama e trato gastrointestinal. A elevação ou queda dos níveis séricos do CA 125 durante o acompanhamento das pacientes com câncer de ovário esteve correlacionado com a progressão ou regressão de doença em 93% das vezes, sugerindo que, devido a conveniência e a correlação do CA 125 com progressão ou regressão de doença, este pode ser um marcador útil para monitoração de resposta ao tratamento em câncer de ovário <sup>(20)</sup>.

Em 1989, Jacobs e colaboradores, através de uma revisão da literatura, concluíram que a medida sérica do CA 125 para o rastreamento da neoplasia de ovário é limitada, pela baixa sensibilidade na doença em EC I, estando elevado em apenas 50% destes casos, e baixa especificidade, visto que este marcador está elevado em numerosas condições benignas e malignas <sup>(21)</sup>.

Em um estudo com um grupo de 915 mulheres, com média de idade de 55 anos, 4% apresentaram dosagem sérica de CA 125 acima de 35 U/mL e 0,8% acima de 65 U/mL, porém nenhuma destas pacientes tinha câncer de ovário <sup>(22)</sup>. No entanto, a especificidade deste teste melhora significativamente quando a sua concentração duplica. Entre 1082 mulheres com 40 anos ou mais, 3% apresentaram uma concentração sérica acima de 35 U/mL e em 2 mulheres este valor foi dobrado após 3 meses do primeiro exame. Este aumento foi sustentado em apenas uma paciente, na qual uma neoplasia epitelial de ovário foi detectada 21 meses após <sup>(23)</sup>. Se uma única determinação de CA 125 fosse usada para indicar uma cirurgia, mais de 70 laparotomias teriam sido realizadas nestes dois estudos para se detectar um só caso de câncer de ovário <sup>(15)</sup>.

Outros estudos investigaram se a associação do CA 125 com outros testes diagnósticos não invasivos, como US e outros marcadores tumorais, poderiam melhorar o desempenho de um programa de rastreamento da neoplasia de ovário como os citados a seguir.

#### ***1.2.1.1 CA 125 combinado com outros marcadores***

A combinação de outros marcadores tumorais com CA 125 tem sido explorada em diversos estudos. Em 56 pacientes com câncer de ovário e em 65 com doenças ovarianas benignas a combinação dos níveis plasmáticos de CA 125 e de D-dímeros demonstrou uma sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo para detecção do câncer respectivamente de 73,2%, 100%, 100% e 81,3% <sup>(24)</sup>. Em outro estudo, a combinação de 5

marcadores diferentes (CA 125, OVX1, ácido siálico lipídeo-associado (LASA), CA 15-3 e CA 72-4) atingiu uma especificidade de 93% e uma sensibilidade de 90,6% em diferenciar doença ovariana benigna ou maligna, em 429 pacientes utilizando análise de regressão logística <sup>(25)</sup>. Também Woolas RP e colaboradores demonstraram que o uso da combinação de CA 125, OVX1 e fator estimulante da colônia de macrófagos (M-CSF) apresentou uma sensibilidade (98%) maior que o CA 125 isolado ( $p < 0.0005$ ), porém sem aumento significativo na especificidade <sup>(26)</sup>.

Portanto, de acordo com a revisão da literatura, a utilização da combinação adequada de marcadores tumorais demonstrou ser útil no diagnóstico diferencial de neoplasias ovarianas benignas e malignas, sugerindo que a utilização destas combinações deve ser melhor estudada no sentido de contribuir para o rastreamento e diagnóstico precoce da neoplasia de ovário.

#### ***1.2.1.2 CA 125 combinado com US***

Com relação a associação do CA 125 com US podemos citar, além do estudo de Jacobs II e colaboradores citado anteriormente, um estudo com 5.550 mulheres aparentemente saudáveis (com 40 anos ou mais). Destas, 175 (3%) com CA 125 acima de 35 U/mL foram seguidas por 32 meses com dosagens de CA 125 a cada 3 meses, com exames pélvicos e US pélvica a cada 6 meses. Deste total de 175 mulheres, apenas 6 tiveram diagnóstico de câncer de ovário (EC IA=2, IIB=2, IIIC=2). Três carcinomas de ovário foram diagnosticados entre as 5.375 mulheres com níveis séricos normais de CA 125. Utilizando-se um ponto de corte de 35 U/mL, a sensibilidade e especificidade do CA 125 para mulheres acima de 50 anos foi de 67% e 98,5% respectivamente, mas o VPP foi de apenas 3%. A especificidade se mostrou ainda mais baixa em mulheres abaixo dos 50 anos e se o ponto de corte cai para 30 U/mL <sup>(27)</sup>. Outro programa de rastreamento utilizou a combinação de CA 125 e US abdominal quando CA 125 fosse maior que 30 U/mL e

incluiu 22.000 mulheres pós-menopáusicas. Quarenta e uma mulheres foram submetidas a cirurgia por resultados anormais dos exames e 11 tumores contra 30 falso positivos foram encontrados. No grupo de 21.959 mulheres com testes normais, 8 (falsos negativos) desenvolveram a doença. Este protocolo de rastreamento atingiu uma especificidade de 99,9% e VPP de 26,8%. Os autores concluíram que se necessita maior investigação sobre a capacidade deste esquema diagnosticar tumores em estágios mais precoces e impactar sobrevida <sup>(28)</sup>.

Apesar de suas limitações o CA 125 é o marcador padrão ao qual novos marcadores tumorais devem ser comparados. Com um ponto de corte de 30-35 U/mL, o que resulta numa sensibilidade de 50-60% em doença inicial, o CA 125 tem uma especificidade de aproximadamente 99% em mulheres aparentemente sadias na pós-menopausa. A especificidade do CA 125 é significativamente menor em mulheres pré-menopáusicas e em mulheres com condições ginecológicas benignas como cistos ovarianos, endometriose, entre outros diagnósticos diferenciais para tumor de ovário. É importante ressaltar que uma especificidade de 99% está muito abaixo da especificidade desejada de 99,7% requerida para um VPP de 10% <sup>(10,11)</sup>.

Como se pode observar, ainda não existem evidências de que o rastreamento do câncer de ovário com marcadores séricos tumorais como CA 125, ultrassonografia ou exames pélvicos, resultaria em uma diminuição da mortalidade por esta doença. Existe, no entanto, o risco de que o rastreamento com estes testes poderá resultar em mais laparotomias e laparoscopias diagnósticas do que câncer de ovário diagnosticado.

Assim, como já foi citado, a maioria das mulheres com câncer de ovário têm sua doença diagnosticada quando esta já se encontra disseminada e a proporção de sobrevida em 5 anos para estas pacientes é muito baixa. Já aquelas com doença localizada correspondem à minoria dos casos apresentando uma expectativa de cura considerável.

Portanto, consideramos o câncer de ovário um alvo interessante para o estudo de melhores estratégias para detecção precoce, incluindo a identificação de marcadores moleculares mais apropriados que isoladamente ou, mais provavelmente em associação, melhorem a detecção precoce desta doença.

### ***1.2.2 Novos possíveis marcadores tumorais para neoplasia epitelial de ovário***

O conhecimento e a utilização de novas tecnologias, como estudos genômicos e a análise do perfil transcricional e proteômico, para investigação de DNA, RNA e níveis protéicos em tumores, sangue e urina oferece um potencial para identificação de novos e mais eficazes marcadores tumorais para rastreamento de câncer. Estas tecnologias podem oferecer um rápido avanço na identificação destes marcadores se compararmos com a introdução da tecnologia de anticorpo monoclonal há poucas décadas <sup>(11)</sup>.

Como já foi citado, inúmeros marcadores têm sido pesquisados, isoladamente ou em combinações, para câncer de ovário através das mais diversas técnicas, como exemplo o M-CSF, OVX1, D-dímeros, SPOC1, CA15-3, CA 72-4, CA19.9, LASA, a oncoproteína HER 2, membralina, entre outros <sup>(24, 25, 26, 29, 30)</sup>.

Em especial um marcador cuja expressão encontra-se anormalmente elevada em tecido neoplásico ovariano, tem merecido consideração como potencial candidato a proteína rastreadora de câncer de ovário: a prostasina <sup>(31)</sup>.

#### ***1.2.2.1 Prostasina***

A prostasina é uma protease sérica sintetizada predominantemente pela glândula prostática humana e descoberta primeiramente no sêmen. Possui uma massa molecular de 40 kDa e uma atividade enzimática semelhante à tripsina. Está presente em maiores concentrações no sêmen humano e na próstata, porém quantidades menores de prostasina também podem ser encontradas em outros tecidos, tais como cólon, pulmões, rins,

pâncreas, glândulas salivares, brônquios entre outros. No tecido prostático ela está presente tanto nas células epiteliais, onde é sintetizada, como na secreção dentro do lúmen dos ductos prostáticos, onde é secretada <sup>(32,33)</sup>.

O gene PRSS8 localizado em 16p11.2 é o responsável pela síntese da preproprostasina, formada por 343 aminoácidos, e que apresenta identidade de 34-42% com outras proteases, como por exemplo com a calicreína plasmática, com o fator de coagulação XI e com a elastase 2A e 2B. A preproprostasina é convertida em proprostasina pela remoção de 32 aminoácidos e a proprostasina gerada é ativada por uma proteinase semelhante à tripsina se transformando em prostasina. Esta protease é composta por duas cadeias ligadas por uma ponte dissulfídica e apresenta uma porção hidrofóbica carboxil terminal, que ancora a mesma na membrana plasmática da célula de onde é liberada através de uma reação proteolítica <sup>(33,34)</sup>.

As proteases séricas fazem parte de uma grande família cujos membros participam de reações proteolíticas que são essenciais para diversos processos fisiológicos e patológicos no organismo, como na coagulação do sangue, na fibrinólise, nas doenças cardiovasculares e nas neoplasias <sup>(35,36)</sup>. A próstata produz certo número de proteases, entre elas a prostasina, e o líquido seminal humano é uma fonte rica de várias atividades proteolíticas. Estas proteases estão envolvidas com coagulação e liquefação do sêmen, com o desenvolvimento normal da glândula prostática e com o desenvolvimento de doenças da próstata. A presença da prostasina em outros órgãos sugere outras ações biológicas da mesma, além das atividades descritas no sêmen humano <sup>(32, 37)</sup>.

Existem alguns dados que sugerem que a prostasina possua uma ação supressora tumoral. Um estudo demonstrou que a expressão desta protease é significativamente mais baixa em neoplasia de próstata de alto grau e é ausente em câncer de próstata altamente invasivo em humanos e em ratos. A transfecção de cDNA de prostasina humana em células

de câncer de próstata reduziu a invasibilidade *in vitro* destas células, sugerindo uma função supressora de invasão <sup>(38)</sup>. A expressão de prostasina em câncer de próstata avançado, refratário à terapia hormonal, foi aproximadamente seis vezes menor quando comparado com tumores iniciais e esta expressão parece ser inversamente correlacionada com a diferenciação celular. Além disso, quase todos os casos de adenocarcinoma de próstata metastáticos e refratários à terapia hormonal apresentaram baixos níveis de prostasina em análise de mRNA e por imunohistoquímica <sup>(39)</sup>. Estes mesmos dados também já foram demonstrados em células neoplásicas de câncer de mama <sup>(40)</sup>.

A importância da prostasina em câncer de ovário foi estudada por MoK e colaboradores. Os autores analisaram linhagens ovarianas por cDNA *microarray* encontrando entre os genes hiperexpressos o cDNA da prostasina. O notável grau de expressão de prostasina estimulou estes pesquisadores a quantificar a mesma por RT-PCR em tempo real em duas linhagens. A expressão de prostasina variou de 120.3 a 410.1 vezes maior em células malignas comparado com as normais (p 0.001). Para validar esta superexpressão no tecido ovariano tumoral foi utilizada análise imunohistoquímica. Foram utilizadas amostras de dois ovários normais, dois tumores serosos *borderline*, de dois grau 1, dois grau 2 e dois grau 3 cistadenocarcinomas. Embora também detectada nos tecidos normais, a expressão de prostasina foi muito maior nos tecidos cancerosos. Anticorpos anti-prostasina foram utilizados para medir a prostasina sérica (ELISA) em 64 pacientes casos e em 137 controles (tecido normal, doença ginecológica benigna, outros cânceres ginecológicos). Níveis séricos de CA 125 foram previamente determinados em 70% dos pacientes. A média dos níveis séricos de prostasina foi de 13,7 µg/ml (10,5- 16,9 µg/ml, IC 95%) em 64 casos e de 7,5 µg/ml (6,6- 8,3 µg/ml, IC 95%) em 137 controles (p<0.001). Entre os casos, ocorreu bastante variabilidade entre os estágios clínicos da doença, entretanto mulheres com doença EC II tiveram os maiores níveis, sugerindo que esta pode

ser usada para detecção de casos precoces. Mulheres com histologia de tumor mucinoso tiveram níveis menores de prostasina. Em 14 de 16 casos os níveis séricos de prostasina foram significativamente menores no pós-operatório quando comparados com os níveis pré-operatório ( $p=0,004$ ). Em 37 pacientes com câncer de ovário não mucinoso e em 100 controles, os níveis séricos de CA 125 e de prostasina estavam disponíveis e a combinação de marcadores demonstrou uma sensibilidade de 92% (78-98.3%, IC 95%) e uma especificidade de 94% (87.4-97.7%, IC 95%) para detectar câncer de ovário. A sensibilidade do CA 125 e prostasina isolados, na mesma especificidade foram, respectivamente, 64.9% e 51.4%. Além disso, neste estudo, não houve uma correlação entre CA 125 e prostasina sugerindo que a combinação desses dois marcadores poderia aumentar a sensibilidade. Os autores sugerem que a prostasina deve ser investigada como teste de rastreamento ou como marcador tumoral, isoladamente e em combinação com CA 125, e relatam que o conhecimento atual sobre esta protease não fornece uma explicação de porque a prostasina e outras proteases séricas possam estar superexpressas em câncer de ovário. Além disso, não é possível saber com este estudo se a prostasina estará elevada no soro de pacientes com outros tipos de câncer <sup>(31)</sup>.

Em resumo, de acordo com os estudos publicados, a expressão da prostasina em neoplasia de ovário encontra-se aumentada. Poder determinar a presença e quantificar este marcador em câncer de ovário poderá encorajar o desenvolvimento de novos estudos sobre o papel da prostasina no rastreamento, diagnóstico e prognóstico desta doença.

## **2 OBJETIVOS**

2.1 Avaliar a frequência em que transcritos de prostasina estão presentes em amostras de tumores malignos de ovário de origem epitelial.

2.2 Quantificar a expressão de transcritos de prostasina entre amostras de tumores malignos de ovário de origem epitelial.

## **3 PACIENTES E MÉTODOS**

### **3.1 Pacientes**

Uma série de 30 pacientes com suspeita de câncer de ovário que foram submetidas a cirurgia para confirmação diagnóstica e/ou terapêutica nos Hospitais São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (HSL-PUCRS), Fêmina e Conceição no período de setembro/2003 a setembro/2005 foram selecionadas para coleta de tecido tumoral ovariano no momento do tratamento cirúrgico. As pacientes não possuíam diagnóstico prévio de carcinoma e não haviam recebido nenhuma forma de tratamento antineoplásico prévio. Todas as pacientes receberam e assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

### **3.2 Coleta das Amostras**

Durante o procedimento cirúrgico de retirada e/ou biópsia do tumor de ovário, antes de colocar a peça em formol, o patologista seccionou uma parte da lesão que foi imediatamente armazenada em nitrogênio líquido. Nos casos de cistos de ovário puramente benignos o material não foi coletado ou foi desprezado após esta confirmação. Amostras de tecido prostático normal foram utilizadas como controle da expressão de transcritos de prostasina.

### **3.3 Isolamento e Caracterização do RNA**

As células do tumor foram maceradas e ressuspensas em 1 ml de reagente TRIZOL<sup>®</sup> (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 200 µl de clorofórmio e a amostra foi

centrifugada a 12.000 rotações por minuto (rpm) por 15 minutos a 4 °C (HIMAC CRT15T Refrigerated Centrifuge, HITACHI). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, precipitado com 500 µl de isopropanol e mantido por 10 minutos em temperatura ambiente. Após este intervalo, a amostra foi novamente centrifugada a 12.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o RNA precipitado lavado com etanol a 70%, secado a vácuo e finalmente ressuspensão em 20 µl de água tratada com DEPC (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) para ser armazenado a – 80 °C até posterior processamento. A quantidade e pureza do RNA total extraído foram estimadas por densitometria ótica (DO) a 260 nm e 280 nm. Somente foram utilizadas as amostras com relação DO 260/280 maior que 1,8.

### **3.4 Síntese de DNA complementar (cDNA)**

Um micrograma de RNA total foi utilizado como fonte para a síntese de cDNA por transcrição reversa (RT), utilizando a enzima SuperScript II Rnase H- transcriptase reverse (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). O volume total da mistura (20 µl) continha os seguintes reagentes: 500 ng de RNA, 100 pmoles de oligo dT, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, tampão da enzima 10X concentrado, 10 mM de dithiothreitol, 10 mM de cada um dos dideoxynucleotídeos, 200 unidades de SuperScript II e 5 U de bloqueador de RNases (RNase Out™ Ribonuclease Inhibitor; Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Um microtubo contendo apenas RNA, dideoxynucleotídeos e oligodTs foi inicialmente incubado a 65 °C por 5 minutos em termociclador (iCycler, BioRad, Hercules, CA, USA) e transferido para recipiente contendo gelo por 1 minuto a fim de promover a separação de fitas de RNA espuriamente hibridizadas. A seguir, os demais componentes da reação de transcrição reversa citados acima foram acrescentados e incubados a 42 °C por 50 minutos. Para neutralização da transcriptase reversa a mistura foi aquecida a 70 °C por 15

minutos e desnaturada no gelo por 1 minuto. No final, para degradação da fita de RNA a mistura recebeu 1 u de RNase H e foi incubada por 20 minutos a 37 °C. O cDNA foi armazenado em freezer a -20 °C.

### 3.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A identificação dos transcritos de prostasina foi realizada através da técnica de RT-PCR. Os amplímetros utilizados foram os seguintes: prostasina – direto 5' ACTTGAGCCACTCCTTCCTTCAG 3' e reverso 5' CTGATGGTCCCAAAAAGCACAC 3' <sup>(31)</sup>, e, para o controle interno, o segmento gênico da  $\beta$  globina - direto 5' GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC 3' e reverso 5' CAA CTT CAT CCA CTG TCA CC 3' (268 pb).

A reação de PCR foi constituída de 2,5  $\mu$ l de DNA complementar em uma solução com volume final de 25  $\mu$ l, contendo 10 pmol de cada primer, 200 pmol de desoxinucleosídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1,5 mM de  $MgCl_2$ , 10X tampão da enzima, 2U Taq Polimerase e água deionizada e bidestilada até completar o volume de 25 $\mu$ l. O material foi submetido ao protocolo de amplificação constituído de : 31 ciclos de 96° C por 1 min, 60° C por 1 min, 72 60° C por 10 durante 10 min.

A reação de PCR foi realizada em termociclador automático (MJ Research PT150CA, USA). Todas as reações foram acompanhadas de uma Mix sem DNA, para excluir possibilidades de contaminação. O resultado da amplificação foi verificado por eletroforese em gel de agarose a 3,5% e observado em transluminador ultravioleta (201 Macrovue Transluminator LKB, Bromma, Sweden).

### 3.6 Reação em cadeia da polimerase em tempo real para quantificação relativa (QT-PCR).

A fim de avaliar a expressão relativa da prostasina nas amostras de tecidos obtidos a partir de diferentes tumores empregou-se PCR quantitativo baseado em química TaqMan. Para cada amostra avaliada dois genes humanos foram considerados: prostasina, o gene de interesse e  $\beta$ -actina, empregada como controle endógeno para calibração da eficiência da reação enzimática de transcrição reversa e normalização entre amostras. Dez nanogramas de cDNA foram acrescentados à mistura contendo tampão, dideoxinucleotídeos, Hot-Start Taq DNA polimerase (AmpliTaq, Applied Biosystems, Foster, CA, USA) e  $MgCl_2$ . Os *primers* e sondas TaqMan desenhados previamente e validados para prostasina e  $\beta$ -actina (Assays-on-Demand®, Applied Biosystems, Foster, CA, USA) contendo os fluoróforos FAM e VIC, respectivamente, foram adicionados às misturas e transferidos para micro placa padrão de 96 poços esterilizada e isenta de RNAases e DNases (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). As amostras foram carregadas em triplicatas e a placa transferida para o termociclador acoplado ao sensor óptico e interface computadorizada para análise de fluorescência em tempo real (ABI 7500, Applied Biosystems, Foster, CA, USA). O protocolo utilizado foi um ciclo de 95 °C por 10 minutos e 50 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 60 segundos. Antes da análise das amostras propriamente ditas, o sistema de amplificação usando prostasina e  $\beta$ -actina humanos foram validados e a eficiência calculada. Isso foi feito como descrito anteriormente <sup>(31)</sup> a partir de uma diluição seriada de ambos os genes com concentrações de 100 ng, 50 ng, 25 ng e 12.5 ng e controle negativo (sem DNA). Os valores foram então plotados e utilizados em análise de regressão linear levando-se em consideração o coeficiente de determinação ( $r^2$ ), sendo valores iguais ou superiores a 98% estabelecidos como padrão. Sendo a prostasina altamente expressada na próstata, o cDNA de uma amostra de próstata humana foi utilizado como referência

para todos os cálculos de expressão relativa utilizando o sistema  $\Delta\Delta Ct$  <sup>(41)</sup>. Através do manejo dos dados gerados em tempo real identificou-se o ciclo no qual a fluorescência começa a aumentar exponencialmente acima da fluorescência intrínseca do fluoróforo (“*background fluorescence*”), referida como Ct, ou *Cycle Threshold*. A partir disso, o Ct da prostasina para cada amostra foi normalizada em relação ao Ct do controle endógeno ( $\beta$ -actina) de cada amostra e comparados ao Ct de um tecido calibrador (próstata). O calibrador é um tecido de referência que expressa os genes analisados e nesse caso os resultados refletem a variação de expressão em relação ao calibrador. Para cálculo dos valores de expressão das amostras relativos à próstata, inicialmente calculou-se o  $\Delta Ct$  (Ct da amostra para prostasina – Ct do controle endógeno da amostra). A seguir o  $\Delta Ct$  de cada amostra foi subtraído do  $\Delta Ct$  da amostra calibradora (próstata) gerando o  $\Delta\Delta Ct$  normalizado e já calibrado. Finalmente, a expressão do gene de interesse observado nas diferentes amostras de tecidos em relação ao tecido de referência (próstata) é dada pela função  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Características das Pacientes

Esta é uma série de pacientes operadas com suspeita de neoplasia de ovário. De um total de 30 pacientes elegíveis, 15 foram incluídas nesta análise. As amostras tumorais de cada uma delas foram coletadas prospectivamente. Os casos do Hospital Fêmeina perfazem 25 % (n= 4) das amostras analisadas e foram todos consecutivos. No Hospital Conceição, devido ao sistema de agendamento dos procedimentos cirúrgicos, não se tem a informação sobre a seqüência de novos casos (n= 6). Dos 5 casos do HSL-PUCRS, todos foram consecutivos. Entre as 15 amostras excluídas, em 10 o material foi desprezado, como descrito previamente, porque se tratavam de cistos puramente benignos e em 5 casos o RNA da amostra tumoral não estava em condições ideais para ser avaliado como observado através de RT-PCR convencional para actina humana e prostasina.

Das 15 amostras analisadas, 12 (80%) tinham diagnóstico histológico de neoplasia epitelial maligna de ovário, as quais chamamos de grupo 1, e 3, chamado de grupo 2, apresentaram outros tipos de tumores de ovário conforme tabelas abaixo. (Tabelas 2 e 3):

**Tabela 2 - Sub-tipos histológicos das amostras do grupo 1**

Sub-tipo Histológico	Número de Pacientes
Carcinoma seroso	5
Adenocarcinoma não especificado	4
Carcinoma Endometrióide	1
Tumor <i>borderline</i>	2
Total	12

**Tabela 3 - Sub-tipos histológicos das amostras do grupo 2**

<b>Sub-tipo Histológico</b>	<b>Número de Pacientes</b>
Melanoma metastático	1
Tumor de <i>Krukenberg</i>	1
Tecoma	1
Total	3

No grupo de amostras de neoplasia epitelial de ovário, a idade das pacientes variou de 29 a 83 anos – média de 61,17 anos. No grupo de pacientes com neoplasias não epiteliais a idade variou de 51 a 77 anos – média de 64,67 anos.

Em relação ao estadiamento, 90% das pacientes com neoplasia epitelial de ovário se apresentaram com doença avançada (EC III e IV). Julgou-se irrelevante citar o estadiamento das pacientes do grupo 2 por se tratar de um grupo pequeno e heterogêneo onde 2 pacientes apresentaram tumores de outros sítios metastáticos para ovário.

A Tabela 4 permite uma visão geral das amostras relacionando tipo histológico, idade das pacientes, estadiamento, assim como a presença e quantificação do marcador prostasina em relação ao tecido prostático em cada amostra tumoral sendo estes dois últimos resultados discutidos detalhadamente a seguir.

**Tabela 4 - Relação dos tipos histológicos, idade, EC, expressão e quantificação da prostasina em relação à próstata na totalidade das amostras em estudo.**

	Histologia	Idade	EC	PCR	QT-PCR
1	Epitelial	61	III	+	-3,7653
2	Não epitelial	66	Não avaliável	+	-2,1692
3	Não epitelial	51	Não avaliável	+	-0,957
4	Não epitelial	77	Não avaliável	+	0,4091
5	Epitelial	43	III	+	1,1725
6	Epitelial	29	III	+	1,5954
7	Epitelial	83	III	+	1,6114
8	Epitelial	70	III	+	1,7833
9	Epitelial	61	I	+	1,7941
10	Epitelial	64	IV	+	2,1114
11	Epitelial	59	IV	+	2,199
12	Epitelial	49	III	-	2,4949
13	Epitelial	77	III	+	2,7032
14	Epitelial	70	III	+	2,7623
15	Epitelial	68	III	+	3,3071

#### 4.2 Presença da Prostrasina nas Amostras (PCR)

Com relação à expressão da prostasina por RT-PCR todas as amostras das pacientes do grupo 1, com exceção de 1 caso, foram positivas (Tabela 5). Assim como também foram positivas todas as amostras do grupo 2.

**Tabela 5 - Expressão da prostasina no grupo 1**

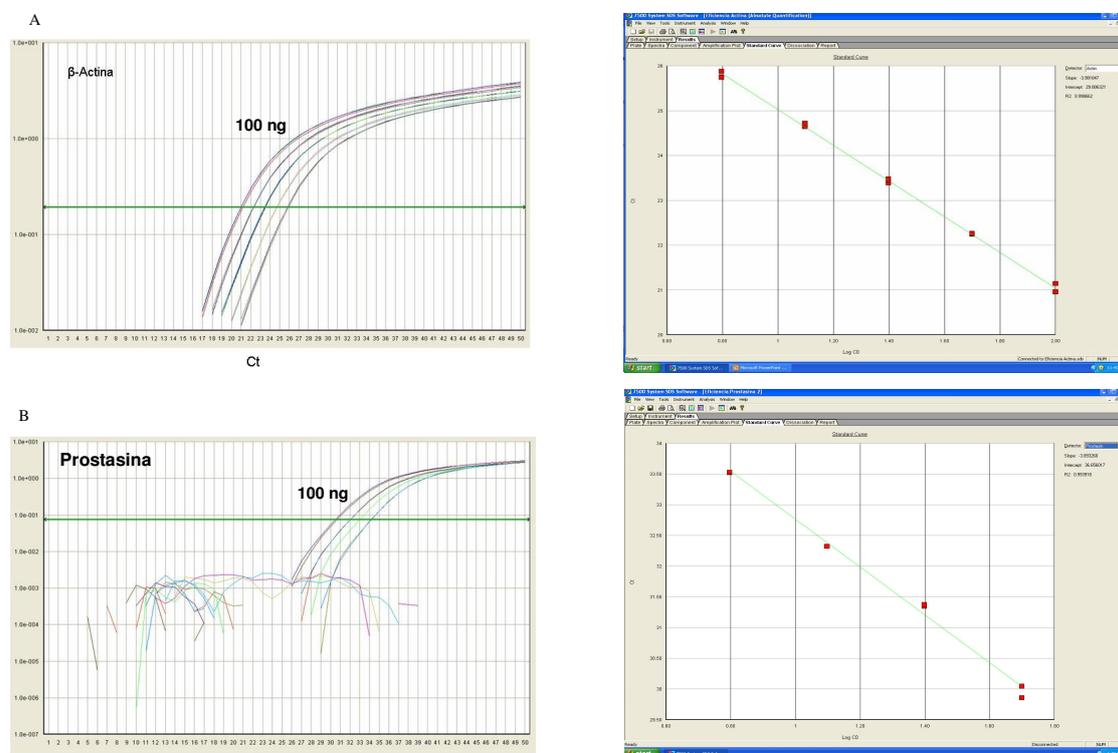
<b>Expressão da prostasina pela PCR</b>	<b>Frequência</b>	<b>%</b>
PCR positiva	11	91,7
PCR negativa	1	8,3
Total	12	100,0

### 4.3 QT-PCR

#### *4.3.1 Cálculo da Eficiência e Validação do Ensaio Quantitativo*

Nesse sistema de quantificação os dados de aumento da intensidade de fluorescência durante a amplificação são analisados e permitem uma estimativa da quantidade inicial de RNA/cDNA. Durante o processo, a partir de um determinado ciclo de amplificação, existe um crescimento exponencial do DNA sintetizado que se reflete no aumento da fluorescência acima emissão intrínseca do fluoróforo - o Ct. O cálculo da eficiência a partir de uma diluição seriada representa esse processo e serve como um elemento de aferição do ensaio de expressão relativa, onde deve se mostrar uma correlação positiva entre a quantidade de DNA e seu aumento exponencial na fase geométrica de amplificação para ambos, gene de interesse e controle endógeno <sup>(43)</sup>. Assim sendo, cada ciclo representa a duplicação do produto e, por conseguinte, da fluorescência. No sistema aqui utilizado, para cada diluição (fator de diluição = 2) uma diferença de 1 ciclo deve ser observada. Os resultados da amplificação das diluições seriadas demonstraram exatamente isso, ou seja, para cada ciclo de amplificação houve aumento de um Ct para prostasina e

actina (Figura 1), gerando coeficientes de determinação da ordem de 0.9902 e 0.9985 respectivamente.



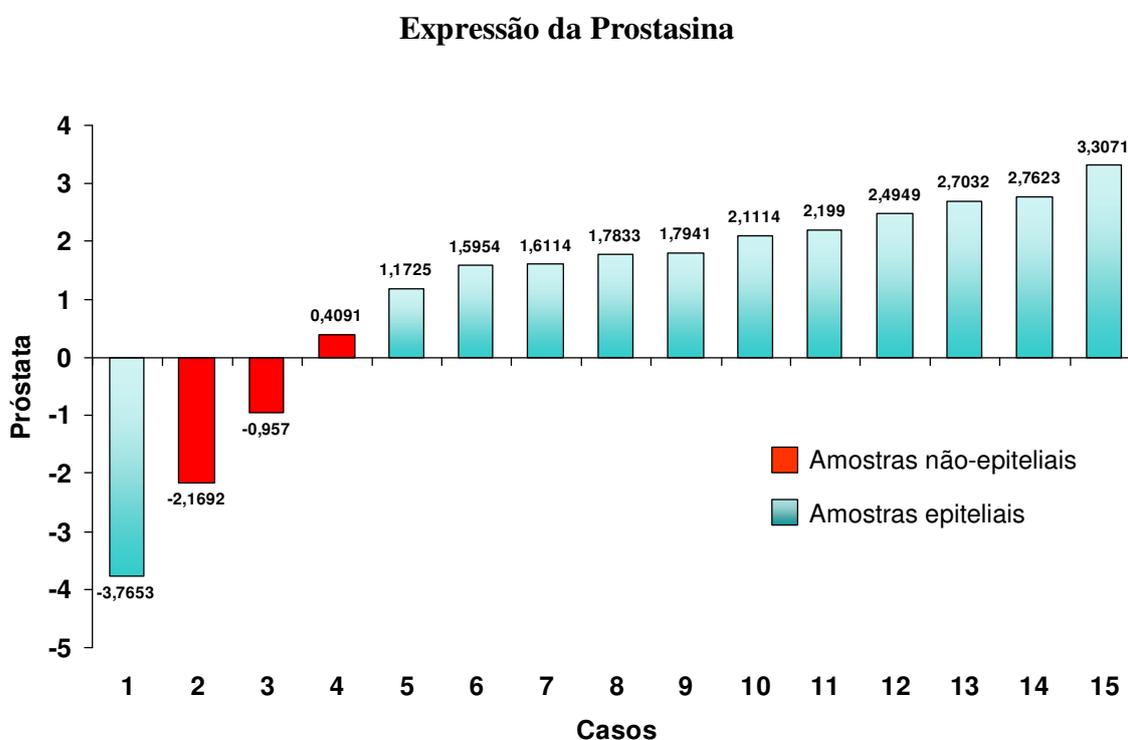
**Figura 1. Análise da eficiência da reação de amplificação.**

cDNA obtido de próstata humana (100 ng) foi submetido à diluição seriada (fator de diluição = 2) e amplificado por 50 ciclos usando primers e sondas para actina (painel superior, A) e prostasina (painel inferior, B). O gráfico de Ct x Fluorescência (esquerda) revelou aumento da fluorescência proporcional à concentração de cDNA utilizada. Na fase logarítmica houve, para cada ciclo, duplicação do produto amplificado e da fluorescência. Os Cts são mais baixos no ensaio usando a prostasina devido à menor abundância desse gene comparado à actina. Retas de regressão (direita) traçadas sobre os pontos de coleta de fluorescência na fase logarítmica demonstram coeficiente de determinação de 0.9985 e 0.9902 para actina e prostasina respectivamente. As diluições foram analisadas em triplicatas e as médias dos Cts consideradas no cálculo da validação.

### 4.3.2 Quantificação da Prostatina nas Amostras (QT-PCR em tempo real).

Das 15 amostras onde se quantificou a expressão da prostatina, 14 tinham expressado este marcador por RT-PCR.

Em 3 amostras, a quantificação da prostatina foi abaixo da apresentada pelo tecido prostático (designado como quantidade “0” ou basal no gráfico), sendo que 2 deles eram tumores não epiteliais (melanoma metastático e tecoma) e 1 epitelial (adenocarcinoma não especificado). (Figura 2)



**Figura 2. Quantificação relativa da prostatina**

#### 4.3.3 *Quantificação da prostasina nas amostras que apresentaram superexpressão.*

A próstata é o tecido humano que mais expressa o marcador prostasina. Nesta série, 12 amostras tumorais demonstraram superexpressão da prostasina em relação ao tecido prostático. Destas, 11 eram neoplasias epiteliais (91,66%) e 1 neoplasia não epitelial (8,33%). A amostra de menor expressão mostrou apenas uma pequena elevação na sua titulação e tratava-se de um tumor metastático, tipo *Krukenberg*, não-epitelial (0,4 vezes maior). Já a maioria das amostras epiteliais mostraram um aumento importante desta titulação chegando até 3,30 vezes a expressão da próstata (calibrador), tendo sido a expressão média de todas as amostras 2,01 vezes maior (Tabela 6).

**Tabela 6 - Total de amostras com superexpressão de prostasina**

N	12
Média	1,995308
Mediana	1,952750
Desvio padrão	0,7804753
Valor mínimo	0,4091
Valor máximo	3,3071

#### 4.3.4 *Quantificação da prostasina nas amostras epiteliais*

Excluindo-se a única amostra epitelial que não superexpressou o marcador, a menor expressão foi 1,17 vezes e a maior, como descrita acima, de 3.30 vezes, com média de 2,13 vezes (Tabela 7).

**Tabela 7 - Amostras epiteliais com superexpressão de prostasina**

<b>N</b>	<b>11</b>
Média	2,139509
Mediana	2,111400
Desvio padrão	0,6289491
Valor mínimo	1,1725
Valor máximo	3,3071

Os resultados deste trabalho demonstraram, através da técnica de PCR convencional, que a prostasina está presente na grande maioria das amostras tumorais ovarianas, sendo estas epiteliais ou não epiteliais. A técnica de PCR em tempo real tornou possível a quantificação relativa da prostasina e demonstrou que a mesma está superexpressa nas amostras epiteliais.

## 5 DISCUSSÃO

Através da utilização da técnica de RT-PCR e de RT-PCR em tempo real em amostras tumorais ovarianas nós identificamos não somente a presença da prostasina, como também a sua superexpressão em neoplasia epitelial de ovário quando comparadas ao tecido prostático ou seja, o tecido humano com maior expressão de prostasina conforme será descrito a seguir.

Conforme já relatado previamente, a prostasina foi primeiramente descrita por Yu JX e colaboradores em 1994 quando os autores purificaram e caracterizaram esta nova proteinase do líquido seminal humano. Neste estudo eles também identificaram a distribuição tecidual da prostasina através de radioimunoensaio (RIA) e a sua localização na glândula prostática com técnicas de imunohistoquímica. Uma técnica específica de RIA foi desenvolvida para prostasina permitindo que sua distribuição e quantificação pudesse ser analisada em tecidos e fluidos do corpo humano. A partir disto se pôde verificar que esta proteinase está presente em altos níveis na glândula prostática ( $143.7 \pm 15.9$  ng/mg,  $n=3$ ) e líquido seminal ( $8.61 \pm 0.42$   $\mu$ g/ml,  $n=3$ ), em níveis moderados ( $2-6$  ng/mg) em cólon, pâncreas, pulmão, rim, glândula salivar, fígado e brônquios, assim como na urina ( $0.201 \pm 0.029$   $\mu$ g/ml,  $n=3$ ) e não está presente em cérebro, coração, músculos, testículo e aorta<sup>(32)</sup>.

Em seguida, em outro estudo realizado pelos mesmos autores, foi feita uma análise referente a expressão de mRNA da prostasina em vários tecidos humanos com a técnica de RT-PCR confirmando sua expressão e sua ausência nos respectivos tecidos já citados acima. É extremamente relevante mencionar que no trabalho de Yu JX e colaboradores foi verificado ausência da expressão de mRNA de prostasina em tecido ovariano normal, foco

do nosso estudo, em baço, útero, células endoteliais da veia umbilical, linfócitos e polimorfonucleares<sup>(33)</sup>. No nosso estudo a detecção de mRNA de prostasina por RT-PCR não foi realizada em amostras de tecido ovariano normal, porém esta protease estava presente em todas as amostras tumorais avaliadas por RT-PCR com exceção de um único caso.

O envolvimento da prostasina em processos neoplásicos foi sugerido por seus descobridores, os quais ressaltam que algumas moléculas envolvidas na regulação da expressão do seu gene são promotoras de tumores e estão envolvidas com metastatização e angiogênese tumoral, sugerindo que se explore o papel da prostasina no desenvolvimento de tumores<sup>(33,34)</sup>. Já outros dados provenientes de estudos com tumores de próstata e de mama, também já citados anteriormente, sugerem que a prostasina possa ter uma ação supressora tumoral<sup>(38,39,40)</sup>.

Como potencial marcador tumoral a prostasina foi estudada em câncer de próstata por Laribi A e colaboradores em um estudo onde o sangue de todos os 86 pacientes sem câncer de próstata falhou em amplificar transcritos de prostasina por RT-PCR enquanto que foi detectada no sangue de aproximadamente 30% dos pacientes com câncer de próstata precoce e em 63% de pacientes com doença metastática<sup>(42)</sup>.

A importância da prostasina no câncer de ovário foi somente analisada por Mok e colaboradores em estudo já citado anteriormente quando os autores analisaram linhagens de células ovarianas tumorais e normais por cDNA *microarray* encontrando nos casos de malignidade, entre os genes hiperexpressos, o cDNA da prostasina. O notável grau de expressão de prostasina nas linhagens neoplásicas detectado por RT-PCR em tempo real, imunohistoquímica e no sangue das pacientes através de ELISA nos estimulou a realizar este estudo<sup>(31)</sup>.

Como pôde ser observado, no nosso trabalho foi possível detectar não somente a presença do mRNA da prostasina na maioria das amostras tumorais como também uma superexpressão desta em amostras de neoplasia epitelial de ovário em comparação com as amostras de tecido prostático corroborando, de certa forma, os achados de Mok e colaboradores. Chama a atenção a expressão mais baixa da prostasina em neoplasias não epiteliais sugerindo uma possível maior especificidade deste possível marcador.

Em uma única amostra não foi possível detectar a presença de prostasina através de RT-PCR, apesar da detecção de actina. Interessantemente, a mesma amostra demonstrou expressão de prostasina quando foi submetida a amplificação em tempo real. Esta variação é difícil de ser explicada e, muito possivelmente, está relacionada a questões técnicas relativas ao momento da transcrição reversa do RNA.

Acreditamos ter demonstrado o valor da prostasina como um potencial marcador tumoral para neoplasia epitelial de ovário a ser melhor estudado e o valor da implementação da técnica de RT-PCR em tempo real no nosso meio, o que torna bem mais precisa a identificação de biomarcadores que possam ter utilidade clínica através da quantificação dos mesmos.

A utilização competente de sistemas de amplificação por reação de polimerase em cadeia baseados em fluorescência tem aumentado significativamente a rapidez e sensibilidade dos testes de expressão gênica. A análise de genes diferencialmente expressados tem sido utilizada experimentalmente na compreensão de fenômenos celulares relacionados à diferenciação, proliferação e apoptose e pode também gerar dados importantes no estudo clínico e diagnóstico de lesões neoplásicas <sup>(43,44)</sup>.

Porém este estudo tem muitas limitações. Em primeiro lugar o pequeno tamanho de nossa amostra e o estágio avançado da maioria dos nossos casos torna este trabalho inadequado para estudar um marcador de rastreamento, já que para isto é importante que

um marcador detecte casos em estágios precoces. Além disso, o fato de não termos analisado e quantificado a expressão da prostasina também em tecidos ovarianos normais nos deixa em dúvida se somente o tecido ovariano neoplásico superexpresse este potencial marcador em relação à próstata, embora outros autores já tenham demonstrado uma maior expressão da prostasina nos tecidos tumorais <sup>(31,33)</sup>. Também seria importante que amostras de sangue destas pacientes e de um grupo controle composto por mulheres saudáveis fosse analisado em relação a presença do marcador em estudo, pois é de extrema importância saber se a prostasina, além de superexpressa, é secretada pelos tumores para a corrente sanguínea, o que é fundamental para que uma substância seja adequada como marcador tumoral<sup>(11)</sup>.

É importante salientar que, infelizmente, o nível sérico do CA 125 das pacientes avaliadas neste trabalho estava disponível em apenas 4 casos e com isso não tornou viável a avaliação da correlação deste marcador com a prostasina.

Os nossos resultados nos estimulam a seguir estudando o papel da prostasina como um marcador tumoral. Consideramos de extrema importância poder responder às questões levantadas acima e verificar se há correlação entre diagnóstico da neoplasia epitelial de ovário e liberação de transcritos de prostasina no sangue.

## **6 CONCLUSÕES**

As técnicas de RT-PCR e RT-PCR em tempo real demonstraram que transcritos de prostasina estão não somente presentes na grande maioria das amostras de tumores epiteliais de ovário como também superexpressos em relação ao tecido prostático normal.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A et al. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin*. 2005Jan-Feb;55(1):10-30.
2. Yancik R. Ovarian cancer. Age contrasts in incidence, histology, disease stage at diagnosis, and mortality. *Cancer*. 1993Jan;71 Suppl2:517-23.
3. Thigpen JT. Ovaries and fallopian tubes. In: Abeloff MD, Armitage JO, Lichter AS, Niederhuber JE. *Clinical oncology*. Segunda edição. Philadelphia, Pennsylvania: Churchill Livingstone; 2000. p. 2016-40.
4. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 1999. Rio de Janeiro. INCA, 1999.
5. Brumini, R. Câncer no Brasil: dados histopatológicos 1976 – 1980. Rio de Janeiro, Campanha Nacional de Combate ao Câncer, Ministério da Saúde, 1982.
6. Pascalicchio JC, Fristachi CE, Castanho PL, Kue CM, Piatto S, Baracat FF. Epidemiologia do câncer de ovário no Brasil. *RSBC*. 2000Jul-Sep;11:46.
7. Fishman DA, Bozorgi K. The scientific basis of early detection of epithelial ovarian cancer early detection program (NOCEDP). In: Stack MS, Fishman DA. *Ovarian cancer*. Boston, MA: Kluwer Academic Publishers; 2002. p. 3-28.
8. FIGO. The new FIGO stage grouping for primary carcinoma of the ovary (1985) [announcement]. *Gynecol Oncol* 1986 Nov;25(3):383-5.
9. Meyer T, Rustin GJS. Role of tumour markers in monitoring epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer*. 2000May;82(9):1535-8.
10. Bast RC Jr, Xu FJ, Yu YH, Barnhill S, Zhang Z, Mills GB. CA 125: the past and the future. *Int J Biol Markers*. 1998Oct-Dec;13(4):179-87.
11. Mills GB, Bast RC Jr, Srivastava S, et al. Future for ovarian cancer screening: novel markers from emerging technologies of transcriptional profiling and proteomics. *J Natl Cancer Inst*. 2001Oct;93(19):1437-9.
12. Jacobs IJ, Skates SJ, MacDonald N, Menon U, Rosenthal AN, Davies AP et al. Screening for ovarian cancer: a pilot randomised controlled trial. *Lancet*. 1999Apr;353(9160):1207-10.
13. Pepe MS, Etzioni R, Feng Z, Potter JD, Thompson ML, Thornquist M et al. Phases of biomarker development for early detection of cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2001Jul;93(14):1054-61.

14. Bast RC Jr, Freeney M, Lazarus H, Nadler LM, Colvin RB, Knapp RC. Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *J Clin Invest.* 1981Nov;68(5):1331-7.
15. Tuxen MK, Sölétormos G, Dombernowsky P. Tumor markers in the management of patients with ovarian cancer. *Cancer Treat Rev.* 1995May;21(3):215-45.
16. Rustin GJ, Nelstrop AE, Mclean P, Brady MF, McGuire WP, Hoskins WJ et al. Defining response of ovarian carcinoma to initial chemotherapy according serum CA125. *J Clin Oncol.* 1996 May;14(5):1545-51.
17. Rustin GJ, Nelstrop AE, Tuxen MK, Lambert HE. Defining progression of ovarian carcinoma during follow-up according to CA 125: a North Thames Ovary Group study. *Ann Oncol.* 1996Apr;7(4):361-4.
18. Ind T, Lles R, Shepherd J, Chard T. Serum concentration of cancer antigen 125, placental alkaline phosphatase, cancer associated serum antigen and free beta human chorionic gonadotrophin as prognostic markers for epithelial ovarian cancer. *Br J Obstet Gynaecol* 1997 Sep;104(9):1024-9.
19. Nagele F, Petru E, Medl M, Kainz C, Graf AH, Sevela P. Preoperative CA 125: an independent prognostic factor in patients with stage I epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol.* 1995Aug;86(2):259-64.
20. Bast RC Jr, Klug TL, St John E, Jenison E, Niloff JM, Lazarus H et al. A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med.* 1983Oct(15);309:883-7.
21. Jacobs I, Bast RC Jr. The CA 125 tumor-associated antigen: a review of the literature. *Hum Reprod.* 1989Jan;4(1):1-12.
22. Zurawski VR Jr, Broderick SF, Pickens P, Knapp RC, Bast RC. Serum CA 125 levels in a group of nonhospitalized women: relevance for the early detection of ovarian cancer. *Obstet Gynecol.* 1987Apr;69(4):606-11.
23. Zurawski VR Jr, Sjøvall K, Schoenfeld DA, Broderick SF, Hall P, Bast RC Jr et al. Prospective evaluation of serum CA 125 levels in a normal population. Phase I: the specificities of a single and serial determinations in testing for ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 1990Mar;36(3):299-305.
24. Gadducci A, Baicchi U, Marrai R, Ferdeghini M, Bianchi R, Fachini V. Preoperative evaluation of D-dimer and CA125 levels in differentiating benign from malignant ovarian masses. *Gynecol Oncol.* 1996Feb;60(2):197-202.
25. Woolas RP, Conaway MR, Xu F, Jacobs IJ, Yu Y, Daly L et al. Combinations of multiple serum markers are superior to individual assays for discriminating malignant from benign pelvic masses. *Gynecol Oncol.* 1995Oct;59(1):111-6.
26. Woolas RP, Xu FJ, Jacobs IJ, Yu YH, Daly L, Berchuck A et al. Elevation of multiple serum markers in patients with stage I ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1993Nov;85(21):1748-51.

27. Einhorn N, Sjövall K, Knapp RC, Hall P, Scully RE, Bast RC Jr et al. Prospective evaluation of serum CA 125 levels for early detection of ovarian cancer. *Obstet Gynecol.* 1992Jul;80(1):14-8.
28. Jacobs I, Davies AP, Bridges J, Stabile I, Fay T, Lower A et al. Prevalence screening for ovarian cancer in postmenopausal women by CA 125 measurement and ultrasonography. *BMJ.* 1993Apr;306(6884):1030-4.
29. Verri E, Guglielmini P, Puntoni M, Perdelli L, Papadia A, Lorenzi P et al. HER2/neu oncoprotein overexpression in epithelial ovarian cancer: evaluation of its prevalence and prognostic significance. Clinical study. *Oncol.* 2005Jul;68(2-3):154-61.
30. Chen YC, Davidson B, Cheng CC, Maitra A, Giuntoli RL 2nd, Hruban RH et al. Identification and characterization of membralin, a novel tumor-associated gene, in ovarian carcinoma. *Biochim Biophys Acta.* 2005Aug;1730(2):96-102.
31. Mok SC, Chao J, Skates S, Wong K, Yiu GK, Muto MG et al. Prostasin, a potential serum marker for ovarian cancer: Identification through microarray technology. *J Natl Cancer Inst.* 2001Oct;93(19):1458-64.
32. Yu JX, Chao L, Chao J. Prostasin is a novel human serine proteinase from seminal fluid. *J Biol Chem.* 1994Jul;269(29):18843-8.
33. Yu JX, Chao L, Chao J, et al. Molecular cloning, tissue-specific expression, and cellular localization of human prostasin mRNA. *J Biol Chem.* 1995Jun;270(22):13483-9.
34. Yu XJ, Chao L, Ward DC, Chao J. Structure and chromosomal localization of the human prostasin (PRSS8) gene. *Genomics.* 1996Mar;32(3):334-40.
35. Rawlings ND, Barrett AJ. Families of serine peptidases. *Methods Enzymol.* 1994;244,19-61.
36. Wang C, Chao J, Chao L. Adenovirus-mediated human prostasin gene delivery is linked to increased aldosterone production and hypertension in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003Apr;284(4):1031-6.
37. Chen LM, Skinner ML, Kauffman SW, Chao J, Chao L, Thaler CD et al. Prostasin is a glycosylphosphatidylinositol-anchored active serine protease. *J Biol Chem.* 2001Jun;276(24):21434-42.
38. Chen LM, Hodge GB, Guarda LA, Welch JL, Greenberg NM, Chai KX. Down-regulation of prostasin serine protease: a potential invasion suppressor in prostate cancer. *Prostate.* 2001Jul;48(2):93-103.
39. Takahashi S, Suzuki S, Inaguma S, Ikeda Y, Cho YM, Hayashi N et al. Down-regulated expression of prostasin in high-grade or hormone-refractory human prostate cancers. *Prostate.* 2003Feb;54(3):187-93.
40. Chen LM, Chai KX. Prostasin serine protease inhibits breast cancer invasiveness and is transcriptionally regulated by promoter DNA methylation. *Int J cancer.* 2002Jan;97(3):323-9.

41. Livak, KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ . *Methods*. 2001Dec;25(4):402-8.
42. Laribi A, Berteau P, Gala J, Eschwege P, Benoit G, Tombal B et al. Blood-borne RT-PCR assay for prostatic-specific transcripts to identify circulating prostate cells in cancer patients. *Eur Urol*. 2001Jan;39(1):65-71.
43. Singh R, Recinos RF, Agresti M, Schaefer RB, Bosbous M, Gosain AK. Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction: an improvement in detecting mRNA levels in mouse cranial tissue. *Plast Reconstr Surg*. 2006 Jun;117(7):2227-34.
44. Mocellin S, Rossi CR, Pilati P, Nitti D, Marincola FM. Quantitative real-time PCR: a powerful ally in cancer research. *Trends Mol Med*. 2003May;9(5):189-95.