

## ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA GLICOPROTEÍNA uPAR EM MULHERES COM CARCINOMA DUCTAL INVASIVO DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DE PERNAMBUCO

Paula Fernanda de Melo Vasconcelos<sup>1</sup>; Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estudante do Curso de Medicina – CCS- UFPE; E-mail: paulamedfmv@gmail.com, <sup>2</sup>Docente/pesquisador do Depto de Bioquímica- CCB- UFPE. E-mail: ebeltrao@hotmail.com

**Sumário:** O receptor ativador do plasminogênio do tipo uroquinase (uPAR) encontra-se presente em níveis aumentados no soro de pacientes com diversos tipos de cânceres, inclusive câncer de mama, estando associada a uma via de disseminação das células tumorais. Esse trabalho propôs avaliar a expressão da glicoproteína uPAR em pacientes com carcinoma ductal invasivo (CDI) atendidas no Hospital das Clínicas de Pernambuco através da Imunohistoquímica (IHQ) e correlacionar os achados com os dados clinicopatológicos das pacientes. Como metodologia utilizou a conjugação do anti-uPAR com Éster de Acridina, bem como a utilização desse conjugado na IHQ. 47 pacientes diagnosticadas com CDI foram selecionadas para o estudo. A quimioluminescência foi medida no Luminômetro Luminometer Modulus Single Tube 9200-001 (Turner BioSystems, USA) e a intensidade de emissão foi medida em unidade de luz relativa (RLU). A análise dos dados clínicos das pacientes mostrou que a maioria das pacientes estava na faixa etária de 40 a 59 anos, sendo a média de 55 anos (amplitude 31 e 90 anos). 5 das 7 pacientes que tinham entre 20-39 anos possuíam grau histológico mais agressivo e 6 das 7 possuíam invasão linfonodal. Analisando os dados obtidos em relação ao grau histológico, verificou-se que 27 dos 32 casos com grau 3 apresentavam invasão linfonodal. Houve a marcação da glicoproteína de membrana plasmática uPAR nos tecidos de mama contendo Carcinoma Ductal Invasivo e nos tecidos contendo mama normal, porém os valores em RLU das amostras foram semelhantes em ambos os tecidos. Desta forma, a expressão dessa glicoproteína na população estudada não foi alterada durante a transformação maligna. Os resultados, embora preliminares, impulsionam o estudo envolvendo o uso de marcadores luminescentes, sintetizados na USP-SP, conjugados a sondas moleculares de interesse no prognóstico e diagnóstico do câncer de mama em nosso Estado e no Brasil.

**Palavras-chave:** câncer de mama; glicoproteína; uPAR; marcadores luminescentes.

### INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o tipo de câncer que mais acomete as mulheres no mundo, sendo esperados cerca de 1,67 milhões de casos novos para o ano de 2012, e é o maior responsável pelas mortes causadas por câncer nas mulheres, com cerca de 520 mil mortes estimadas para esse período. Nos países desenvolvidos, é a segunda causa de morte por câncer, atrás somente do câncer de pulmão.<sup>1</sup> Em 2014, no Brasil, são esperados 57.120 casos novos de câncer de mama, com um risco estimado de 56,09 casos a cada 100 mil mulheres.<sup>1</sup> Estudos de biomarcadores no câncer vêm sendo desenvolvidos com o intuito de antecipar o diagnóstico e acompanhar a evolução da doença.<sup>2,3</sup> Muitos biomarcadores clínicos e alvos terapêuticos em câncer são glicoproteínas como CA125 em câncer ovariano, HER2/neu em câncer de mama e o antígeno prostático específico (PSA) em câncer de próstata.<sup>3</sup> Mudanças fenotípicas associadas com transformação maligna, como proliferação celular, adesão e migração, geralmente são mediadas ou iniciadas por

proteínas associadas à membrana plasmática.<sup>4</sup> Um regulador importante envolvido no processo de adesão a matriz extracelular (MEC) é o receptor ativador do plasminogênio do tipo uroquinase (uPAR) que regula a atividade do sistema de ativação do plasminogênio, uma cascata proteolítica extracelular, ao se ligar a uma protease ativadora do plasminogênio do tipo uroquinase (uPA). A ativação acelerada de plasminogênio, associada à célula pelo complexo uPA-uPAR, pode facilitar a migração celular através da MEC. Diante disto, grande interesse é dado a expressão deste receptor em doenças humanas, incluindo muitos cânceres.<sup>5</sup> Em um estudo de marcadores tumorais baseado em tecidos mamários de pacientes com carcinoma ductal invasivo (CDI) foi observado uma forte imunorreatividade específica da uPAR em células tumorais quando comparado às células estromais, o que foi significativamente associada com mau prognóstico e com um fenótipo tumoral mais agressivo.<sup>6</sup> Biomarcadores muitas vezes são conjugados a marcadores luminescentes, ferramentas comuns usadas em ensaios biológicos tanto em sistemas *in vivo* como *in vitro*, tendo grande aplicabilidade em imunologia para o diagnóstico clínico.<sup>7</sup> O Éster de Acridina, por exemplo, tem sido estudado por quatro décadas e é considerado um efetivo marcador na sinalização de biomoléculas. Ele é muito utilizado em imunoenaios quimioluminescentes como uma alternativa para o luminol ou isoluminol e até mesmo para os imunoenaios enzimáticos com peroxidase de raiz-forte por causa da sua boa meia-vida e por sua fácil quantificação.<sup>8</sup> Os ésteres de acridina marcados podem ser usados para um número de propósitos diferentes. Eles podem ser adicionados a soluções de materiais não marcados como uma alternativa para a utilização de traçadores moleculares. Eles podem ser usados como antígenos marcados para imunoenaios competitivos, e como sinalizadores de anticorpos para ensaios imunométricos.<sup>9</sup> A utilização de marcadores luminescentes conjugados a biomoléculas é de grande utilidade para auxiliar no diagnóstico de diversas doenças, inclusive câncer, tornando a marcação mais eficiente, objetiva e específica. Por fim, neste estudo objetivou avaliar a expressão da glicoproteína uPAR em pacientes com CDI utilizando anticorpos conjugados a marcadores luminescentes e correlacionar os achados com as características clínicas das pacientes e dos tumores.

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Seleção das Amostras:** Estudo retrospectivo composto por mulheres com diagnóstico prévio de câncer de mama que se consultaram no ambulatório de mastologia do Hospital das Clínicas de Pernambuco no período de 2009 a 2013. Coletou-se 47 blocos de tecido parafinado contendo CDI no Setor de Anatomia Patológica do Hospital citado. As biópsias foram utilizadas após aprovação do Comitê de Bioética do Centro de Ciências da Saúde da UFPE (CAE 06586612.9.0000.5208). Os dados clínicos das pacientes foram coletados junto ao Serviço de Atendimento Médico e Estatística (SAME), no mesmo hospital. Foram avaliados parâmetros como idade da paciente, tamanho do tumor, grau histológico e invasão linfonodal. **Imunohistoquímica para uPAR:** Desparafinizou-se as lâminas com cortes histológicos de 4µm de biópsias de CDI em xilol por 1h30 e em seguida foi feita hidratação das mesmas em álcool (3x 100% e 1x 70%). Em seguida, foi realizada uma lavagem com PBS de 5 minutos e incubação com o conjugado por 2 horas a 4°C e após esse período foi feita a lavagem das lâminas por 3x com PBS com cada lavagem durando 05 minutos. Foi demarcada uma área tumoral de 1,0 cm x 1,0 cm para ser removida da lâmina, a qual foi identificada com base em lâmina corada com hematoxilina-eosina, sendo transferida para tubo de polipropileno contendo 50 µL de PBS. A quimioluminescência foi medida no Luminômetro Luminometer Modulus Single Tube 9200-001 (Turner BioSystems, USA) e a intensidade de emissão foi medida em unidade de luz relativa (RLU).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisados os dados clínicos de um grupo amostral composto por 47 pacientes diagnosticadas com CDI que tiveram suas amostras de tecidos selecionadas para o trabalho. As variáveis clínico-patológicas estudadas foram obtidas pela revisão dos prontuários das pacientes no Serviço de Atendimento Médico e Estatística (SAME) do HC da UFPE. As informações sobre a idade foram agrupadas em três faixas (de 20 a 39 anos, de 40 a 59 anos e maiores de 60 anos). Verificou-se que a maior parte das pacientes se encontrava na faixa etária de 40 a 59 anos (23/47), seguida de mulheres com mais de 60 anos de idade (17/47), sendo a minoria de mulheres jovens de 20 a 39 anos (7/47). A média de idade foi de 55 anos e amplitude de 31 e 90 anos. No presente estudo a análise das idades demonstrou que em relação ao prognóstico reservado é comum para mulheres jovens, uma vez que 5 das 7 pacientes que tinham entre 20-39 anos possuíam grau histológico mais agressivo e 6 das 7 possuíam invasão linfonodal. Em relação às pacientes com mais de 60 anos, 15 do total de 17 analisadas, possuíam invasão linfonodal. Em relação ao grau histológico, observou-se que de 47 amostras, 32 foram diagnosticadas com grau III, 13 com grau II e 1 apresentou grau I. O grau histológico reflete o potencial de malignidade do tumor indicando a sua maior ou menor capacidade de metastatização. Analisando os dados obtidos em relação ao grau histológico, verificou-se que 27 dos 32 casos com grau III apresentavam invasão linfonodal, corroborando o potencial de malignidade do tumor e sua capacidade de invasão linfonodal e metástases. O tamanho do tumor foi agrupado em três faixas: menor a 2 cm, 2 cm a 5 cm e maior que 5 cm. Ao analisar os dados, encontrou-se que a maioria dos tumores se encontravam na faixa de 2 cm a 5cm. O tamanho do tumor e o comprometimento dos linfonodos axilares são os dois mais importantes indicadores prognósticos para câncer de mama, tanto que se constituem na base do estadiamento TNM estabelecido e promulgado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC). O tamanho do tumor está diretamente relacionado ao risco de recidiva, sendo que, nos casos de pacientes com ausência de comprometimento metastático dos linfonodos, o tamanho do tumor torna-se o melhor preditor desta recidiva.<sup>10</sup> A maioria dos tumores apresentaram invasão linfonodal (17/47), com tamanho entre 2 cm a 5 cm. A glicoproteína de membrana plasmática uPAR tem peso molecular de 60.000 Daltons. Dos ensaios de conjugação do anticorpo uPAR ao Éster de acridina foi selecionada a fração  $\beta$  na concentração de 1:20 (volume final de 100 microlitros do conjugado de uPAR-Éster de Acridina da fração  $\beta$  = volume da fração de 5  $\mu$ L + volume de PBS de 95  $\mu$ L), a qual foi a de melhor resultado e então adotada. Os resultados obtidos evidenciaram que houve a marcação da glicoproteína de membrana plasmática uPAR nos tecidos de mama contendo Carcinoma Ductal Invasivo, porém os valores em RLU das amostras contendo tecido de mama normal foram semelhantes aos obtidos com tecidos contendo Carcinoma Ductal Invasivos. Desta forma, a expressão dessa glicoproteína na população estudada não foi alterada durante a transformação maligna. Portanto se faz necessária a reavaliação do processo de conjugação.

## CONCLUSÕES

O estudo verificou que a expressão da glicoproteína uPAR na população estudada através da Imunohistoquímica utilizando como revelador o éster de acridina mantém-se sem alteração quando comparados tecidos de CDI e mama normal.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos órgãos de fomento FACEPE, CAPES e CNPq.

## REFERÊNCIAS

- 1 INCA. Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil, *Instituto Nacional do Câncer*, Rio de Janeiro, 2014.
- 2 Levenson, V. V. 2007. Biomarkers for early detection of breast cancer: what, when and where? *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1770, p. 847-856..
- 3 Misek, D.E.; Kim, E.H. 2011. Protein Biomarkers for early detection of breast cancer. *International Journal of Proteomics*, v. 2011, Article ID 343582, 9 pages. doi:10.1155/2011/343582
- 4 Leth-Larsen, R.; Lund, R. R.; Ditzel, H. J. 2010. Plasma membrane proteomics and its application in clinical cancer biomarker discovery. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 9, p. 1369-1382.
- 5 Smith, H. W.; Marshall, C. J. 2010. Regulation of cell signaling by uPAR. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 11, p. 23-36.
- 6 Kotzsch, M.; Bernt, K.; Friedrich, K.; Luther, E.; Albrecht, S.; Gatzweiler, A.; Magdolen, V.; Baretton, G.; Zietz, C. & Luther, T. 2010. *Histopathology*. 57, 461–471
- 7 Santos BS, Farias PMA, Menezes FD, Ferreira RC, Júnior AS, Figueiredo RCBQ, et al. 2006. CdS-Cd(OH)<sub>2</sub> core shell quantum dots functionalized with concanavalin A lectin for recognition of mammary tumor. *Phys. Status Solidi*, (c). 3(11): 4017-4022.
- 11 M.J.B. de Melo Rêgo et al. / Immunohistochemiluminescence detection: A quantitative tool in breast cancer HER-2 status evaluation. ISSN 0278-0240/13/\$27.50 \_c 2013 – IOS Press and the authors. All rights reserved.
- 9 Chemiluminescent Labeling kit. Catalog No. ADI-907-00. Enzo life sciences, 2010.
- 10 Abreu E. E Koifman S. 2002. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 48(1): 113-31.