



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

MOLÉCULAS RECOMBINANTES MIMÉTICAS DO CA125 E DE SEU AUTO-ANTICORPO ANTIIDIOTIPO E IMPLICAÇÕES NA RESPOSTA IMUNE DO CÂNCER DE OVÁRIO

ANA CAROLINA SILVA SIQUIEROLI

ORIENTADOR: Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

CO-ORIENTADORA: Dra. Etel Rodrigues Pereira Gimba

UBERLÂNDIA – MG

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

MOLÉCULAS RECOMBINANTES MIMÉTICAS DO CA125 E DE SEU AUTO-ANTICORPO ANTIIDIOTIPO E IMPLICAÇÕES NA RESPOSTA IMUNE DO CÂNCER DE OVÁRIO

ANA CAROLINA SILVA SIQUIEROLI

ORIENTADOR: Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

CO-ORIENTADORA: Dra. Etel Rodrigues Pereira Gimba

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutora em Genética e Bioquímica (Área Genética).

UBERLÂNDIA – MG

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S618m Siquieroli, Ana Carolina Silva, 1982-
2011 Moléculas recombinantes miméticas do CA125 e de seu auto-
anticorpo antiidiotipo e implicações na resposta imune do câncer
de ovário / Ana Carolina Silva Siquieroli. – 2011.
111 f. : il.

Orientador: Luiz Ricardo Goulart Filho.

Co-orientadora: Etel Rodrigues Pereira Gimba.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Genética - Teses. 2. Ovários - Câncer - Teses. 3. Peptídeos - Teses. I. Goulart Filho, Luiz Ricardo, 1962- . II. Gimba, Etel Rodrigues Pereira. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

MOLÉCULAS RECOMBINANTES MIMÉTICAS DO CA125 E DE SEU AUTO-ANTICORPO ANTIIDOTIPO E IMPLICAÇÕES NA RESPOSTA IMUNE DO CÂNCER DE OVÁRIO

ANA CAROLINA SILVA SIQUIEROLI

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho (orientador)

Examinadores: Etel Rodrigues Pereira Gimba – INCA-RJ (co-orientadora)

Leticia Batista Azevedo Rangel – UFES-ES

Ana Graci Brito Madurro – INGEB-UFU

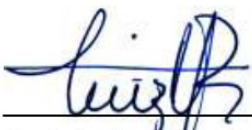
Jair Pereira da Cunha Junior – ICBIM-UFU

Marcelo José Barbosa Silva – ICBIM-UFU

Adriano Mota Loyola – FOUFU (suplente)

Data da defesa: 19/07/2011

As sugestões da Comissão Examinadora e as normas PGGB para o formato da Tese foram contempladas.


Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

São chamados de sábios os que põem as coisas em sua devida ordem.

Tomás de Aquino

Dedico esta tese de doutorado às pessoas que mais amo e que também dedicaram muitos esforços para a conclusão deste trabalho: meu marido e meus filhos, que mesmo ainda tão pequenos foram meus maiores incentivadores!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me possibilitou a oportunidade e a concretização desta etapa tão importante! Muitas coisas aconteceram em minha vida nestes últimos anos. Algumas delas foram dolorosas e outras de extrema felicidade, mas Deus me ensinou que devemos saber olhar para ambas as experiências e aprender com elas. E foi realmente o que Deus me possibilitou! Hoje, olho para trás e vejo o quanto cresci. Cresci na fé e na esperança e hoje quero muito agradecer a ele a finalização de mais esta etapa de minha vida e por tudo o que ele me presenteou e continua me presenteando nestes anos. Obrigada meu Deus!

Mas aqueles que me conhecem sabem que minha força só existe por que tenho um pequeno professor me guiando todos os dias que acordo. Ele é o meu maior exemplo de vida e a quem agradeço por tudo o que sou hoje. Este é meu pequeno filho Pedro Augusto a quem agradeço pelos choros, sorrisos, gargalhadas e principalmente pela vida. Espero que um dia se orgulhe de sua mãe! A mamãe te ama muito e sem você, sem o seu sorriso, sem os seus beijos não teria conseguido! Filho, este sonho é nosso! E agora vamos dividí-lo com nosso pequeno João Lucas que trará ainda mais felicidades para nossas vidas!!!! A mamãe ama muito vocês!

Agradeço muito ao meu porto seguro e grande amado marido Marcos Paulo, que me apoiou, me auxiliou e principalmente, entendeu minha ausência em muitos momentos de nossas vidas. Obrigada por estar sempre ao meu lado, pelas noites em claro e pelos esforços destinados ao nosso filho, sendo pai e mãe nos momentos que infelizmente não pude estar ao lado de vocês. Te amo muito! Em todos estes anos de amor, soube dos meus objetivos e me ajudou a trilhar cada um deles. Quero agora dividir com você as alegrias deste sonho! Para sempre te amarei!

Aos meus pais, ao meu irmão e a minha avó, que fizeram de tudo para garantir minha felicidade e minha formação. Muito obrigada por me apoiarem em mais esta etapa da minha vida. Mãe, só nós duas sabemos o quanto aprendemos com esta tese e tenho toda fé que passaremos por mais este obstáculo juntas. Te amo muito! Pai, meu poço de sabedoria e calma, te amo! Vó, nem sei como lhe agradecer por ajudar a cuidar do nosso bem mais precioso, te amo! Maninho, saudades de você. Te amo!

Aos grandes e sinceros amigos que me ajudaram na realização deste trabalho. Em especial aqueles do Laboratório de Nanobiotecnologia. Nestes anos que passamos dividimos as felicidades, as frustrações e as esperanças. Muito aprendi com vocês! Mas em especial gostaria muito de agradecer a todos aqueles que para mim são pessoas muito especiais: Juliana, Angela, Fausto, Patrícia Tieme, Carolina Reis, Thaise, Karina, Paula Souza, Paula Cristina, Rafael, Emília, Robson, Dão, Janaina, Érica, Galber, Tamires, Patrícia Terra, Fabiana, Vivian, Vanessa, Rone, Luciana, Carlos, Tatiana, Renata, Siomar, Washington, Lara, Ana Luiza e Zu.

Dentre estes grandes amigos, alguns merecem meu especial agradecimento.

Vou começar com você Ju, que sempre esteve presente ao meu lado e que influenciou muito no meu crescimento. Obrigada pela companhia, pelos ensinamentos e principalmente pela amizade. Com certeza levarei comigo um pouquinho dessa Juliana, uma das mulheres mais guerreiras que conheci. Muito sucesso para você amiga!

Yara e Mariana, obrigada pelo carinho! Saiba que aprendi muito com esta mamãe guerreira. Com certeza, para mim você é um exemplo de virtude, educação, sinceridade, organização e amizade. Sucesso para você e para a nossa amada Mariana.

Robson, nem sei quais palavras usar para lhe agradecer. Mesmo no dia mais difícil de sua vida ainda teve forças para me ajudar. Essa é mais uma demonstração da pessoa maravilhosa que é. Obrigada pelos ensinamentos, pelas oportunidades e por ter você como um grande amigo. Um grande beijo para você e nosso anjo João Pedro!

Angela, amiga de todas as horas. Obrigada por tudo que me ensinou. Saiba que senti muita falta da sua companhia durante estes meses. Mas com certeza, como você mesma diz, são fases de nossas vidas e que com certeza aprendemos muito com elas. Sucesso para você!

Patrícia Tieme. Uma super companheira de laboratório e de vida. Foi muito bom estar ao seu lado todos estes anos. Obrigada por tudo! Espero que você consiga colher todos os frutos do seu trabalho e dos seus esforços. Você merece muito!

Fausto. O amigão!!! Também senti muita falta da sua companhia nestes meses. Mas com certeza foi uma grande oportunidade para aprendermos que grandes amizades não diminuem com a distância. Abraços!!!

Carolina Reis, minha chará. Vou sentir muita falta das nossas brincadeiras e da sua companhia. Obrigada pela verdadeira amizade. Te adoro!

Thaise, não poderia deixar de agradecer pelos ensinamentos de biblioteca de anticorpos. Obrigada pela companhia e amizade de todos estes anos. E como não poderia deixar de lhe agradecer pela biblioteca de Fab. Obrigada mesmo!

Karina saiba que foi muito bom lhe conhecer melhor neste último ano. Você é uma pessoa às vezes brava, mas com um coração de ouro. Obrigada pela companhia!

Paula Souza, a amiga! Obrigada por tudo. Desejo-lhe muito sucesso nesta reta final. Te adoro!

Paula Cristina, mesmo distante não teria como não falar de você. Obrigada pela amizade e pelos momentos que passamos juntas. Muito sucesso para você!

Rafael, você é outro que mesmo distante ainda está presente em meu coração. Beijos!

Emília, palavras realmente serão poucas para lhe agradecer por toda ajuda nesta reta final de conclusão de tese. Mais uma vez muito obrigada pela disponibilidade em me ajudar. Carinha de anjo e coração de mulher. Sucesso! Saiba que ser sua mãe adotiva foi um orgulho!

Galber, obrigada pela amizade. Poço de sinceridade. Você é um dos poucos que consegue nos fazer rir sendo sincero! Um grande abraço.

Tamires, Obrigada pela companhia e disponibilidade! Sucesso para você!

Fabiana te desejo muito sucesso nesta reta final de tese. Com certeza no final tudo dará certo! Um grande beijo.

Janaina e Érica, sempre com um sorriso no rosto e presentes ao nosso lado. Obrigada!

Luciana, um grande amiga que sempre se prontificou em ajudar! Responsável por organizar nosso laboratório, fazer compras, relatórios.....uma tonelada de trabalho!!!! Obrigada Lu!!!!!!

Carlos, não teria como não falar de você. Para mim, além de um grande amigo, você foi um exemplo a ser seguido. Obrigada pelos ensinamentos e pela amizade. Deus coloca ao nosso lado pessoas para nos guiar e ensinar, e uma delas com certeza foi você. Obrigada por tudo!

Aos amigos Flávia, Arianan, Luciana e Rafael. Estas são amizades que ficarão para sempre em meu coração, e com vocês quero compartilhar esta conquista! Um grande abraço!

Àqueles que considero como minha segunda família: meus sogros e minhas cunhadas. Obrigada pelo incentivo e pelo carinho!

Aos professores do Instituto de Genética e Bioquímica com os quais muito aprendi e que fizeram parte de minha formação em todos estes anos.

Aos funcionários do Instituto de Genética e Bioquímica, Madson e Jusciane, que sempre estavam dispostos a nos atender e auxiliar.

Ao Gerson, secretário da Pós-Graduação em Genética e Bioquímica que durante todos estes anos trabalhou para o crescimento da nossa Pós-graduação e pelo auxílio nos preparativos da defesa.

A Capes pela concessão da bolsa de estudo.

Aos membros da banca de defesa, que aceitaram participar e estão enriquecendo este trabalho. Obrigada por receberem com tanto carinho nosso convite!

A minha co-orientadora Etel, por acreditar no meu trabalho e depositar em minha sua confiança. Realmente obrigada pela disponibilidade em sempre me atender, e pelos esforços a mim dedicados.

Finalmente ao meu orientador Luiz Ricardo por tudo o que fez por mim em todos estes anos de convivência. Luiz, obrigada por aceitar ser meu orientador, pela confiança em mim depositada e pela segurança no meu trabalho. Saiba que esta tese de Doutorado está hoje sendo concluída graças a todos os seus esforços em ajudar os seus alunos e em disponibilizar todas as ferramentas necessárias para a conclusão de nossas pesquisas. Obrigada pela dedicação e conhecimentos a mim oferecidos. Hoje vejo que muito amadureci profissionalmente e que devo isto às oportunidades que você me ofereceu! Mais uma vez muito obrigada!

E de uma forma muito especial gostaria de agradecer as mulheres que doaram o material biológico utilizado neste estudo. Mesmo com todo sofrimento e angústia, ainda se dispuseram a colaborar com a pesquisa, na certeza de que algum dia este ato traga ainda mais esperanças para outras mulheres!!!! Que Deus abençoe a todas vocês!

A todos aqueles que direta ou indiretamente estiveram ao meu lado, me ajudando a alcançar mais este objetivo. Meu muito obrigada!

ÍNDICE

	Página
Lista de Abreviaturas.....	xi
Lista de Abreviaturas para Aminoácidos.....	xiii
Lista de Tabelas.....	xiv
Lista de Figuras.....	xv
Apresentação.....	01
Capítulo 1: Fundamentação Teórica	04
1. Ovários: aspectos anatômicos e histológicos.....	05
2. Câncer de Ovário.....	06
2.1 Epidemiologia.....	08
2.2 Fatores de Risco.....	10
2.3 Prevenção e Rastreamento.....	12
2.4 Diagnóstico e Marcadores Moleculares.....	13
2.4.1 CA125/MUC16.....	16
2.5 Imunoterapia para o Câncer de Ovário.....	18
3. <i>Phage Display</i>	22
Referências Bibliográficas.....	28
Capítulo 2: Moléculas Recombinantes Miméticas do CA125 e de seu Auto- anticorpo Antiidiotipo e Implicações na Resposta Imune do Câncer de Ovário.....	40
Resumo.....	41
Abstract.....	42
1. Introdução.....	43
2. Objetivos.....	45
3. Material e Métodos.....	46
3.1. Amostras e Pacientes.....	46
3.2. Extração de Proteínas Totais.....	48
3.3. Purificação de IgGs com Microesferas Magnéticas.....	49
3.3.1 Purificação de IgGs de amostras sorológicas.....	49
3.3.2 Purificação de IgGs de amostras teciduais.....	50
3.4. Seleção dos Peptídeos Recombinantes Miméticos por <i>Phage Display</i>	50
3.4.1 <i>Biopanning</i> (seleção dos fagos).....	50
3.4.2 Amplificação e titulação dos fagos selecionados.....	53
3.4.3 Extração de DNA dos fagos e sequenciamento.....	54
3.4.4 Análises de Bioinformática.....	55
3.4.5 Pré-Screening <i>Phage</i> -ELISA.....	57

3.5.	Validação Diagnóstica dos Fagos Seleccionados por <i>Phage</i> -ELISA..	58
3.6.	Caracterização dos Peptídeos Sintéticos.....	59
3.6.1	Peptídeos sintéticos.....	59
3.6.2	Ensaio Imunoenzimático para detecção de IgGs.....	59
3.6.3	Ensaio <i>in vitro</i> com a linhagem tumoral de ovário OVCAR-3	60
3.6.4	Ensaio <i>in vitro</i> com a linhagem celular de macrófagos.....	61
3.7.	Seleção de Anticorpos Fab Expressos na Superfície de Fagos.....	63
3.7.1	Biblioteca de anticorpos Fab.....	63
3.7.2	Seleção de anticorpos recombinantes Fab por <i>Phage Display</i> .	63
3.8.	Análises dos Fabs seleccionados.....	64
3.8.1	Produção de Fab na forma solúvel em placa <i>deep well</i>	64
3.8.2	Análise dos fragmentos de anticorpos seleccionados por meio de ensaios de ELISA.....	65
3.9.	Análises Estatísticas.....	66
4.	Resultados.....	67
4.1	Seleção dos peptídeos recombinantes miméticos a antígenos tumorais de câncer de ovário.....	67
4.2	Peptídeos recombinantes miméticos ao CA125.....	71
4.3	Antiidiotipo do CA125.....	73
4.4	Ensaio <i>in vitro</i> com o Antiidiotipo do CA125.....	77
4.5	Seleção de anticorpos Fab.....	81
4.5.1	Anticorpos Fab específicos ao antiidiotipo do CA125.....	81
4.5.2	Anticorpos Fab específicos a antígenos tumorais de câncer de ovário.....	82
4.6	Peptídeos recombinantes miméticos no diagnóstico do câncer de ovário.....	84
5.	Discussão.....	91
6.	Conclusões.....	101
	Referências Bibliográficas.....	102

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
mL	Mililitro
μL	Microlitros
M	Molar
mM	Milimolar
ng	Nanogramas
μg	Microgramas
G	Grama
H	Hora
min	Minuto
seg	Segundos
rpm	Rotações por minuto
pH	Potencial Hidrogeniônico
μm	Micrômetro
nm	Nanômetros
DNA	Ácido desoxirribonucléico
V	Volts
DO	Densidade ótica
O/N	Durante a noite (<i>overnight</i>)
IPTG	Isopropil α-D-tiogalactosise
PBS	Tampão Salina Fosfato
PBST	Tampão Tris Base-Salino com Tween-20
TBS	Tampão Tris Base-Salino
TBST	TBS com Tween 20
PEG	Polietileno glycol
Ph.D	Bibliotecas de <i>Phage Display</i> New England Biolabs
Ph.D- 12mer	Biblioteca contendo 12 peptídeos randômicos
pIII	Proteína III capsídica de bacteriófagos filamentosos
pVI	Proteína VII capsídica de bacteriófagos filamentosos
pVII	Proteína VII capsídica de bacteriófagos filamentosos
pVIII	Proteína VIII capsídica de bacteriófagos filamentosos
pIX	Proteína IX capsídica de bacteriófagos filamentosos
LB	Meio de cultura Luria-Bertania
Pfu	Unidades formadoras de colônias
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3-indolil- α-D-galactosideo

EDTA	Etileno diamino tetra acetato
OPD	1,2 ortofenilenodiamino
DAB	3,3'- diaminobenzidina
BSA	Soro albumina bovina
Tris-HCl	Tris Hidrocloreto
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaN ₃	Azida sódica
NaCl	Cloreto de sódio
NaI	Iodeto de sódio
scFv	Fragmento variável de cadeia única
Fab	Fragmento ligante de antígeno

LISTA DE ABREVIATURAS PARA AMINOÁCIDOS

Alanina	A
Arginina	R
Asparagina	N
Ácido aspártico	D
Cisteína	C
Ácido glutâmico	E
Glutamina	Q
Glicina	G
Histidina	H
Isoleucina	I
Leucina	L
Lisina	K
Metionina	M
Fenilalanina	F
Prolina	P
Serina	S
Treonina	T
Triptofano	W
Tirosina	Y
Valina	V

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1		Página
Tabela 1:	Classificação do câncer de ovário. Fonte: TNM: classificação de tumores malignos, 2004.	08
Tabela 2:	Associação dos fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de ovário epitelial. Fonte: Chu e Rubin, 2006.	10
CAPÍTULO 2		Página
Tabela 1:	Características das amostras utilizadas nos experimentos. Classificação das amostras em malignas, borderline (com baixo potencial maligno) e casos benignos.	47
Tabela 2:	Diagnóstico histológico das massas pélvicas.	48
Tabela 3:	Sequência de aminoácidos dos peptídeos obtidos por <i>Phage Display</i> e suas respectivas frequências no <i>biopanning</i> .	67
Tabela 4:	Proteínas identificadas na seleção de peptídeos miméticos sorológicos à proteínas tumorais de câncer de ovário por <i>Phage Display</i> .	68
Tabela 5:	Proteínas identificadas na seleção de peptídeos miméticos teciduais à proteínas tumorais de câncer de ovário por <i>Phage Display</i> .	69
Tabela 6:	Alelos do complexo MHCII ligantes ao peptídeo sintético Synt1.	75
Tabela 7:	Correlação entre as absorbâncias dos marcadores identificados por fagos Seq.ID N° 3, Seq.ID N° 1 e pelo peptídeo sintético Synt1, e o perfil clínico e histopatológico do câncer de ovário.	87
Tabela 8:	Dosagem sérica dos marcadores tumorais CA125 e CEA em pacientes com tumor maligno de ovário, tumor borderline e tumor benigno de ovário.	88
Tabela 9:	Sensibilidade, especificidade e acurácia dos testes de diagnósticos para CA125, fago Seq.ID N° 3, Seq.ID N° 1, peptídeo sintético Synt1, CEA e os marcadores combinados.	90

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1		Página
Figura 1:	Visão anatômica dos ovários (disponível em www.bastet.atorra.com).	05
Figura 2:	Fotomicrografia de ovário mostrando o epitélio de revestimento, a túnica albugínea e os folículos em crescimento localizados no córtex ovariano. (disponível em www.unifesp.br).	06
Figura 3:	Estimativas para novos casos de câncer e mortes, por sexo, nos dez principais tipos de câncer nos Estados Unidos, 2009. Fonte: Jemal <i>et al.</i> , 2009.	09
Figura 4:	Esquema demonstrando a produção de anticorpos anti-antiidiotipos (Ab3) específicos ao CA125, baseado na hipótese de Nils Jerne (JERNE, 1974). (1) As regiões variáveis de ligação a antígenos de anticorpos (Ab1) contêm determinantes (Id) que são imunogênicos (2) e induzem à formação de Ab2 (3). Um subconjunto destes anticorpos é funcionalmente capaz de imitar a estrutura tridimensional do antígeno original (4). Assim, a vacinação seletiva com Ab2 poderia induzir uma resposta imune específica contra o antígeno tumoral CA125 com a produção de anticorpos anti-antiidiotipos (Ab3) específicos ao CA125 (5).	21
Figura 5:	Esquema de um fago filamentosos. A) Composição do gene III, mostrando o sítio de clonagem para introdução do gene adicional; B) Partícula viral com as proteínas pIII, pVI, pVII, pVIII e PIX; C) Cristalografia dos domínio D1 e D2 da proteína III, as alfa-hélices estão coloridas em vermelho e as fitas β , em azul cianico.	23
Figura 6:	<i>Biopanning</i> - a biblioteca de fagos (1) é sujeita a diversos ciclos de seleção por afinidade incluindo a captura dos fagos com antígenos (2), lavagem para remover os fagos não ligantes (3), eluição para recuperar os fagos ligados ao alvo (4) e amplificação em <i>E. coli</i> (5). Quando o enriquecimento adequado é alcançado, os clones são isolados e caracterizados (6).	24
CAPÍTULO 2		Página
Figura 1:	Esquema representativo da seleção de peptídeos miméticos a antígenos tumorais de carcinoma ovariano. A: Seleção de peptídeos ligantes a IgGs sorológicas de pacientes com tumores malignos de ovário. As bibliotecas de peptídeos randômicos fusionados em fagos <i>Ph.D.-7</i> e <i>Ph.D.-12</i> foram expostas às moléculas alvo – IgGs purificadas de soro de pacientes com tumores malignos de ovário. B: Seleção de peptídeos ligantes a IgGs de proteínas tumorais de pacientes com câncer de ovário. As bibliotecas de peptídeos randômicos fusionados em fagos <i>Ph.D.-7</i> e <i>Ph.D.-12</i> foram expostas às moléculas alvo – IgGs purificadas de proteínas tumorais malignas de ovário.	51
Figura 2:	Esquema representativo da seleção de peptídeos miméticos a antígenos tumorais de câncer de ovário. Biblioteca de peptídeos em fagos filamentosos: <i>Ph-12</i> e <i>Ph-7</i> foram expostas às moléculas alvo. Os fagos ligantes foram	52

	eluídos negativamente com IgGs de soros de pacientes com tumores benignos e pacientes controle. Os fagos remanescentes e de interesse neste estudo foram eluídos e recuperados na eluição positiva por afinidade a proteínas totais de tumores malignos de ovário.	
Figura 3:	Gráfico representativo da razão do Índice ELISA (IE) entre tumores malignos/benignos e entre tumores/controles, indicando a reatividade dos clones de fagos, detectada pelo anticorpo anti-M13, contra IgGs de amostras sorológicas de pacientes com tumores malignos de ovário, com tumores benignos e de mulheres clinicamente saudáveis. Para comparar os diferentes experimentos, o IE ($IE = OD / \text{cut-off}$) foi calculado. As amostras mostrando razão do $IE > 1$ para ambas as amostras foram consideradas positivas.	70
Figura 4:	Alinhamento dos peptídeos obtidos nos dois processos de seleção por Phage Display com a proteína CA125 pelo programa MATCH (https://www.relic.bio.anl.gov/match.aspx). Os peptídeos identificados na figura alinharam com a sequência proteica do antígeno tumoral de carcinoma ovariano entre os aminoácidos 11852 e 11895 denominada Seq. ID N° 85. Os aminoácidos em destaque demonstram o alinhamento.	71
Figura 5:	Mapeamento putativo da região mimética da proteína homóloga à MUC16/CA125, utilizando-se 10 peptídeos obtidos no processo de seleção em estrutura proteica catalogada no Protein Data Bank. (A) Cluster formado com 4 peptídeos (Seq.ID N° 47, Seq.ID N° 1, Seq.ID N° 8 e Seq.ID N° 21). (B) Detalhes do alinhamento do clone Seq.ID N° 1 com a proteína homóloga à MUC16.	72
Figura 6:	Alinhamento do peptídeo Seq.ID N°1 mimético à proteína CA125 com anticorpo monoclonal murino ACA125 obtido pelo programa CLUSTALW2 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html). Os aminoácidos em destaque demonstram o alinhamento: (*) aminoácidos idênticos, (:) e (.) aminoácidos semelhantes.	73
Figura 7:	Alinhamento do peptídeo Seq.ID N°1 com a proteína CA125 e com o anticorpo monoclonal murino ACA125 obtido pelo programa CLUSTALW2 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html). Os aminoácidos em destaque demonstram o alinhamento: (*) aminoácidos idênticos, (:) e (.) aminoácidos semelhantes.	73
Figura 8:	Alinhamento dos clones obtidos nos biopannings e prováveis motivos proteicos para os peptídeos miméticos do CA125 e do ACA125. As sequências dos peptídeos foram repetidas entre uma a três vezes conforme alinhamento parcial com a sequência do CA125 e do ACA125, com pelo menos 3 resíduos homólogos entre os peptídeos e as sequências originais. Em preto estão marcados os prováveis epítomos das sequências do CA125 e ACA125.	75
Figura 9:	Efeito do peptídeo Synt1 na proliferação de células OVCAR-3 pelo ensaio de MTT in vitro. Células da linhagem de carcinoma ovariano OVCAR-3 foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) em placas de 96 poços (2×10^5 células/poço). As concentrações do	77

peptídeo sintético Synt1 testadas foram de 50µM; 37µM; 25µM; 18,5µM; 12,5µM; 9,25µM; 6,25µM; 4,63µM e 3,12µM. 100% de viabilidade correspondem à proliferação celular determinada para as células cultivadas em meio de cultura sem peptídeo.

- Figura 10:** Efeito dos peptídeo Synt1 e Synt2 na proliferação da linhagem celular de macrófagos murinos J774A.1, pelo ensaio de MTT in vitro. A linhagem de macrófagos foi cultivada em meio RPMI 1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) em placas de 96 poços (1x10⁵ células/poço). As quantidades dos peptídeos Synt1 e Synt2 testadas foram de 50µM; 25µM; 12,5µM; 6,25µM e 3,12µM. 100% de proliferação correspondem à proliferação celular determinada para as células cultivadas em meio de cultura sem peptídeo. A cultura celular de macrófagos também foi tratada com extrato protéico da linhagem tumoral de ovário OVCAR-3, nas quantidades de 68µg, 34µg, 17µg 8,5µg e 4,25µg, correspondentes às concentrações em µM utilizadas para os peptídeos sintéticos. **78**
- Figura 11:** Produção de óxido nítrico (NO) estimado como nitrito, por células de macrófagos J774A.1 tratadas com os peptídeos Synt1 e Synt2 nas quantidades de 50µM; 25µM; 12,5µM; 6,25µM e 3,12µM. Como controle negativo foi utilizado o diluente dos peptídeos (PBS) para tratamento dos macrófagos. A cultura celular de macrófagos também foi tratada com extrato protéico da linhagem tumoral de ovário OVCAR-3, nas quantidades de 68µg, 34µg, 17µg 8,5µg e 4,25µg, correspondentes às quantidades em µM utilizadas para os peptídeos sintéticos. Os testes foram realizados em triplicata e analisados pelo teste de variância (one-way-ANOVA), seguido pelo teste de Bonferroni: * p < 0,05; ** p < 0,001; **79**
- Figura 12:** Reatividade dos clones selecionados pelo biopanning, expressando anticorpos recombinantes Fab na forma solúvel e ligantes específicos ao peptídeo Synt1. A reatividade dos clones foi detectada nos ensaios de ELISA pela ligação ao anticorpo anti-HA que evidencia a presença da região VH do anticorpo recombinante Fab. Como controle negativo, utilizou-se um clone produzindo Fab específico à proteína total de *Leishmania amazonensis*. **81**
- Figura 13:** Ensaio de ELISA representando a razão da absorbância dos clones selecionados pelo biopanning, expressando anticorpos recombinantes Fab na forma solúvel, entre proteínas tumorais de ovário e proteínas de tumores benignos (maligno/benigno), e entre proteínas tumorais malignas e entre proteínas não tumorais (maligno/controle). Os resultados aqui demonstrados indicam a reatividade dos clones de Fab selecionados, ligantes específicos a proteínas tumorais malignas de ovário. A reatividade dos clones foi detectada pela ligação ao anticorpo anti-HA que evidencia a presença da região VH do anticorpo recombinante Fab. As amostras que apresentaram razão das absorbâncias maiores que 3 foram consideradas positivas. **82**
- Figura 14:** Reatividade dos clones selecionados pelo biopanning, expressando anticorpos Fab ligantes a antígenos tumorais de ovário, ao peptídeo Synt1. A reatividade dos clones foi detectada nos ensaios de ELISA pela ligação ao anticorpo anti- **83**

HÁ, que evidencia a presença da região VH do anticorpo recombinante Fab. Como controle negativo da reação utilizou-se um clone produzindo Fab específico à proteína total de *Leishmania amazonensis*.

- Figura 15:** Absorbância relativa dos fagos selecionados ligantes a IgGs sorológicas de pacientes com câncer de ovário. (A e C) O diagrama representativo mostra um aumento estatisticamente significativo dos fagos na detecção de IgGs em soro de pacientes com tumor maligno (24 casos malignos e 10 bordelines) em relação a pacientes com tumores benignos (24 casos benignos). (A) Seq.ID N^o 3, $p = 0,017$ (C) Seq.ID N^o 1, $p = 0,004$. (B e D) Curva ROC combinada aos diagramas indicando a eficiência do diagnóstico por meio de AUC e respectivos valores de p . A linha pontilhada com pontos e sólida em cinza ilustram a absorbância de cada clone e o valor de referência, respectivamente. Foi utilizado o teste T não pareado com correções de Welch's para comparar as absorbâncias dos fagos entre os grupos analisados. **84**
- Figura 16:** Absorbância relativa dos fagos selecionados, ligantes a IgGs sorológicas de pacientes com câncer de ovário, em relação a tumores malignos (24 amostras), bordelines (10 amostras) e benignos (24 amostras). (A) Diagrama representativo mostrando poder discriminativo significativo ($p = 0,034$) do fago Seq.ID N^o 3 para os tumores. (B) Diagrama representativo mostrando poder discriminativo significativo ($p = 0,023$) do fago Seq.ID N^o 1. Nas análises estatísticas foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, devido à distribuição não paramétrica dos dados. **85**
- Figura 17:** Absorbância relativa do peptídeo sintético Synt1, ligante a IgGs sorológicas de pacientes com câncer de ovário, em relação a tumores malignos (24 amostras) e bordelines (10 amostras). (A) Diagrama representativo mostrando poder discriminativo significativo ($p = 0,032$) do peptídeo Synt1 para os tumores. (B) Curva ROC combinada ao diagrama indicando a eficiência do diagnóstico por meio de AUC e valor de p . A linha pontilhada com pontos e sólida em cinza ilustram a absorbância do peptídeo e o valor de referência, respectivamente. Foi utilizado o teste T não pareado com correções de Welch's, para comparar as absorbâncias do peptídeo entre os grupos analisados. **86**
- Figura 18:** Comparação dos valores das áreas abaixo das curvas ROC ou índices de AUC para os testes de diagnóstico entre tumores malignos ($n=34$) e tumores benignos de ovário ($n=24$), comparando os marcadores CA125 e CEA, comumente utilizados na clínica médica e os fagos Seq.ID N^o 3 e Seq.ID N^o 1. CA125 (AUC= 0,74 95% IC: 0,60-0,87); CEA (AUC= 0,60 95% IC: 0,44-0,75); Seq.ID N^o 1 (AUC= 0,70 95% IC: 0,57-0,83); Seq.ID N^o 3 (AUC= 0,64 95% IC: 0,45-0,78). **89**
- Figura 19:** Esquema demonstrando a produção de anticorpos anti-antiidiotipos (Ab3) específicos ao CA125, baseado na hipótese de Nils Jerne (JERNE, 1974) e as implicações do peptídeo Synt1 na resposta imune da paciente portadora de câncer de ovário. **100**

APRESENTAÇÃO

O câncer do ovário é o câncer ginecológico mais letal no mundo. A ausência de sinais e sintomas aliada à falta de estratégias de rastreamento contribuem para que a doença seja diagnosticada em estádios avançados na maior parte das pacientes, resultando, assim, em baixas taxas de cura.

A taxa de sobrevida em estágio inicial é de 85% a 95% em cinco anos. Entretanto, apenas um terço dos casos é diagnosticado nesse estágio. Entre as mulheres que estão em estágio avançado, a taxa de sobrevida é bem inferior, cerca de 10% a 30%.

História familiar de câncer do ovário, mama, útero, cólon e reto é um importante fator de risco para o desenvolvimento de câncer do ovário. Entretanto, somente 5% a 10% dos casos de carcinoma ovariano são hereditários. Uma mulher sem história familiar de câncer do ovário tem uma chance em 55 de desenvolver esse câncer. Esse risco aumenta 10 vezes quando ela apresenta história familiar.

Acredita-se que o uso de alguns contraceptivos orais reduza o risco de desenvolvê-lo, que declina ainda mais com o aumento da duração do uso. O risco é reduzido em 40%, 53% e 60% com o uso de contraceptivos orais por 4, 8 e 12 meses, respectivamente. Acredita-se que esse efeito protetor persiste mesmo após o uso descontinuado dos contraceptivos orais. Baixa paridade e menopausa tardia aumentam o risco de desenvolvimento do câncer de ovário, enquanto que a gravidez e a lactação parecem conferir um efeito protetor contra a doença. Esse efeito parece estar associado com a redução na ovulação associada aos altos níveis de progesterona.

Compreender e controlar as doenças malignas requer conhecimentos científicos e experiências que vão desde o conhecimento dos complexos mecanismos de regulação molecular às escolhas individuais do estilo de vida. A prevenção e o controle de câncer estão entre os mais importantes desafios, científicos e de saúde pública, da nossa época.

Há grande necessidade de descobertas de biomarcadores para detecção não invasiva, classificação e estadiamento do câncer de ovário. Proteínas ovarianas câncer-específicas podem ser identificadas para a utilização como marcadores em diagnóstico e prognóstico na terapia efetiva do câncer de ovário.

A tecnologia de bibliotecas apresentadas em fagos tem sido extremamente importante para a identificação e caracterização de novos ligantes de alta afinidade e seus receptores de uma infinidade de doenças, incluindo câncer, doenças infecciosas, cardiovasculares e autoimunes.

A técnica de *Phage Display* permite a seleção de peptídeos e proteínas incluindo anticorpos, com alta afinidade e especificidade para vários alvos, o que possibilita gerar biomarcadores específicos para auxiliar no diagnóstico e no tratamento individualizado de pacientes com câncer de ovário. As moléculas caracterizadas no presente trabalho apresentam potencial de geração de novas ferramentas tanto no diagnóstico clínico quanto na terapia contra este câncer, além de fornecer informações complementares aos parâmetros da rotina clínica utilizados atualmente.

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1 Ovários: aspectos anatômicos e histológicos

Os ovários são órgãos pareados que surgem no período fetal a partir do mesmo tecido embrionário que forma os testículos. São do tamanho e da forma de amêndoas (Figura 1). Encontram-se um de cada lado da cavidade pélvica, mantidos no lugar por ligamentos suspensórios e largos. Cada ovário contém um hilo por onde entram nervos, vasos sanguíneos e vasos linfáticos (TORTORA, 2000).

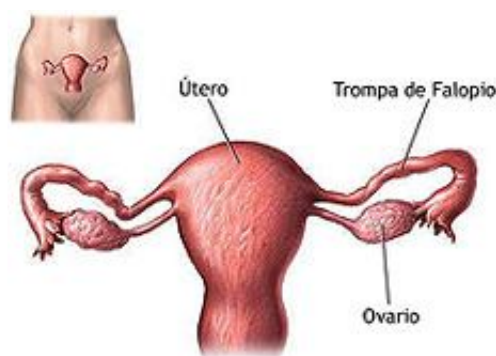


Figura 1: Visão anatômica dos ovários (disponível em www.bastet.atonra.com).

Apresentam forma oval com cerca de 3 cm de comprimento e 1,5 a 2cm de largura e 1cm de espessura. O epitélio da superfície que reveste os ovários é uma modificação do peritônio chamada epitélio germinativo. Imediatamente abaixo deste epitélio está a túnica albugínea, uma cápsula de tecido conjuntivo denso e irregular, pobremente vascularizada, rica em fibras colágenas que estão orientadas paralelamente à superfície do ovário. Cada ovário está subdividido em um córtex altamente celular e uma medula, que consiste principalmente em tecido conjuntivo frouxo, rico em vasos sanguíneos e células hilares (intersticiais). O córtex é composto por um arcabouço de tecido conjuntivo, o estroma, folículos ovarianos em vários estádios de desenvolvimento e células do estroma semelhantes a fibroblastos (GARTNER e HIATT, 2003) (Figura 2).



Figura 2: Fotomicrografia de ovário mostrando o epitélio de revestimento, a túnica albugínea e os folículos em crescimento localizados no córtex ovariano. (Disponível em [www. unifesp.br](http://www.unifesp.br)).

2 Câncer de Ovário

O câncer de ovário é uma doença na qual células anormais nos ovários se multiplicam e formam um tumor invasivo e maligno. Tais tumores podem se espalhar para outras partes do corpo e, se a propagação não for controlada, pode resultar em morte. Tumores benignos também podem se formar nos ovários e, com raríssimas exceções, não são fatais (AUSTRALIAN INSTITUTE OF HEALTH AND WELFARE, 2010).

Os tumores ovarianos também podem surgir a partir da trompa de falópio, de depósitos de endometriose ou da superfície da cavidade peritoneal. Além disto, substancial heterogeneidade tem sido observada no grau celular, no índice proliferativo e nos histotipos de tumores ovarianos (GIMBA e FRANCO, 2010).

Existem três principais tipos de câncer do ovário, cada um dos quais começa em um tipo diferente de células. As células epiteliais formam um revestimento externo sobre o ovário. A maioria dos casos de câncer de ovário começa nesta camada de células epiteliais e são chamados de câncer epitelial de ovário (EOC). Células germinativas são encontradas no interior do ovário e, eventualmente, estas células amadurecem em óvulos que são liberados nas trompas de falópio. Os cânceres que se desenvolvem nestas células são

chamados de câncer de células germinativas dos ovários. As células estromais atuam na liberação dos hormônios estrogênio e progesterona. Tumores de ovário que começam nestas células são chamados câncer de ovário de células estromais. Semelhante ao câncer de ovário epitelial invasivo, tumores borderline (também conhecidos como tumores de baixo potencial maligno) se desenvolvem a partir do epitélio dos ovários, mas esses tumores não são tão agressivos como outros tumores epiteliais de ovário e há menos risco de metástase ou reincidência (AUSTRALIAN INSTITUTE OF HEALTH AND WELFARE, 2010). A maioria dos casos de câncer de ovário é de origem epitelial (90%). O restante são tumores ovarianos estromais (6%), tumores de células germinativas (3%) e tumores metastáticos (1%) (FRIEDLANDER, 1998).

Carcinoma ovariano é uma doença heterogênea. Com base no exame histopatológico, patologistas o classificam nos seguintes subtipos: seroso, mucinoso, endometriode, células claras, de transição, escamoso, misto e subtipos indiferenciados. Cada um dos subtipos está associado com diferentes fatores de risco genéticos e eventos moleculares durante a oncogênese (NAROD e BOYD, 2002; SHIH e KURMAN, 2004; BELL, 2005).

Os tumores subdivididos em cada uma destas categorias são posteriormente subdivididos em três grupos, quais sejam, benignos, malignos e borderline, classificação esta que reflete seus comportamentos clínicos (GIMBA e FRANCO, 2010).

Com base na progressão da doença, os tumores ovarianos são subdivididos em quatro estádios (I-IV) (FRIEDLANDER, 1998; AUERSPERG, 2001).

O estadiamento no momento do diagnóstico tem importante valor prognóstico. Aproximadamente 85% das pacientes com câncer de ovário são diagnosticadas no estágio tardio da doença (RIES *et al.*, 2006). De acordo com Relatório Anual FIGO n. 26, dos 5 anos de sobrevida total, 89,6% seriam para a fase IA, 86,1% para IB, 83,4% para IC, 70,7% para a IIA, 65,5% para IIB, 71,4% para a IIC, 46,7% para IIIA, 41,5% para IIIB, 32,5% para IIIC e 18,6% para a fase IV (HEINTZ *et al.*, 2006).

A classificação do câncer de ovário é aplicável para os tumores estroma-epiteliais superficiais malignos, incluindo aqueles de malignidade limítrofe ou de

baixo potencial de malignidade (SCULLY, 1994) correspondendo aos "tumores epiteliais comuns" da terminologia recente. Os cânceres não epiteliais também podem ser classificados utilizando este esquema. Deve haver confirmação histológica da doença e divisão dos casos por tipo histológico. Os estádios da FIGO têm por base os estadiamentos cirúrgicos. Os estádios do TNM têm por base a classificação clínica e/ou patológica (TNM, 2004) (Tabela I).

Tabela 1: Classificação do câncer de ovário. Fonte: TNM: classificação de tumores malignos, 2004.

TNM	Ovário	FIGO
T1	Limitado aos ovários	I
T1a	Um ovário, cápsula intacta	IA
T1b	Ambos os ovários, cápsulas intactas	IB
T1c	Cápsula rompida, tumor na superfície, células malignas em ascite ou em lavados peritoneais	IC
T2	Extensão pélvica	II
T2a	Útero, trompa(s)	IIA
T2b	Outros tecidos pélvicos	IIB
T2c	Células malignas em ascite ou em lavados peritoneais	IIC
T3 e/ou N1	Metástase peritoneal além da pévis e/ou metástase em linfonodo regional	III
T3a	Metástase peritoneal microscópica	IIIA
T3b	Metástase peritoneal macroscópica ≤ 2 cm	IIIB
T3c e/ou N1	Metástase peritoneal > 2 cm e/ou metástase em linfonodo regional	IIIC
M1	Metástase à distância (exclui metástase peritoneal)	IV

2.1 Epidemiologia

Nos países ocidentais, o câncer de ovário é a sexta neoplasia maligna mais comumente diagnosticada em mulheres e lidera as causas de óbito por tumores ginecológicos (JEMAL *et al.*, 2007).

Nos Estados Unidos, em 2009 foram estimados 21.550 novos casos de câncer de ovário e 14.600 mortes de mulheres acometidas com este tumor. Neste mesmo ano constatou-se que dentre os tumores ginecológicos, o câncer de ovário é o segundo de maior incidência, perdendo apenas para o tumor de corpo uterino (42.160 novos casos), porém o de maior letalidade (corpo uterino: 7.780;

colo do útero: 4.070; vulva: 900; vagina: 770 mortes), correspondendo à quinta causa mais comum entre as mortes por neoplasias femininas (Figura 3) (JEMAL *et al.*, 2009).

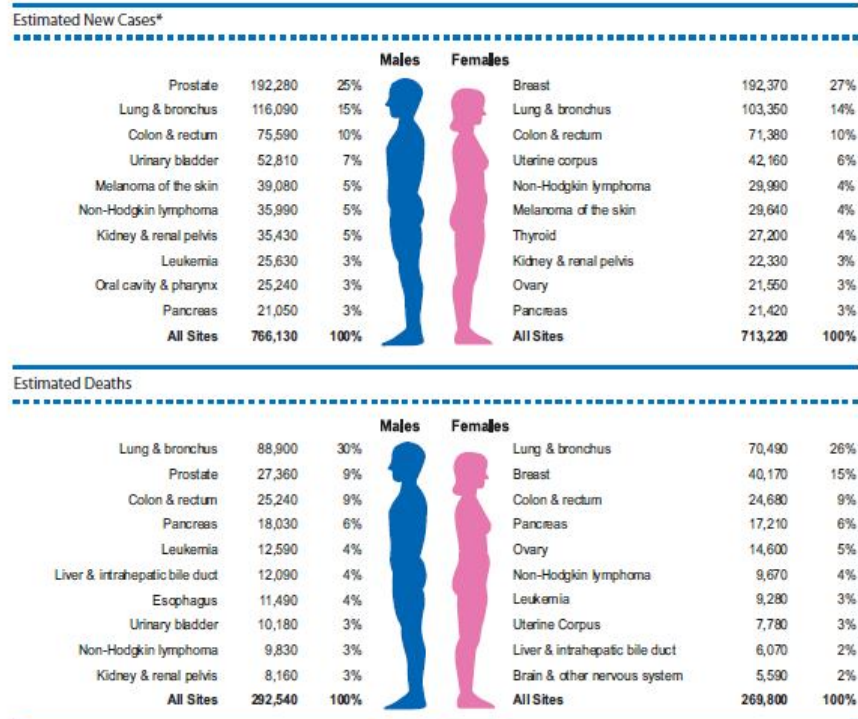


Figura 3: Estimativas para novos casos de câncer e mortes, por sexo, nos dez principais tipos de câncer nos Estados Unidos, 2009. Fonte: Jemal *et al.*, 2009.

Estimou-se que 21.880 novos casos de câncer de ovário eram esperados para os EUA em 2010. O câncer de ovário corresponde a cerca de 3% de todos os cânceres entre as mulheres e ocupa o segundo lugar entre os cânceres ginecológicos. A incidência do câncer de ovário tem diminuindo desde 1985, e mais recentemente, sua incidência diminuiu em 2,1% ao ano entre 2001 e 2006 (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2010).

No Brasil, para os casos de câncer de ovário analisados, os maiores valores das taxas médias de incidência anuais, ajustadas por idade por 100 mil mulheres, foram encontrados em Porto Alegre (12,1); São Paulo (9,5) e Goiânia (9,0). A menor taxa foi observada na cidade de João Pessoa (6,3) (CÂNCER NO BRASIL, 2010).

2.2 Fatores de Risco

Entre os fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de ovário estão incluídos a etnia, idade, obesidade, história familiar da doença, o uso de drogas para fertilidade, entre outros, como mostra a Tabela 2 (CHU e RUBIN, 2006).

Tabela 2: Associação dos fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de ovário epitelial.

Fonte: Chu e Rubin, 2006.

Fator de Risco	Específico Fator de Risco
Tendência familiar	Mutação no BRCA1 e BRCA2 Síndrome de Lynch II (câncer de colo-retal) Mutação em genes de reparo do DNA
Idade	> 50 anos
Demografia	Branco ou ascendência judaica ou europeia Residente em nações industrializadas (exceto Japão)
Fatores reprodutivos	Menarca precoce, menopausa tardia Infertilidade, nuliparidade (amamentação e contraceptivos orais são protetores)
Exposição ambiental	Dieta rica em gordura, café Dieta pobre em fibras e vitamina A Uso de talco na região perineal Amianto Radiação Infecção viral (rubéola, caxumba)

Os estudos epidemiológicos do câncer de ovário revelam que a história familiar é o maior fator de risco para o desenvolvimento deste tipo de câncer, e depende do número de afetados de primeiro e segundo grau (AUERSPERG *et al.*, 2001).

Entre os fatores de risco genéticos associados à hereditariedade do câncer de ovário, as mutações no gene BRCA1 e BRCA2 são particularmente importantes (LYNCH *et al.*, 1998). Mulheres com mutações nos genes BRCA1 ou BRCA2 têm um risco significativamente maior de desenvolvimento de câncer de mama e câncer de ovário do que mulheres na população geral (NAROD, 2002; KING *et al.*, 2003).

Embora as causas do câncer de ovário não estejam bem compreendidas, certos hormônios reprodutivos são provavelmente associados com sua etiologia (BARNES *et al.*, 2002).

A incidência do câncer de ovário é maior após a menopausa e em idade avançada (a partir dos 60 anos). Os ovários das mulheres pós-menopáusicas normalmente se tornam rugosos, resultando na formação de fissuras profundas e pequenos cistos ovarianos inclusos, revestidos com células de superfície epitelial (AUERSPERG *et al.*, 1998; AUERSPERG *et al.*, 2001). Estas mudanças formam um ambiente propício para o desenvolvimento do câncer de ovário (FEELEY e WELLS, 2001).

Embora a etiopatogenia não esteja totalmente esclarecida, uma das hipóteses plausíveis é de que o câncer apareceria no epitélio ovariano devido a traumas ininterruptos de ovulações e proliferações celulares, com a formação de cistos onde as células malignas poderiam se reproduzir mais facilmente. Essa teoria pode explicar porque fatos que interrompem a ovulação e descansam o ovário, como é o caso da amamentação, estariam associados a um menor risco de câncer (DALY e OBRAMS, 1998; REA, 2004). Embora existam poucos estudos relacionando a prática de amamentar ao câncer de ovário, pode-se afirmar que o risco da doença é menor em mulheres que amamentam (LABBOK, 2001).

Os contraceptivos orais diminuem o risco de câncer do ovário em função do seu tempo de utilização. Quando usados por um período de 6 anos a redução atinge 60%. Um período superior a 6 anos de utilização não aumenta o efeito protetor. No caso de risco acrescido por predisposição hereditária, a prevenção primária pode consistir de anexectomia bilateral aos 35 anos ou 5 anos antes da idade da familiar mais jovem afetada com câncer de ovário, e uso de contracepção oral estroprogestativa, por um período de pelo menos 5 anos (CONSENSO, 2003).

Fatores hormonais, ambientais e genéticos estão relacionados com o aparecimento do câncer de ovário. Cerca de 90% dos casos de câncer de ovário são esporádicos, isto é, não apresentam fator hereditário. Cerca de 10% dos cânceres de ovário apresentam um componente genético ou familiar. História familiar é o fator de risco isolado mais importante (INCA, 2011).

Define-se como mulher em risco de carcinoma hereditário quando se identifica um familiar de 1º grau com câncer de ovário antes dos 35 anos; um familiar de 1º grau com câncer de mama e ovário (um com aparecimento na pré-menopausa); pelo menos dois familiares do 1º grau com câncer de ovário ou de mama (no homem ou na mulher pré-menopausica); mulher com câncer de mama bilateral; mulher pertencente a uma família com carcinoma do cólon hereditário não polipótico (HNPCC) – síndrome de Lynch de tipo II. As mulheres que se enquadram em uma destas situações devem ser encaminhadas para as consultas diferenciadas de estudo de tumores hereditários (CONSENSO, 2003).

A presença de cistos no ovário, bastante comum entre as mulheres, não são indicativos de doença neoplásica desde que não se apresentem maiores que 10cm e possuam áreas sólidas e líquidas. Nesse caso, quando detectado o cisto, a cirurgia é o tratamento indicado (INCA, 2011).

Os estudos mostram que, em ordem decrescente de significância, os fatores de proteção associados ao câncer ovariano são: uso de contraceptivo oral; gravidez e amamentação; ligadura de trompas e histerectomia; ooforectomia profilática; e não exposição a agentes comprovadamente associados com a doença, tais como talco, terapia de reposição hormonal e drogas usadas para infertilidade (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2011).

2.3 Prevenção e Rastreamento

A grande diversidade biológica do câncer de ovário representa o maior obstáculo para a redução das mortes por ele causada. Em vez da redução de 20% para 15% na mortalidade do câncer de ovário, os autores estimam que as mortes cairiam cerca de 11% dos seus níveis atuais, se as mulheres na pós-menopausa nos Estados Unidos realizassem uma triagem anual (HAVRILESKY *et al.*, 2011).

Existe uma ausência de métodos confiáveis de rastreamento e detecção precoce do câncer de ovário (NOSSOV *et al.*, 2008). Devido à falta de sinais e sintomas específicos, bem como a falta de exames clínicos eficazes, o câncer de ovário epitelial é diagnosticado, na maioria dos pacientes, em fases avançadas,

resultando em baixas taxas de cura. Portanto, existe uma grande necessidade em melhorar a compreensão da biologia do estágio inicial deste tipo de câncer, a fim de racionalizar as abordagens experimentais e os estudos clínicos que permitam identificar e avaliar biomarcadores associados à doença em fase inicial (JEREMY *et al.*, 2009).

Ao contrário da vulva, vagina, colo do útero e endométrio, que são facilmente acessíveis, os ovários são órgãos localizados intra-abdominalmente, o que os torna inacessíveis para a triagem e biópsia pré-operatória e diagnóstico histológico. Embora a biópsia ovariana sob a orientação do ultra-som seja viável, este método de detecção não é incentivado por seu risco potencial de disseminação das células tumorais (CHRISTOPHER *et al.*, 2009).

Avaliação pré-operatória de massas anexiais pode ser realizada utilizando vários métodos. Entre estes os métodos de diagnóstico não-invasivo como ultrasonografia transabdominal e/ou transvaginal, sistema ultra-sonográfico de Sasson ou Lerner, exame de fluxo em cores e exame de ultra-som Doppler (LERNER *et al.*, 1994), tomografia computadorizada, ressonância magnética e tomografia por emissão de pósitrons. O uso de marcadores tumorais como CA125, CA15-3 e CA-72-4 também pode ser aplicado (KUSNETZOFF *et al.*, 1998; KURJAK *et al.*, 2000).

A neoplasia maligna de ovário representa grande desafio, pois apesar dos avanços da terapia oncológica, a sobrevida das pacientes não se alterou nas últimas décadas (LANDIS *et al.*, 1999).

2.4 Diagnóstico e Marcadores Moleculares

Novas abordagens são necessárias para superar a falta de especificidade e sensibilidade na detecção precoce do câncer de ovário. Os ensaios clínicos de combinações de dosagem de antígenos tumorais e ultra-sonografia, tais como transabdominal ou transvaginal, foram avaliados para detecção precoce de tumores ovarianos com resultados promissores (BAST *et al.*, 2005).

Antígenos tumorais foram inicialmente classificados em duas categorias com base em seu padrão de expressão: antígenos específicos do tumor (*tumor-*

specific antigens - TSA), que estão presentes apenas em células tumorais e não em quaisquer outras células; e antígenos associados ao tumor (*tumor associated antigens* - TAA), que estão presentes em algumas células tumorais e também em algumas células normais. No entanto, esta classificação é imperfeita porque muitos antígenos inicialmente considerados tumor- específico são também expressos em algumas células normais. A moderna classificação dos antígenos tumorais é baseada em sua estrutura molecular e fonte. Várias técnicas para identificar antígenos tumorais têm sido desenvolvidas, que incluem a tecnologia do SEREX (VAUGHAN, 2004) e análises de bioinformática (ODUNSI e SABBATINI, 2008).

Marcadores tumorais são substâncias produzidas pelo tumor e/ou em resposta à presença do tumor. Diversas categorias de marcadores têm sido investigadas para o diagnóstico precoce dos tumores ovarianos, entre as quais merecem destaque: as sialomucinas epiteliais; proteases com seus inibidores complementares e produtos de clivagem; citocinas, receptores e reagentes de fase aguda; hormônios, fatores promotores e inibidores de crescimento; citoqueratinas; lípideos e lipoproteínas; proteínas oncofetais e auto-anticorpos (TERRY *et al.*, 2004). Estas substâncias podem ser utilizadas isoladamente ou em combinação (REIS, 2005).

Os dois principais tipos de biomarcadores são marcadores de prognóstico e de diagnóstico. Alguns exemplos de marcadores prognósticos no câncer de ovário incluem calicreína 8 (BORGONO *et al.*, 2006), matriptase (OBERST *et al.*, 2002) e serotransferrina (AHMED *et al.*, 2005). Como exemplos de marcadores de diagnóstico no carcinoma ovariano, tem-se a mesotelina (HASSAN *et al.*, 2006) e HE4 (SCHOLLER *et al.*, 2006).

O marcador ideal deve ser produzido por todos os tumores da mesma linhagem e seus níveis devem ser mensuráveis mesmo na presença de pequena quantidade de células. Os níveis séricos devem refletir com precisão a evolução clínica e a regressão da doença, sendo a sua normalização associada à cura. Deve ser sensível e específico, apresentar níveis proporcionais ao tamanho tumoral, ter utilidade no estabelecimento do prognóstico, antecipar a ocorrência de recorrências e permitir a seleção de tratamento. Nenhum dos marcadores estudados apresenta todas estas características (BAST *et al.*, 1981).

A extração do RNA mensageiro e a síntese do DNA complementar a partir de tumores e de tecido normal têm sido utilizadas para localizar genes superexpressos e identificar uma variedade de marcadores, incluindo prostatina (MOK *et al.*, 2001) e a osteopontina (KIM *et al.*, 2002).

A principal limitação da utilização do método baseado nos microarranjos de DNA complementar é que as sequências gênicas identificadas, DNA ou RNA, não necessariamente refletem a funcionalidade das proteínas codificadas, em virtude da atividade transcricional tumoral, das diversas interações proteína-proteína e modificações conformacionais, que podem alterar o padrão de proteínas encontrado na circulação. Por outro lado, proteínas produzidas por tecidos tumorais podem ser consideradas uma forma de “assinatura molecular” da lesão primária. O desenvolvimento tumoral é um processo complexo que requer a interação coordenada de numerosas proteínas e tipos celulares. Como resultado de extensos estudos sobre patogênese molecular dos tumores malignos, diversas novas vias e redes regulatórias têm sido identificadas. O delineamento destas vias tem revelado diversos eventos únicos marcados por mudanças morfológicas e histológicas na célula, e a expressão de genes e proteínas que acompanham a transformação oncogênica. Portanto, a assinatura celular muda durante o desenvolvimento do câncer. Pela leitura destas modificações é possível melhorar a detecção precoce e o diagnóstico de indivíduos com esta doença (REIS, 2005).

Novas tecnologias para estudo de proteínas têm sido utilizadas para a identificação de novos marcadores para o câncer de ovário. Uma interessante abordagem é a utilização de padrões de perfis gerados pela análise do soro de pacientes com carcinoma ovariano por meio da espectrometria de massa, sem a identificação de proteínas específicas. Estes perfis são gerados por espectrômetro de massa SELDI-TOF (*Surface-Enhanced Laser Desorption and Ionisation Time-of-Flight*) e analisados por complexas ferramentas de bioinformática (PETRICOIN *et al.*, 2002).

Duas estratégias alternativas têm sido relatadas para a detecção precoce do câncer de ovário usando marcadores biológicos. Uma abordagem é a análise de amostras de soro para encontrar proteínas ou fragmentos de proteínas, que detectam a ausência/presença de câncer (KOZAK *et al.*, 2003; ZHU e SNYDER, 2001; ZHANG *et al.*, 2004). Outra estratégia seria a análise da

presença/ausência/abundância de proteínas/peptídeos conhecidas no soro usando microarranjos de anticorpos, ELISA ou outras abordagens rendendo uma série de biomarcadores combinados com maior especificidade e sensibilidade para o câncer de ovário em relação ao CA125 sozinho (McINTOSH *et al.*, 2004; SCHORGE *et al.*, 2004).

2.4.1 CA125/MUC16

O marcador tumoral mais utilizado no câncer de ovário é o CA125 (HOGDALL, 2008). É uma sialomucina, também conhecida como MUC16, que foi inicialmente identificada por meio de anticorpos produzidos por animais imunizados com células de cistadenocarcinoma seroso papilífero do ovário humano (BAST *et al.*, 1981).

CA125 é uma glicoproteína de alto peso molecular que é aumentado em cerca de 90% dos pacientes com câncer de ovário epitelial avançado (BAST *et al.*, 1983). É expresso pelo epitélio amniótico e celômico fetal e em tecidos adultos derivados do celoma (células mesoteliais da pleura, pericárdio e peritônio) e epitélio mülleriano (trompas, endométrio e endocérvice). O CA125 contém dois grandes domínios antigênicos, ou seja, A e B, que se ligam a anticorpos monoclonais OC125 e M11, respectivamente (NUSTAD *et al.*, 1996). Desde sua identificação, a mensuração do nível sérico do antígeno CA125 se tornou um componente padrão de gerenciamento da rotina das mulheres com câncer ovariano avançado (MARKMAN, 2003). Níveis séricos de CA125 inferiores a 35U/mL são considerados normais (KENEMANS *et al.*, 1993).

Os níveis séricos do CA125 em pacientes com câncer de ovário estão elevados em 50% nos estádios I e II e em 90% no estágio IV (ZURAWSKI *et al.*, 1988). No entanto, a utilização do CA125 no diagnóstico do câncer de ovário é comprometida pela falta de especificidade e elevada taxa de diagnósticos falso-positivos. Altas concentrações deste marcador são detectadas em outros tipos de câncer (pâncreas, mama, bexiga, fígado e pulmão), doenças benignas (diverticulite, endometriose, cisto benigno do ovário, abscesso tubo-ovariano,

síndrome de hiperestimulação e gravidez ectópica), e em condições fisiológicas (gravidez, menstruação) (GOONEWARDENE *et al.*, 2007).

Porém, como as concentrações séricas deste antígeno são elevadas em mais de 80% dos pacientes com câncer de ovário epitelial em estágio avançado, este marcador tem sido estudado para o rastreamento de mulheres assintomáticas, no diagnóstico diferencial de mulheres com massas pélvicas, no monitoramento de resposta ao tratamento adjuvante e na detecção precoce de recorrência do tumor após tratamento (CHAUHAN *et al.*; 2006).

Os parâmetros de sensibilidade e especificidade do CA 125 na detecção do câncer de ovário variam na dependência de diversos fatores. A sensibilidade varia entre 24 e 97% e depende principalmente do estágio e do tipo histológico do tumor (REIS, 2005).

A proteína CA125 também é muito utilizada no monitoramento pós-tratamento do câncer de ovário. As concentrações séricas deste antígeno tumoral aumentam com a evolução da doença, mas tendem a decrescer após a intervenção terapêutica (GOONEWARDENE *et al.*, 2007).

Mucinas são amplamente expressas por células epiteliais do trato gastrointestinal, respiratório e urogenital, além de possuírem múltiplas implicações no desenvolvimento do câncer (SINGH *et al.*, 2004).

Devido ao fato de que a maioria dos casos de câncer de ovário é de origem epitelial, as mucinas são atraentes marcadores para o seu diagnóstico e tratamento. Embora os mecanismos ainda não estejam esclarecidos, sabe-se que muitos epitélios de ovários com tumores malignos expressam mais mucinas de superfície do que os de ovários normais e benignos. As proteínas MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC e MUC16 são super expressas em câncer de ovário epitelial (GIUNTOLI *et al.*, 1998; BOMAN *et al.*, 2001; FENG *et al.*, 2002; GUM *et al.*, 2002; RANGEL *et al.*, 2003; HEINZELMANN-SCHWARZ *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2007).

A mucina MUC16 interage com a mesotelina e esta interação pode desempenhar um papel importante na metástase do câncer de ovário (GUBBELS *et al.*, 2006; RUMP *et al.*, 2004). MUC16 pode também ajudar as células tumorais a escaparem da vigilância do sistema imune, inibindo a atividade citolítica das células *Natural Killer* por ativação do receptor CD16 (PATANKAR *et al.*, 2005;

BELISLE *et al.*, 2007). Além disso, MUC16 também protege as células cancerígenas ovarianas do ataque dos fatores do sistema complemento (MURDOCH *et al.*, 2006).

2.5 Imunoterapia para o Câncer de Ovário

Devido à baixa taxa de sobrevivência do câncer de ovário, novas modalidades de tratamento eficazes são urgentemente necessárias. Evidências convincentes indicam que a resposta imune contra o câncer de ovário pode desempenhar um papel importante no controle da doença (LIU *et al.*, 2010).

A imunoterapia como uma abordagem em potencial para o tratamento de câncer de ovário é baseada nas seguintes evidências: (1) no câncer de ovário ocorre a expressão de antígenos associados a tumor, por exemplo, HER2/neu (DISIS *et al.*, 2004), MUC1 (VLAD *et al.*, 2004), CA125 e OA3 (KENEMANS, 1990), receptor de folato (COLIVA *et al.*, 2005), mesotelina (CHANG e PASTAN, 1996) e NY-ESO-1 (ODUNSI *et al.*, 2003) que podem servir como alvos para a resposta imune humoral e resposta imune celular; (2) a presença de linfócitos infiltrantes (TILs) correlacionada fortemente com a sobrevivência dos pacientes (ZHANG *et al.*, 2003); (3) no câncer de ovário ocorre a expressão de peptídeo/complexos MHC, que podem ser reconhecidos por linfócitos T CD8+; (4) e, mais importante, a interação dinâmica entre a imunidade do hospedeiro e o câncer. Tomadas em conjunto, foi levantada a hipótese de que a imunoterapia pode ser uma inovadora e eficaz terapia de suporte no controle do câncer de ovário. Atuais opções de tratamento imunoterápico contra o câncer de ovário incluem a terapia baseada em vacinas de anticorpos (Abs), por exemplo, contra o CA125; de citocinas (como IFN γ , IL-2); imunização ativa com células tumorais; vacinas de peptídeos; vacinas de células dendríticas e de chaperonas (HSP). Estas modalidades de imunoterapia estão em diferentes fases de investigação clínica (LIU *et al.*, 2010).

A imunoterapia do câncer baseada em anticorpos tornou-se agora uma prática padrão no tratamento de linfoma e outros tipos de câncer. No câncer de ovário, a imunoterapia está baseada no oregovomab (Mab B43.13), que é um

anticorpo monoclonal murino que se liga ao CA125 com alta afinidade e pode induzir uma resposta imune humoral e celular contra o carcinoma ovariano. Ehlen *et al.* (2005) realizaram um estudo piloto para examinar os efeitos clínicos e imunológicos do oregovomab em pacientes pré-tratados com câncer ovariano recorrente. Mais de 50% dos pacientes geraram um anticorpo anti-CA125, bem como células T específicas. Todos os pacientes apresentaram uma estabilização da doença e sobrevivência por mais de 2 anos.

Uma variedade de abordagens quimioterápicas e desenvolvimento de diferentes estratégias de tratamentos imunoterápicos estão sendo desenvolvidas nos últimos anos (KIRBY *et al.*, 2002). Uma dessas estratégias é a vacinação com anticorpos antiidiotipos (Ab2), que é baseada na hipótese de Nils Jerne (JERNE, 1974). Segundo esta teoria, as regiões variáveis de ligação a antígenos de anticorpos (Ab1) contêm determinantes (Id) que são imunogênicos e induzem a formação de Ab2. Um subconjunto destes anticorpos é funcionalmente capaz de imitar a estrutura tridimensional do antígeno original. Assim, a vacinação seletiva com Ab2 poderia induzir uma resposta imune específica contra o antígeno original (JEFFERIS, 1993; CHATTERJEE, *et al.*, 1994).

Anticorpos antiidiotipos (Ab2) são utilizados como substituto para antígenos associados a tumor em ensaios de vacinação, já que resultam em uma resposta antitumoral específica. Uma intensa resposta imune com a produção de anticorpos Ab3 está associada com a sobrevida prolongada dos pacientes com tumor, especialmente no caso de pacientes com câncer de ovário tratadas com vacina antiidiotipo ACA125 (REINARTZ *et al.*, 2004). Para melhor compreensão, a Figura 4 esquematiza a resposta imune humoral e produção de anticorpos Ab3 específicos ao CA125.

A imunização ativa com antígenos tumorais é limitada pela sua baixa imunogenicidade. Por outro lado, mAb antiidiotipo ACA125 pode efetivamente induzir a resposta contra o antígeno tumoral CA125 com a produção de anticorpos anti-antiidiotipos (Ab3) específicos ao CA125, como demonstrado em modelos animais (SCHLEBUSCH *et al.*, 1995) e em ensaios clínicos (WAGNER *et al.*, 1997; WAGNER, 1998; WAGNER *et al.*, 2001; REINARTZ *et al.*, 1999). Como os títulos da resposta Ab3 se correlacionam com a sobrevida prolongada das pacientes com câncer de ovário após a vacinação (WAGNER *et al.*, 2001), há

uma necessidade de aumentar especificamente a atividade de ACA125 em células B específicas sem estimulação das células B sistêmicas.

Muitos estudos têm utilizado um anticorpo antiidiotipo para aumentar a imunogenicidade. Abagovomab (ACA125) é um anticorpo monoclonal antiidiotipo produzido em camundongo cuja região variável reflete o antígeno CA125. Em fase I/IIb do estudo de Reinartz *et al.* (2004) 119 pacientes com câncer de ovário avançado foram tratados com abagovomab. A produção de um anticorpo anti-antiidiotipo específico (Ab3) foi induzida em 81 pacientes (68,1%). Cinquenta por cento das pacientes desenvolveu um anticorpo anti-CA125 específico. A taxa média de sobrevivência de todas as pacientes foi 19,4 meses (intervalo: 0,50-56 meses). No entanto, as pacientes Ab3-positivos mostraram uma taxa de sobrevivência significativamente maior (média de 23,4 meses; $p < 0,0001$) em comparação com pacientes Ab3-negativos. Nos estudos de Pfisterer *et al.* (2006) em pacientes com câncer de ovário recorrente tratados com abagovomab, foi observado um aumento de IFN γ e expressão de células T CD8+ específicas. No entanto, não houve correlação consistente entre a indução de Ab3 e frequências de CTL e células T helper específicas ao CA125.

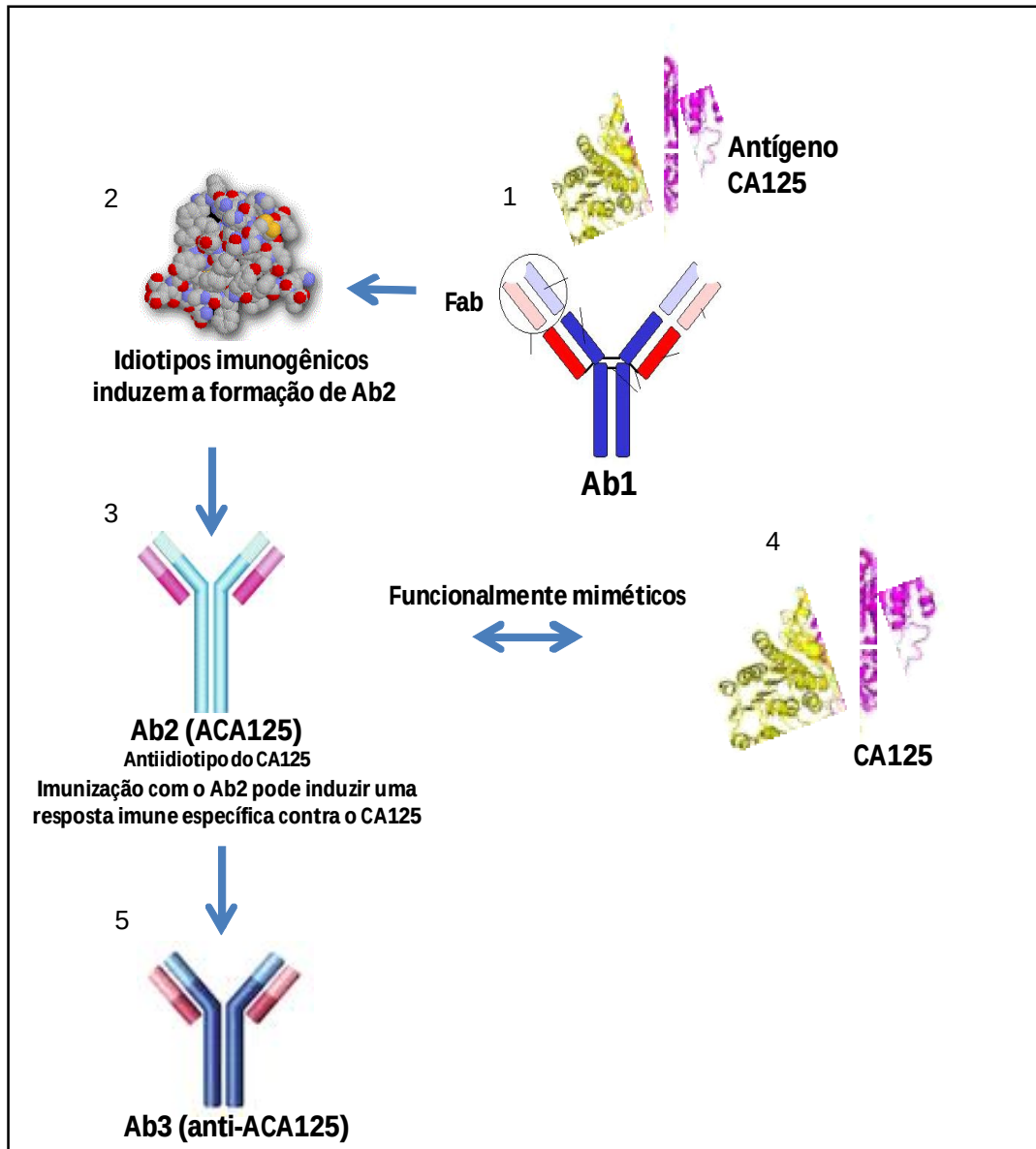


Figura 4: Esquema demonstrando a produção de anticorpos anti-antiidiotipos (Ab3) específicos ao CA125, baseado na hipótese de Nils Jerne (JERNE, 1974). (1) As regiões variáveis de ligação a antígenos de anticorpos (Ab1) contêm determinantes (Id) que são imunogênicos (2) e induzem à formação de Ab2 (3). Um subconjunto destes anticorpos é funcionalmente capaz de imitar a estrutura tridimensional do antígeno original (4). Assim, a vacinação seletiva com Ab2 poderia induzir uma resposta imune específica contra o antígeno tumoral CA125 com a produção de anticorpos anti-antiidiotipos (Ab3) específicos ao CA125 (5).

3. *Phage Display*

A metodologia do *Phage Display* consiste na exposição de peptídeos exógenos na superfície de fagos filamentosos, vírus que infectam células bacterianas. Foi demonstrado primeiramente por Smith (1985) ao conseguir a expressão da enzima de restrição EcoRI por meio da fusão com a proteína três (pIII) do capsídeo do fago. Desde então, o *Phage Display* tem sido amplamente empregado com a finalidade de identificar ligantes através de interações moleculares e obter informações sobre a relação receptor-ligante.

Normalmente, utiliza-se o bacteriófago filamentoso M13 para construção de uma biblioteca de pequenos peptídeos fusionados à proteína pIII, que permite realizar um *screening* de peptídeos ligantes à molécula alvo por seleção *in vitro* (*biopanning*). Bacteriófagos, ou simplesmente fagos, são vírus que infectam uma variedade de bactérias Gram-negativas (ex. *E. coli*) usando o *pilus* sexual como receptor. Os fagos filamentosos (linhagens M13, f1, fd) pertencem à família Inoviridae de bacteriófagos e possuem como material genético DNA circular de fita simples (ssDNA) de 6,4 kb, envolto em uma cápsula protéica (BRÍGIDO e MARANHÃO, 2002).

A partícula viral, apresentada na Figura 5, é composta pelo genoma viral e por cinco proteínas estruturais. No capsídeo do fago estão presentes as proteínas pIII, pVI, pVIII, pVII e pIX. Entre as duas extremidades, o ssDNA é recoberto por milhares de cópias de pVIII (50 resíduos de aminoácidos) que formam o corpo do capsídeo cilíndrico e flexível. Nas extremidades desse capsídeo encontram-se de três a cinco cópias das demais proteínas estruturais. A extremidade distal contém as proteínas pVII e pIX, enquanto que a proximal é composta pelas proteínas codificadas pelo gene 3 (pIII) e pela proteína pVI (MAKOWISK, 1993).

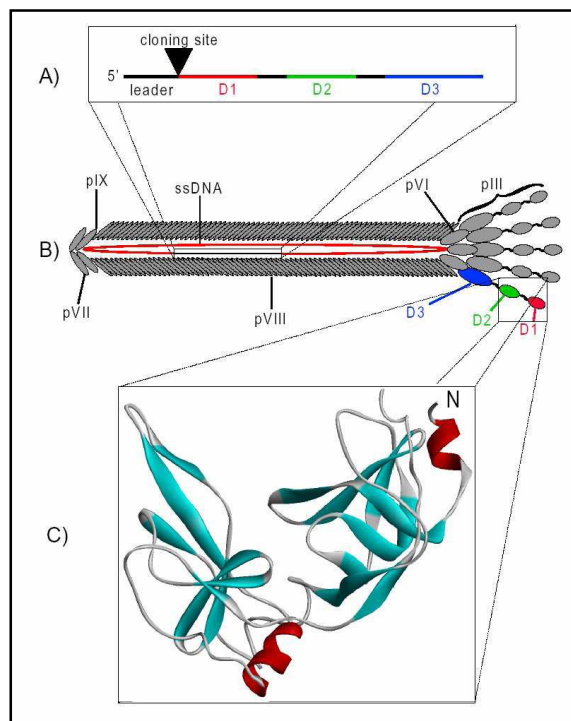


Figura 5: Esquema de um fago filamentosso. A) Composição do gene III, mostrando o sítio de clonagem para introdução do gene adicional; B) Partícula viral com as proteínas pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX; C) Cristalografia dos domínios D1 e D2 da proteína III, as alfa-hélices estão coloridas em vermelho e as fitas β , em azul ciano.

A apresentação do peptídeo pelo fago é possível, pois, nesse sistema, sequências aleatórias de DNA são introduzidas no gene que codifica a proteína do capsídeo do fago (camada externa e protetora). Desta forma, sequências aleatórias de peptídeos fundidas à proteína do capsídeo (pIII ou pVIII, dependendo do sistema a ser empregado) são geradas durante a produção da partícula viral (SMITH, 1985). No fim do processo, bilhões de bacteriófagos são gerados, cada um deles apresentando um peptídeo diferente. Esta coleção de partículas virais recebe o nome de biblioteca apresentadora de peptídeos. Estas bibliotecas são, então, incubadas com as moléculas alvo do estudo (receptores purificados, células expressando seus receptores de superfície, anticorpos, entre outros). Este processo denominado *biopanning*, ou simplesmente *panning*, como demonstra a Figura 6, permite selecionar os fagos ligantes, expressando os peptídeos que mimetizam ligantes naturais destas moléculas (BARBAS *et al.*, 2001).

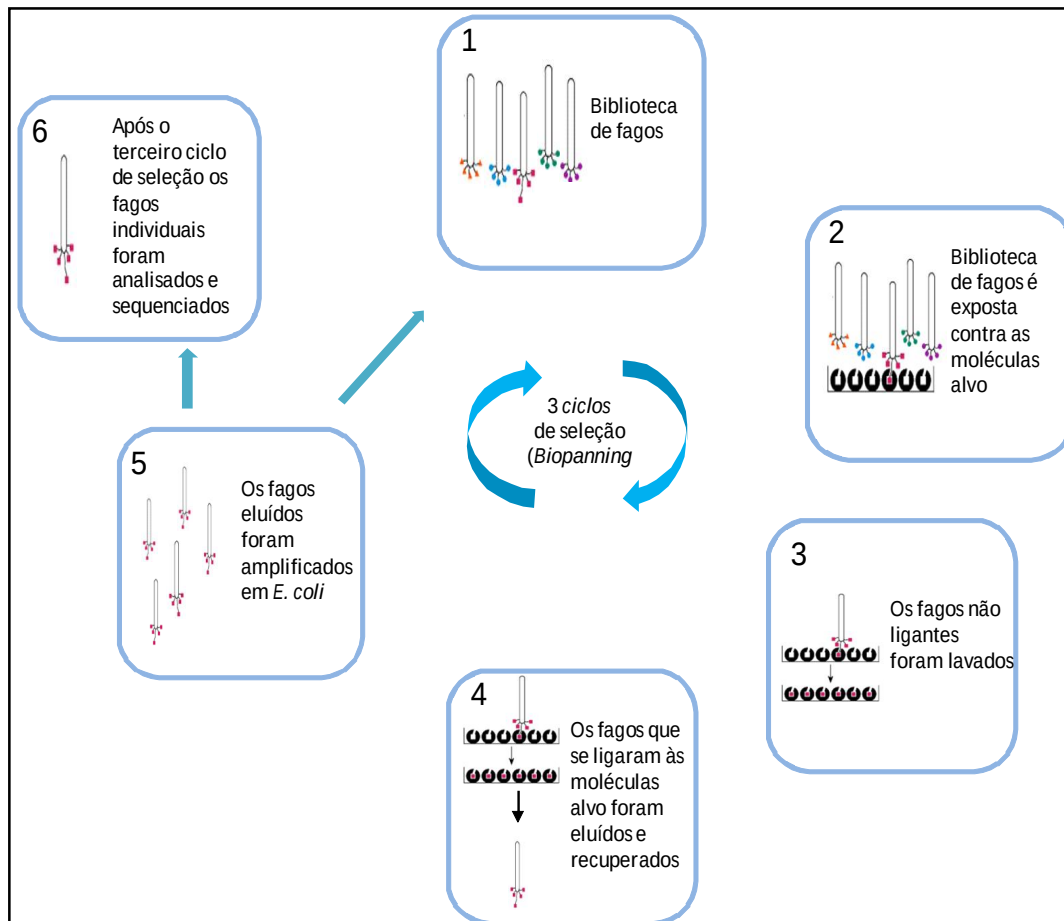


Figura 6: *Biopanning* - a biblioteca de fagos (1) é sujeita a diversos ciclos de seleção por afinidade incluindo a captura dos fagos com antígenos (2), lavagem para remover os fagos não ligantes (3), eluição para recuperar os fagos ligados ao alvo (4) e amplificação em *E. coli* (5). Quando o enriquecimento adequado é alcançado os clones são isolados e caracterizados (6).

Bibliotecas de peptídeos randômicos têm sido usadas com sucesso para identificar peptídeos bioativos contra receptores purificados e imobilizados ou contra células intactas (RODI e MAKOWSKI, 1999) e para identificar alvos ligantes de um órgão particular ou um tipo celular *in vivo* (PASQUALINI e RUOSLAHTI, 1996). Sem alvo, a partícula viral (fago) não tem tropismo por células, exceto células bacterianas (BARRY *et al.*, 1996).

Esta tecnologia tem sido utilizada para produzir diagnósticos clínicos, novas drogas contra diversas patologias e para mapeamento de interação proteína-proteína (RODI e MAKOWSKI, 1999). Proteínas, anticorpos, hormônios,

inibidores de proteases, enzimas e proteínas que se ligam a ácidos nucleicos tem sido mapeados por essa técnica. Ela permite a seleção de peptídeos e proteínas incluindo anticorpos, com alta afinidade e especificidade para vários alvos. A vantagem crucial desta tecnologia está na ligação direta que existe entre o fenótipo experimental e o genótipo encapsulado, mostrando a evolução dos ligantes selecionados até moléculas otimizadas (AZZAZY e HIGHSMITH, 2002).

Peptídeos obtidos pela tecnologia de *Phage Display* podem exercer um efeito anticancerígeno por inibição de angiogênese, decréscimo na atividade metastática do tumor ou inibindo enzimas importantes para disseminação de células neoplásicas. Eles também podem ser usados como componentes de vacinas antitumor ou veículos para carrear citocinas, quimioterápicos ou oligonucleotídeos anti-senso para o tumor. Essa tecnologia permitiu, ainda, o desenvolvimento de anticorpos recombinantes anticâncer, mais comumente usados como moléculas Fv de cadeia única (scFv), as quais podem ser modificadas para aumentar sua afinidade e avidéz. Eles podem, ainda, ser conjugados com moléculas que induzem diferentes efeitos antigênicos (BORYSOWSKI e GORSKI, 2004).

Vários trabalhos têm relatado a identificação, pela tecnologia de *Phage Display*, de peptídeos que mimetizam biomoléculas específicas em diversos tipos de câncer, como por exemplo: mama (HANSEN *et al.*, 2001), hepatocarcinoma (DU *et al.*, 2006), mieloma (DYBWAD *et al.*, 2003), fibrosarcoma (POPKOV *et al.*, 2000), coloretal (COOMBER e WARD, 2001), câncer gástrico (HU *et al.*, 2006), próstata e testículo (FOSSA *et al.*, 2004), entre outras.

A aplicação dos peptídeos expressos em fagos no câncer tem sido as mais variadas, dentre elas: mapeamento da diversidade tumoral (HANSEN *et al.*, 2001; DYBWAD *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2004) a seleção de peptídeos que inibem metástase (HU *et al.*, 2006), peptídeos miméticos de oncogenes (STEPHEN *et al.*, 1995; COOMBER e WARD, 2001), receptores vasculares (ZURITA *et al.*, 2003; ARAP *et al.*, 2002) e muitos peptídeos relacionados a fatores de crescimento (CAMPA *et al.*, 2002, HETIAN *et al.*, 2002). Os peptídeos selecionados podem ser utilizados de diversas maneiras, inclusive no tratamento do câncer através do endereçamento vascular dos peptídeos (NILSSON *et al.*, 2000) e de alvos em imunoterapia (POPKOV *et al.*, 2000).

Em 1990, foram obtidos os primeiros fragmentos de anticorpos expressos em fagos, tratando-se de uma das técnicas mais poderosas na seleção de anticorpos recombinantes (MCCAFFERTY *et al.* 1996). Nesse sentido, a técnica de *Phage Display* pode ser usada: (1) na geração de anticorpos monoclonais para imunoterapia, (2) no isolamento de anticorpos a partir de pacientes exposto a um determinado patógeno e (3) no estudo de anticorpos autoimunes (AZZAZY e HICHSMITH, 2002).

Os anticorpos expressos na superfície de fagos possibilitam a seleção de sequências baseadas em sua afinidade de ligação a uma molécula alvo (antígeno) por um processo de seleção *in vitro*. Em um ciclo de seleção, as moléculas de anticorpos em solução são incubadas com a molécula alvo. Os fagos contendo anticorpos com afinidades pelo alvo são capturados e permanecem ligados; já os fagos não ligados (não específicos) são eliminados por sucessivas lavagens. O *pool* de fagos ligados ao alvo é então eluído e amplificado (amplificados em *E. coli*). Os fagos resultantes deste processo são titulados e submetidos a uma nova seleção (ligação ao alvo, eluição e amplificação), visando obter anticorpos mais específicos. Após três ou quatro repetições deste processo, clones individuais são submetidos a ensaios imunológicos e suas sequências de DNA podem ser obtidas por sequenciamento (BARBAS *et al.* 2001).

Atualmente, a maioria das bibliotecas é construída no formato scFv. Contudo, esses fragmentos tendem a formar dímeros, por meio de um mecanismo sem qualquer possível predição. As moléculas de anticorpos multiméricas se ligam mais fortemente a um antígeno imobilizado, o que lhe confere uma maior avidéz. Contudo, tornam-se necessários trabalhos adicionais para a individualização dos clones com o intuito de se analisar sua real afinidade. Os fragmentos do tipo Fab, além de mais estáveis, ocorrem em formatos monoméricos, o que permite uma rápida triagem de clones baseada, impreterivelmente, em sua afinidade ao antígeno estudado (DE HAARD *et al.*, 1999).

A exposição de anticorpos em fagos tem se transformado em uma técnica bem aceita e, num pequeno espaço de tempo, tem gerado moléculas de altíssima qualidade. Anticorpos derivados por *Phage Display* têm provado sua segurança e

eficácia em testes clínicos. Processos de seleção adaptados a essa técnica, em combinação com anticorpos de fácil montagem, abrem amplamente as portas para desenvolvimento sofisticado de anticorpos como medicamentos. Em adição, estes anticorpos selecionados por *Phage Display* oferecem maiores vantagens em termos de velocidade e rendimento para pesquisa e identificação/validação de alvos. *Phage Display* é uma moderna ferramenta na descoberta de novas drogas (KRETZSCHMAR e VON RÜDEN, 2002).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, N.; OLIVA, K.T.; BARKER, G.; HOFFMANN, P.; REEVE, S.; SMITH, I.A.; QUINN, M.A.; RICE, G.E. Proteomic tracking of serum protein isoforms as screening biomarkers of ovarian cancer. *Proteomics*, v. 5, n.17, p. 4625-4636, 2005.

AMERICAN CANCER SOCIETY. *Cancer Facts & Figures 2010*. Atlanta: American Cancer Society; 2010.

ARAP, W.; KOLONIN, M.G.; TREPEL, M.; LAHDENRANTA, J.; CARDO-VILA, M.; GIORDANO, R.J.; MINTZ, P.J.; ARDELT, P.U.; YAO, V.J.; VIDAL, C.I.; CHEN, L.; FLAMM, A.; VALTANEN, H.; WEAVIND, L.M.; HICKS, M.E.; POLLOCK, R.E.; BOTZ, G.H.; BUCANA, C.D.; KOIVUNEN, E.; CAHILL, D.; TRONCOSO, P.; BAGGERLY, K.A.; PENTZ, R.D.; DO, K.A.; LOGOTHETIS, C.J.; PASQUALINI, R. Steps toward mapping the human vasculature by Phage Display. *Nat. Med.*, v. 8, n. 2, p. 121-127, 2002.

AUERSPERG, N.; EDELSON, M.I.; MOK, S.C.; JOHNSON, S.W.; HAMILTON, T.C. The biology of ovarian cancer. *Semin Oncol*; v. 25, p. 281-304, 1998.

AUERSPERG, N.; WONG, A.S.; CHOI, K.C.; KANG, S.K.; LEUNG, P.C. Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocr Rev*; v. 22, p. 255-88, 2001.

AUSTRALIAN INSTITUTE OF HEALTH AND WELFARE & NATIONAL BREAST AND OVARIAN CANCER CENTRE 2010. Ovarian cancer in Australian: an overview, *Cancer series*, n. 52, 2010.

AZZAZY, H.M.; HIGHSMITH, W.E.Jr. Phage Display technology: clinical applications and recent innovations. *Clin. Biochem*, v. 35, p. 425-45, 2002.

BARBAS, C.F.; BURTON, D.R.; SCOTT, J.K.; SILVERMAN, G.J. *Phage Display: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001.

BARNES M. N.; GRIZZLE, W.E.; GRUBBS, C.J.; EDWARD E. PARTRIDGE *et al.*, Paradigms for Primary Prevention of Ovarian Carcinoma. *CA Cancer J. Clin.*, v. 52, n.4, p. 216-225, 2002.

BARRY, M.A.; DOWER, W.J.; JOHNSTON, S.A. Toward cell-targeting gene therapy gene therapy vectors: selection of cells-binding peptides from random peptide-presenting phage libraries. *Nat. Med.*, v. 2, p. 299-305, 1996.

BAST, R.C.JR.; FEENEY, M.; LAZARUS, H.; NADLER, L.M.; COLVIN, R.B.; KNAPP, R.C. Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *J. Clin. Invest.* v. 68, n. 5, p. 1331-7, 1981.

BAST, R.C.JR.; KLUG, T.L.; ST JOHN, E.; JENISON, E.; NILOFF, J.M.; LAZARUS, H.; BERKOW-ITZ, R.S.; LEAVITT, T.; GRIFFITHS, C.T.; PARKER, L.; ZURAWSKI, V.R.JR.; KNAPP, R.C. A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med*, v. 309, p. 883-887, 1983.

BAST, R.C.JR.; BADGWELL, D.; LU, Z.; *et al.* New tumor markers: CA125 and beyond. *Int J Gynecol Cancer*.; v.15, n.3, p. 274, 2005.

BELISLE, J.A.; GUBBELS, J.A.; RAPHAEL, C.A.; MIGNEAULT, M.; RANCOURT, C.; CONNOR, J.P.; PATANKAR, M.S. Peritoneal natural killer cells from epithelial ovarian cancer patients show an altered phenotype and bind to the tumour marker MUC16 (CA125). *Immunology*, v. 122, n. 3, p. 418-29, 2007.

BELL, D. A. Origins and molecular pathology of ovarian cancer. *Mod. Pathol.* v. 18, p. 19-32, 2005.

BOMAN, F.; BUISINE, M.P.; WACRENIER, A.; QUERLEU, D.; AUBERT, J.P.; PORCHET, N. Mucin gene transcripts in benign and borderline mucinous tumours of the ovary: an in situ hybridization study. *J Pathol.* v. 193, n. 3, p. 339-44, 2001.

BORGONO, C.A.; KISHI, T.; SCORILAS, A. HARBECK, N.; DORN, J.; SCHMALFELDT, B.; SCHMITT, M.; DIAMANDIS, E. P. Human kallikrein 8 protein is a favorable prognostic marker in ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, v.12, n.5, p. 1487-1493, 2006.

BORYSOWSKI, J.; GORSKI, A. Phage-display technology and its application to experimental oncological therapy. *Postepy. Hig. Méd. Dosw*, v. 58, p. 100-107, 2004.

BRÍGIDO, M.M.; MARANHÃO, A.Q. Phage Display Libraries. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v. 26, p.46-51, 2002.

CAMPA, M.J.; SERLIN, S.B.; PATZ JR.; E.F. Development of novel tumor imaging agents with phage-display combinatorial peptide libraries. *Acad. Radiol.*, v. 9, n. 8, p. 927-932, 2002.

CÂNCER NO BRASIL: DADOS DOS REGISTROS DE BASE POPULACIONAL. Instituto Nacional de Câncer, v. IV, 2010.

CHANG, K.; PASTAN, I. Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 93, p.136-140, 1996.

CHATTERJEE, M.; FOON, K.; KOHLER, H. Idiotypic antibody immunotherapy of cancer. *Cancer Immunol. Immunother.*, v. 38, p. 75-82, 1994.

- CHAUHAN, S.C.; SINGH, A.P.; RUIZ, F.; JOHANSSON, S.L.; JAIN, M.; SMITH, L.M.; MONIAUX, N.; BATRA, S.K. Aberrant expression of MUC4 in ovarian carcinoma: diagnostic significance alone and in combination with MUC1 and MUC16 (CA125). *Mod Pathol*, v.19, n.10, p.1386-94, 2006.
- CHU, C.S.; RUBIN, S.C. Screening for ovarian cancer in the general Population. *Best Pract. Res Clin Obstet Gynecol*, v. 20, p.307-320, 2006.
- CHRISTOPHER, A.E.; AKINYINKA, O.O; TAMME, G.; AKIN-TUNDE, O.; MATHIAS, W.B. Preoperative evaluation and triage of women with suspicious adnexal masses using risk of malignancy index. *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, v. 35, p.131–138, Feb., 2009.
- COLIVA, A.; ZACCHETTI, A.; LUISON, E.; TOMASSETTI, A.; BONGARZONE, I.; SEREGNI, E.; BOMBARDIERI, E.; MARTIN, F.; GIUSSANI, A.; FIGINI, M.; CANEVARI, S. 90Y Labeling of monoclonal antibody MOV18 and preclinical validation for radioimmunotherapy of human ovarian carcinomas. *Cancer Immunol Immunother*, v. 54, p.1200-1213, 2005.
- COOMBER, D.W.; WARD, R.L. Isolation of human antibodies against the central DNA binding domain of p53 from an individual with colorectal cancer using antibody Phage Display. *Clin. Cancer. Res.*, v. 7, n. 9, p. 2802-2808, 2001.
- CONSENSO SOBRE CANCROS DO COLO, CORPO DO ÚTERO E OVÁRIO. Sociedade Portuguesa de Ginecologia, 2003. Disponível em <http://www.spginecologia.pt/uploads/cancro_colo.pdf>. Acessado em: 15 feb. 2011.
- DALY, M.; OBRAMS, G.I. Epidemiology and risk assessment for ovarian cancer. *Semin Oncol*; v. 25, p. 255–64, 1998.
- DE HAARD, H. J.; VAN NEER, N.; REURS, A.; HUFTON, S. E.; ROOVERS, R. C.; HENDERIKX, P.; DE BRUÏNE, A. P.; ARENDS, J. W.; HOOGENBOOM, H. R. A large non-immunized human Fab fragment Phage Library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 274, n. 26, p. 18218-18230, 1999.
- DISIS, M.L.; GOODELL, V.; SCHIFFMAN, K.; KNUTSON, K.L. Humoral epitope-spreading following immunization with a HER-2/neu peptide based vaccine in cancer patients. *J Clin Immunol*, v. 24, p. 571-578, 2004.
- DU, B.; QIAN, M.; ZHOU, Z.; WANG, P.; WANG, L.; ZHANG, X.; WU, M.; ZHANG, P.; MEI, B. In vitro panning of a targeting peptide to hepatocarcinoma from a *Phage Display* peptide library. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 342, n. 3, p. 956-962, 2006.

DYBWAD, A.; LAMBIN, P.; SIOUD, M.; ZOUALI, M. Probing the specificity of human myeloma proteins with a random peptide phage library. *Scand. J. Immunol.*, v. 57, n. 6, p. 583-590, 2003.

EHLEN, T.G.; HOSKINS, P.J.; MILLER, D.; WHITESIDE, T.L.; NICODEMUS, C.F.; SCHULTES, B.C.; SWENERTON, K.D. A pilot phase 2 study of oregovomab murine monoclonal antibody to CA125 as an immunotherapeutic agent for recurrent ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*, v.15, p.1023-1034, 2005.

FEELEY, K.M.; WELLS, M. Precursor lesions of ovarian epithelial malignancy. *Histopathology*; v.38, p. 87-95, 2001.

FENG, H.; GHAZIZADEH; KONISHI, H.; ARAKI, T. Expression of MUC1 and MUC2 gene products in human ovarian carcinomas. *Jpn J Clin Oncol*, v. 32, p. 525-29, 2002.

FOSSA, A.; ALSOE, L.; CRAMERI, R.; FUNDERUD, S.; GAUDERNACK, G.; SMELAND, E.B. Serological cloning of cancer/testis antigens expressed in prostate cancer using cDNA phage surface display. *Cancer. Immunol. Immunother.* v. 53, n. 5, p. 431-438, 2004.

FRIEDLANDER, M.L. Prognostic factors in ovarian cancer. *Semin Oncol*; v. 25: p. 305-14, 1998.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. Tratado de Histologia em cores. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 456 p.

GIMBA, E.R.P.; FRANCO V. Câncer Ginecológico. In: Carlos Gil Ferreira; José Cláudi Casali. (Org.). *Oncologia Molecular*. 2ª edição. Rio de Janeiro: Atheneu Rio, 2010. 7000p.

GIUNTOLI R.L. *et al.* Mucin gene expression in ovarian cancers. *Cancer Res*; v. 58, p. 5546-50, 1998.

GOONEWARDENE, T.I.; HALL, M.R.; RUSTIN, G.J. Management of asymptomatic patients on follow-up for ovarian cancer with rising CA-125 concentrations. *Lancet Oncol*, v. 8, n. 9, p. 813-21, 2007.

GUBBELS, J.A.; BELISLE, J.; ONDA, M.; RANCOURT, C.; MIGNEAULT, M.; HO, M.; BERA, T.K.; CONNOR, J.; SATHYANARAYANA, B.K.; LEE, B.; PASTAN, I.; PATANKAR, M.S. Mesothelin-MUC16 binding is a high affinity, N-glycan dependent interaction that facilitates peritoneal metastasis of ovarian tumors. *Mol Cancer*, v. 26, n. 5, p.50, 2006.

GUM, J.R.JR.; CRAWLEY, S.C.; HICKS, J.W.; SZYMKOWSKI, D.E.; KIM, Y.S. MUC17, a novel membrane-tethered mucin. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 291, n. 3, p. 466-75, 2002.

HASSAN, R.; REMALEY, A.T.; SAMPSON, M.L.; ZHANG, J.; COX, D.D.; PINGPANK, J.; ALEXANDER, R.; WILLINGHAM, M.; PASTAN, I.; ONDA, M. Detection and quantitation of serum mesothelin, a tumor marker for patients with mesothelioma and ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.*, v. 12, n. 2, p. 447-453, 2006.

HANSEN, M.H.; OSTENSTAD, B.; SIOUD, M. Identification of immunogenic antigens using a phage-displayed cDNA library from an invasive ductal breast carcinoma tumour. *Int. J. Oncol.*, v.19, n.6, p.1303-1309, 2001.

HAVRILESKY, L.J.; SANDERS, G.D.; KULASINGAM, S. *et al.* Development of an ovarian cancer screening decision model that incorporates disease heterogeneity: implications for potential mortality reduction. *Cancer*, v. 117, p. 545-53, 2011.

HEINTZ, A.P.M.; ODICINO, F.; MAISONNEUVE, P. *et al.* Report on the results of treatment in gynaecological cancer, volume 26: Carcinoma of the ovary. *Int J Gynaecol Obstet*; v. 95, p. 161–192, 2006.

HEINZELMANN-SCHWARZ, V.A.; GARDINER-GARDEN, M.; HENSHALL, S.M.; SCURRY, J.P.; SCOLYER, R.A.; SMITH, A.N.; BALI, A.; VANDEN, BERGH, P.; BARON-HAY, S.; SCOTT, C.; FINK, D.; HACKER, N.F.; SUTHERLAND, R.L.; O'BRIEN, P.M. A distinct molecular profile associated with mucinous epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer*, v. 27, n. 94, p. 904-13, 2006.

HETIAN, L.; PING, A.; SHUMEI, S.; XIAOYING, L.; LUOWEN, H.; JIAN, W.; LIN, M.; MEISHENG, L.; JUNSHAN, Y.; CHENGCHAO, S. A novel peptide isolated from a Phage Display library inhibits tumor growth and metastasis by blocking the binding of vascular endothelial growth factor to its kinase domain receptor. *J. Biol. Chem.*, v. 277, n. 45, p. 43137-43142, 2002.

HOGDALL, E. Cancer antigen 125 and prognosis. *Curr Opin Obstet Gynecol*, v. 20, p. 4-8, 2008.

HU, S.; GUO, X.; XIE, H.; DU, Y.; PAN, Y.; SHI, Y.; WANG, J.; HONG, L.; HAN, S.; ZHANG, D.; HUANG, D.; ZHANG, K.; BAI, F.; JIANG, H.; ZHAI, H.; NIE, Y.; WU, K.; FAN, D. Phage Display selection of peptides that inhibit metastasis ability of gastric cancer cells with high liver-metastatic potential. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 341, n. 4, p. 964-972, 2006.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Ministério da Saúde, INCA. Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/ovario>>. Acessado em: 23 feb. 2011.

JEFFERIS, R. What is an idiotype? *Immunol. Today*, v. 14, p. 119–121, 1993.

JEMAL A.; SIEGEL R.; WARD E.; MURRAY T.; XU J.; THUN M.J. Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin*; v. 57, p. 46-66, 2007.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; HAO, Y., XU, J.; THUN M.J. Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin*, v. 59; p. 225-249, 2009.

JEREMY, C. *et al.*, Analysis of gene expression in stage I serous tumors identifies critical pathways altered in ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, v. 114; p. 3–11, 2009.

JERNE, N.K. Towards a network theory of the immune system. *Ann. Immunol.*, v. 125, p. 373–389, 1974.

KENEMANS, P. CA 125 and OA 3 as target antigens for immunodiagnosis and immunotherapy in ovarian cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, v. 36, p. 221-228, 1990.

KENEMANS, P.; VAN KAMP, G.J.; OEHR, P.; VERSTRAETEN, R.A. Heterologous double-determinant immunoradiometric assay CA 125 II: reliable second-generation immunoassay for determining CA 125 in serum. *Clin Chem*, v. 39, p.2509-2513, 1993.

KIM, J.H.; SKATES, S.J.; UEDE, T.; WONG, K.K.; SCHORGE, J.O.; FELTMATE, C.M.; BERKOWITZ, R.S.; CRAMER, D.W.; MOK, S.C. Osteopontin as a potential diagnostic biomarker for ovarian cancer. *JAMA.*, v. 287, n. 13, p. 1671-9, 2002.

KIRBY, T.O.; HUH, W.; ALVAREZ, R. Immunotherapy of ovarian cancer. *Exp. Opin. Biol. Ther.*, v. 2, p. 409-417, 2002.

KING, M.C.; MARKS, J.H.; MANDELL, J. Breast and Ovarian Cancer Risks Due to Inherited Mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science*, v. 302, n. 5645, p. 643-646, 2003.

KOZAK, K.R.; AMNEUS, M.W.; PUSEY, S.M.; *et al.* Identification of biomarkers for ovarian cancer using strong anion-exchange ProteinChips:potential use in diagnosis and prognosis. *PNAS*, v. 100, n. 21, p.12343-8, 2003.

KRETZSCHMAR T, VON RÜDEN T. Antibody discovery: phage display. *Curr Opin Biotechnol.* , v. 13, n. 6, p. 598-602, 2002.

KUSNETZOFF, D.; GNOCHI, D.; DAMONTE, C.; SANNES, C. Differential diagnosis of pelvic masses: Usefulness of CA-125, transvaginal sonography and echo-Doppler. *Int J Gynecol Cancer*; v. 8, p. 315–321, 1998.

KURJAK, A.; KUPESIC, S.; ANIC, T.; KOSUTA, D. Three dimensional ultrasound and power Doppler improve the diagnosis of ovarian lesions. *Gynecol Oncol*; v. 76, p. 28-32, 2000.

LABBOK, M.H. Effects of breastfeeding on the mother. *Pediatr. Clin. North. Am.* v. 48, p.143-58, 2001.

LANDIS, S.H.; MURRAY, T.; BOLDEN, S.; WINGO, P.A. Cancer statistics, 1999. *CA Ca-A Cancer J Clin*, v. 49, p. 8-31, 1999.

LERNER, J.P.; TIMORTRITSCH, I.E.; FEDERMAN, A.; ABRAMOVICH, G. Transvaginal ultrasonographic characterization of ovarian masses with an improved, weighted scoring system. *Am J Obstet Gynecol.*, v.170, p. 8115, 1994.

LIU, B.; CONRAD, F.; COOPERBERG, M.R.; KIRPOTIN, D.B.; MARKS, J.D. Mapping Tumor Epitope Space by Direct Selection of Single-Chain Fv Antibody Libraries on Prostate Cancer Cells. *Cancer Research.*, v. 64, p. 704-710, 2004.

LIU, B.; NASH, J.; RUNOWICZ, C.; SWEDE, H.; STEVENS, R.; LI, Z. Ovarian cancer immunotherapy: opportunities, progresses and challenges. *Journal of Hematology & Oncology*, v. 3, p.7, 2010.

LYNCH, H.T.; CASEY, M.J.; SHAW, T.G.; LYNCH, J.F. Hereditary factors in gynecologic cancer. *Oncologist*; v. 3, n. 5, p. 319-38, 1998.
Makowski, L. Structural constraints on the display of foreign peptides on filamentous bacteriophages. *Gene*, v. 128, p. 5-11, 1993.

McCAFFERTY, J.; HOOGENBOOMN, H. R.; CHISWELL, D. J. Antibody Engineering, A Practical Approach. 1 ed., Oxford: Oxford Univ. Press, 1996.

MARKMAN, M. Optimizing primary chemotherapy in ovarian cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*, v.17, p. 957-68, 2003.

McINTOSH, M.W.; DRESCHER, C.; KARLAN, B.; SCHOLLER, N.; URBAN, N.; HELLSTROM, K.E.; HELLSTROM, I. Combining CA 125 and SMR serum markers for diagnosis and early detection of ovarian carcinoma. *Gynecol. Oncol*, v. 95, p. 9-15, 2004.

MOK, S.C.; CHAO, J.; SKATES, S.; WONG, K.; YIU, G.K.; MUTO, M.G.; BERKOWITZ, R.S.; CRAMER, D.W. Prostatein, a potential serum marker for ovarian cancer: identification through microarray technology. *J. Natl. Cancer. Inst.* v. 93, n.19, p. 1458-64. 2001.

MURDOCH, W.J.; VAN KIRK, E.A.; SMEDTS, A.M. Complement-inhibiting effect of ovarian cancer antigen CA-125. *Cancer Lett*, v. 8, n. 236, p. 54-7, 2006.

NAROD, S.A. Modifiers of risk of hereditary breast and ovarian cancer. *Nature Review Cancer*, v. 2, p.113-123, 2002.

NAROD, S.A.; BOYD, J. Current understanding of the epidemiology and clinical implications of BRCA1 and BRCA2 mutations for ovarian cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol*, v.14, p. 19-26, 2002.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. 2011. University of Bonn, Medical Center. Prevention of ovarian cancer. Disponível em: <<http://www.meb.uni-bonn.de/cancer.gov>>. Acessado em: 21 feb. 2011.

NILSSON, F.; TARLI, L.; VITI, F.; NERI, D. The use of Phage Display for the development of tumour targeting agents. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, v. 43, n. 2-3, p. 165-196, 2000.

NOSSOV, V.; AMNEUS, M.; SU, F.; *et al.* The early detection of ovarian cancer: from traditional methods to proteomics. Can we really do better than serum CA-125? *Am J Obstet Gynecol*, v. 199, p. 215-23, 2008.

NUSTAD, K.; BAST, R.C.Jr; BRIEN, T.J.; NILSSON, O.; SEGUIN, P.; SURESH, M.R.; SAGA, T.; NOZAWA, S.; BORMER, O.P.; DE BRUIJN, H.W.; NAP, M.; VITALI, A.; GADNELL, M.; CLARK, J.; SHIGEMASA, K.; KARLSSON, B.; KREUTZ, F.T.; JETTE, D.; SAKAHARA, H.; ENDO, K.; PAUS, E.; WARREN, D.; HAMMARSTROM, S.; KENEMANS, P.; HILGERS, J. Specificity and affinity of 26 monoclonal antibodies against the CA 125 antigen: first report from the ISOBM TD-1 work-shop. International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. *Tumour Biol*, v.17, p.196-219, 1996.

OBERST, M.D.; JOHNSON, M.D.; DICKSON, R.B.; LIN, C.Y.; SINGH, B.; STEWART, M.; WILLIAMS, A.; AL-NAFUSSI, A.; SMYTH, J.F.; GABRA, H.; SELLAR, G.C. Expression of the serine protease matriptase and its inhibitor HAI-1 in epithelial ovarian cancer: correlation with clinical outcome and tumor clinicopathological parameters. *Clin. Cancer Res.*, v. 8, n. 4, p.: 1101-1107. 2002.

ODUNSI, K.; JUNGBLUTH, A.A.; STOCKERT, E.; QIAN, F.; GNJATIC, S.; TAMMELA, J.; INTENGAN, M.; BECK, A.; KEITZ, B.; SANTIAGO, D.; *et al*: NY-ESO-1 and LAGE-1 cancer-testis antigens are potential targets for immunotherapy in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res*, v. 63, p. 6076-6083, 2003.

ODUNSI, K.; SABBATINI, P. Harnessing the immune system for ovarian cancer therapy. *Am J Reprod Immunol*, v. 59, p. 62-74, 2008.

PATANKAR, M.S.; JING, Y.; MORRISON, J.C.; BELISLE, J.A.; LATTANZIO, F.A.; DENG, Y.; WONG, N.K.; MORRIS, H.R.; DELL, A.; CLARK, G.F. Potent suppression of natural killer cell response mediated by the ovarian tumor marker CA125. *Gynecol Oncol*, v. 99, n. 3, p. 704-13, 2005.

PASQUALINI, R.; RUOSLAHTI, E. Tissue targeting with phage peptide libraries. *Mol. Psychiatry*, v.1, p. 423, 1996.

PETRICON, E.F.; ARDEKANI, A.M.; HITT, B.A.; LEVINE, P.J.; FUSARO, V.A.; STEINBERG, S.M.; MILLS, G.B.; SIMONE, C.; FISHMAN, D.A.; KOHN, E.C.; LIOTTA, L.A. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet*. v. 359, n. 9306, p. 572-7, 2002.

PFISTERER, J.; DU BOIS, A.; SEHOULI, J.; LOIBL, S.; REINARTZ, S.; REUSS, A.; CANZLER, U.; BELAU, A.; JACKISCH, C.; KIMMIG, R.; WOLLSCHLAEGER, K.; HEILMANN, V.; HILPERT, F. The anti-idiotypic antibody abagovomab in patients with recurrent ovarian cancer. A phase I trial of the AGO-OVAR. *Ann Oncol*. v. 17, n. 10, p.1568-77, 2006.

POPKOV, M.; SIDRAC-GHALI, S.; ALAKHOV, V.; MANDEVILLE, R. Epitope-specific antibody response to HT-1080 fibrosarcoma cells by mimotope immunization. *Clin. Cancer. Res*, v. 6, n. 9, p. 3629-35, 2000.

RODI, D.J.; MAKOWSKI, L. Phage-display technology-finding a needle in a vast molecular haystack. *Curr. Opin. Biotechnol*, v.10, p. 87-93, 1999.

RANGEL, L.B.; SHERMAN-BAUST, C.A.; WERNYJ, R.P.; SCHWARTZ, D.R.; CHO, K.R.; MORIN, P.J. Characterization of novel human ovarian cancer-specific transcripts (HOSTs) identified by serial analysis of gene expression. *Oncogene*, v. 16, n. 22, p.7225-32, 2003.

REA, M.F. Os benefícios da amamentação para a saúde da mulher. *J. Pediatr*. v. 80 (5), p.142-146, 2004.

REINARTZ, S.; BOERNER, H.; KOHLER, S.; VON RUCKER, A.; SCHLEBUSCH, H.; WAGNER, U. Evaluation of immunological responses in patients with ovarian cancer treated with the anti-idiotypic vaccine ACA125 by determination of intracellular cytokines: a preliminary report. *Hybridoma*, v. 18, p. 41-45, 1999.

REINARTZ, S.; KOHLER, S.; SCHLEBUSCH, H.; KRISTA, K.; GIFFELS, P.; RENKE, K.; HUOBER, J.; MOBUS, V.; KREIENBERG, R.; DUBOIS, A.; *et al.* Vaccination of patients with advanced ovarian carcinoma with the anti-idiotypic ACA125: immunological response and survival (phase Ib/II). *Clin Cancer Res*, v. 10, p.1580-1587, 2004.

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

RIES, L.A.G.; HARKINS, D.; KRAPCHO, M.; MARIOTTO, A.; MILLER, B.A.; FEUER, E.J.; CLEGG, L.; EISNER, M.P.; HORNER, M.J.; HOWLADER, N.; HAYAT, M.; HANKEY, B.F.; EDWARDS, B.K. (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2003, National Cancer Institute. Bethesda, MD, disponível em <http://seer.cancer.gov/csr/1975_2003/> Acessado em: 23 feb. 2011.

RUMP, A.; MORIKAWA, Y.; TANAKA, M.; MINAMI, S.; UMESAKI, N.; TAKEUCHI, M.; MIYAJIMA, A. Binding of ovarian cancer antigen CA125/MUC16 to mesothelin mediates cell adhesion. *J Biol Chem*, v. 279, n.10, p. 9190-8. 2004.

SCHLEBUSCH, H.; WAGNER, U.; GRÜNN, U.; SCHULTES, B. A monoclonal anti-idiotypic antibody ACA125 mimicking the tumor-associated antigen CA125 for immunotherapy of ovarian cancer. *Hybridoma*, v. 14, p. 167-174, 1995.

SCHOLLER, N.; CRAWFORD, M.; SATO, A.; DRESCHER, C.W.; O'BRIANT, K.C.; KIVIAT, N.; ANDERSON, G.L.; URBAN, N. Bead-based ELISA for validation of ovarian cancer early detection markers. *Clin. Cancer Res.*, v. 12, p., 2117-2124. 2006.

SCHORGE, J.O.; DRAKE, R.D.; LEE, H.; SKATES, S.J.; RAJANBABU, R.; MILLER, D.S.; KIM, J.H.; CRAMER, D.W.; BERKOWITZ, R.S.; MOK, S.C. Osteopontin as an adjunct to CA125 in detecting recurrent ovarian cancer. *Clin. Cancer Res*, v. 10, p. 3474-3478, 2004.

SCULLY, R.E.; BONFIGLIO, T.A.; KURMAN, R.J. *et al.* International Histological Classification of Tumors Histological Typing of Female Genital Tract Tumours. World Health Organization (WHO), 2. ed. Berlin: Springer-Verlag 1994, 39-4.

SHIH, I.; KURMAN, R.J. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol*, v.164, p.1511-1518, 2004.

SINGH, A.P.; MONIAUX, N.; CHAUHAN, S.C.; MEZA, J.L.; BATRA, S.K. Inhibition of MUC4 expression suppresses pancreatic tumor cell growth and metastasis. *Cancer Res*, v. 64, n.2, p. 622-30, 2004.

SMITH, G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, v. 228, p. 1315-7, 1985.

STEPHEN, C.W.; HELMINEN, P.; LANE, D.P. Characterisation of epitopes on human p53 using phage-displayed peptide libraries: insights into antibody-peptide interactions. *J. Mol. Biol.*, v. 248, p. 58-78, 1995.

TERRY, K.L.; SLUSS, P.M.; SKATES, S.J.; MOK, S.C.; YE, B.; VITONIS, A.F.; CRAMER, D.W. Blood and urine markers for ovarian cancer: a comprehensive review. *Dis. Markers*. v. 20, n. 2, p. 53-70, 2004.

TNM: CLASSIFICAÇÃO DE TUMORES MALIGNOS / traduzido por Ana Lúcia Amaral Eisenberg. 6. ed. - Rio de Janeiro: INCA, 2004. 254p.

TORTORA, G.J. Corpo Humano: Fundamentos de Anatomia e Fisiologia. 4. ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul. 2000. 574 p.

VAUGHAN, H. The humoral immune response to head and neck cancer antigens as defined by the serological analysis of tumor antigens by recombinant cDNA expression cloning. *Cancer Immunity*, v. 4, p. 5-20, 2004.

VLAD, A.M.; KETTEL, J.C.; ALAJEZ, N.M.; CARLOS, C.A.; FINN, O.J. MUC1 immunobiology: from discovery to clinical applications. *Adv Immunol*, v. 82, p. 249-293, 2004.

WAGNER, U.; SCHLEBUSCH, H.; KO ¨HLER, S.; SCHMOLLING, J.; GRU ¨NN, U.; KREBS, D. Immunological responses to the tumor-associated antigen CA125 in patients with advanced ovarian cancer induced by murine monoclonal anti-idiotypic vaccine ACA125. *Hybridoma*, v. 16, p. 33-40, 1997.

WAGNER, U. Immuntherapie des Ovarialkarzinoms mit dem monoklonalen Antiko ACA125: Ergebnisse der Phase Ib Studie. *GebFra*, v. 58, p. 180-186, 1998.

WAGNER, U.; KO ¨H.; BIRSACK, H. J.; MO ¨NN, U.; FISCHER, H. P.; SCHLEBUSCH, H.; ¨RPER ¨HLER, S.; REINARTZ, S.; GIFFELS, P.; HUOBER, J.; RENKE, K.; SCHLEBUSCH, ¨BUS, V.; KREIENBERG, R.; BAUKNECHT, T.; KREBS, D.; WALLWIENER, D. Immunological consolidation of ovarian carcinoma recurrences with monoclonal anti-idiotypic antibody ACA125: immune responses and survival in palliative treatment. *Clin. Cancer Res.*, v. 7, p. 1154-1162, 2001.

WANG, L., MA, J.; LIU, F.; YU, Q.; CHU, G.; PERKINS, A.C.; LI, Y. Expression of MUC1 in primary and metastatic human epithelial ovarian cancer and its therapeutic significance. *Gynecol Oncol*, v.105, p. 695-702, 2007.

ZHANG, L.; CONEJO-GARCIA, J.R.; KATSAROS, D.; GIMOTTY, P.A.; MASSOBRIO, M.; REGNANI, G.; MAKRIGIANNAKIS, A.; GRAY, H.; SCHLIENGER, K.; LIEBMAN, M.N.; *et al.* Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med*, v. 348, p. 203-213, 2003.

ZHANG, Z.; BAST, R.C.Jr.; YU, Y.; LI, J.; SOKOLL, L.J.; RAI, A.J.; ROSENZWEIG, J.M.; CAMERON, B.; WANG, Y.Y.; MENG, X.Y.; *et al.* Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Res*, v. 64, p. 5882–5890, 2004.

ZHU, H.; SNYDER, M. Protein arrays and microarrays. *Curr. Opin. Chem. Biol.* v. 5, p. 40-5, Feb, 2001.

ZURAWSKI, V.R.Jr., ORJASETER, H.; ANDERSEN, A.; *et al.* Elevated serum CA 125 levels prior to diagnosis of ovarian neoplasia: relevance for early detection of ovarian cancer. *Int J Cancer*; v.42, p. 677-80, 1988.

ZURITA, A.J.; ARAP, W.; PASQUALINI, R. Mapping tumor vascular diversity by screening Phage Display libraries. *J. Control. Release.*, v. 91, p. 183-186, 2003.

CAPÍTULO 2

**Moléculas Recombinantes Miméticas do CA125 e
de seu Auto-anticorpo Antiidiotipo e Implicações
na Resposta Imune do Câncer de Ovário**

RESUMO

O câncer de ovário é a neoplasia ginecológica mais frequente no mundo desenvolvido, que continua a matar mais mulheres do que todos os outros tipos de câncer ginecológicos juntos. A ausência de sinais e sintomas, aliada à falta de estratégias de rastreamento, contribuem para o diagnóstico tardio na maior parte das pacientes, resultando assim em baixas taxas de cura. A tecnologia de *Phage Display* permite a seleção de peptídeos e proteínas, incluindo anticorpos com alta afinidade e especificidade para vários alvos. As moléculas caracterizadas no presente estudo apresentam potencial como novas ferramentas tanto no diagnóstico clínico quanto na terapia do câncer de ovário, além de fornecer informações complementares aos parâmetros da rotina clínica utilizados atualmente. Nossa estratégia de *Phage Display* produziu, com sucesso, peptídeos miméticos a antígenos tumorais ovarianos, que foram capazes de discriminar tumores malignos de tumores benignos de ovário. Estes marcadores melhoram significativamente o valor diagnóstico do CA125. Finalmente, temos também produzido por *Phage Display*, anticorpos recombinantes Fab, ligantes específicos aos peptídeos miméticos e a antígenos tumorais ovarianos, que podem apresentar potencial papel imunoterapêutico no tratamento do câncer de ovário.

Palavras-chaves: *Phage Display*, peptídeos, câncer de ovário.

ABSTRACT

Ovarian cancer is the most common gynecologic cancer in the developed world, which continues to kill more women than all other gynecological cancers combined. The absence of signs and symptoms coupled with lack of screening strategies contribute to the late diagnosis in most patients, resulting in low cure rates. The Phage Display (PD) technology allows the selection of peptides and proteins including antibodies with high affinity and specificity for multiple targets. The molecules characterized in this study are potential new tools in both clinical diagnosis and therapy of ovarian cancer, and provide additional information to the parameters of the ongoing clinical routine. Our phage display strategy produced successful mimetic peptides to specific ovarian tumor antigens, which were able to discriminate malignant tumors from the benign ovarian disease. These markers have significantly improved the diagnostic value of the CA125. Finally, we have also generated through PD recombinant Fab antibodies that specifically bind to the mimetic peptides and to ovarian tumor antigens, which may present potential immunotherapeutic role in the ovarian carcinoma treatment.

Keywords: Phage display, peptides, ovarian cancer.

1 Introdução

Apesar do desenvolvimento de novas formas de tratamento e terapias destinadas a melhorar a taxa de sobrevivência das pacientes, o carcinoma ovariano continua a liderar as causas de óbito por tumores ginecológicos (JEMAL *et al.*, 2009).

Infelizmente, a maioria dos casos de câncer de ovário são diagnosticados nos estádios finais da doença, quando as taxas de sobrevida de cinco anos é reduzida em 20%. Menos de 25% dos casos são limitados ao ovário, com a maioria das pacientes com doença metastática e com uma piora do prognóstico (URBAN e DRESCHER, 2008).

A falta de sintomas é um dos fatores que mais contribuem para o fato de que apenas 25% dos tumores de ovário são identificados na fase inicial da doença (BADGWELL e BAST, 2007). Portanto, a detecção precoce e o diagnóstico diferencial entre o câncer de ovário e as massas pélvicas benignas são essenciais na melhora da sobrevida das pacientes. Como a maioria dos casos é diagnosticado em fases tardias da doença, poucas oportunidades de tratamento estão disponíveis (PARK *et al.*, 2011).

CA125 é o marcador mais comumente utilizado na detecção e monitoramento do câncer de ovário. No entanto, esta glicoproteína não é detectada em até 20% das pacientes com tumor maligno de ovário (ROSEN *et al.*, 2005) e sua concentração pode estar elevada em várias condições benignas ou malignas além do carcinoma ovariano (GOONEWARDENE *et al.*, 2007). Portanto, muitos estudos têm sido realizados para melhorar o desempenho de biomarcadores ou suas combinações no diagnóstico do câncer de ovário (HELLSTROM e HELLSTROM, 2008).

O uso de marcadores tumorais combinados pode detectar uma fração maior de casos de carcinoma ovariano epitelial, nos primeiros estádios da doença. Desta maneira, vários esforços têm sido realizados para identificar adjuntos para o CA125 (GILKS *et al.*, 2005).

Geralmente, o carcinoma ovariano epitelial apresenta um padrão único de progressão. Quando a massa tumoral cresce, a superfície externa do ovário é rompida e o câncer se estende até a região pélvica (AUERSPERG *et al.*, 2001). Esta evidência suporta a necessidade da descoberta de biomarcadores não invasivos que possam ser aplicados em estágio inicial da doença, para complementar os testes de diagnóstico, atualmente disponíveis (JACOBS *et al.*, 1993).

Peptídeos obtidos pela tecnologia de *Phage Display* podem exercer um efeito anticancerígeno por inibição de angiogênese, decréscimo na atividade metastática do tumor ou inibindo enzimas importantes para disseminação de células neoplásicas. Eles também podem ser usados como componentes de vacinas antitumor ou veículos para carrear citocinas e quimioterápicos. Essa tecnologia permite, ainda, o desenvolvimento de anticorpos recombinantes anticâncer (BORYSOWSKI e GORSKI, 2004). Esta tecnologia também pode ser utilizada na seleção de sequências de aminoácidos (mimetopos) que imitam epítomos de proteínas naturais reconhecidos por anticorpos específicos (CARDOSO *et al.*, 2009).

2 Objetivos Gerais

O presente trabalho teve como objetivo geral selecionar marcadores moleculares sorológicos para o diagnóstico do câncer de ovário, além de moléculas envolvidas na resposta imune das pacientes com carcinoma ovariano.

2.1 Objetivos Específicos

- Selecionar peptídeos miméticos às proteínas tumorais, ligantes a IgGs circulantes e teciduais de pacientes com câncer de ovário por *Phage Display*;
- Selecionar anticorpos recombinantes Fab ligantes aos peptídeos miméticos e antígenos tumorais de ovário;
- Testar o potencial diagnóstico dos clones selecionados no câncer de ovário.
- Analisar o papel imunoterapêutico dos clones selecionados e suas implicações na resposta imune das pacientes com carcinoma ovariano.

3 Material e Métodos

3.1 Obtenção das Amostras e Pacientes

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Genética e Bioquímica – Universidade Federal de Uberlândia em colaboração com Instituto Nacional de Câncer, Coordenação de Pesquisa, Divisão de Medicina Experimental e Biologia Celular. O Projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INCA (Processo nº 19/06). Todas as pacientes participantes assinaram Termo de Consentimento. As técnicas de manipulação dos materiais biológicos seguiram normas do Código de Ética em Pesquisa com Humanos (Resolução CNS Nº 196/96). As pacientes foram identificados por seus números de prontuários.

As amostras de soro e tecido foram coletadas no Instituto Nacional de Câncer, de maio de 2006 a janeiro de 2008. As amostras tumorais foram obtidas a partir de pacientes submetidas à ressecção da lesão tumoral do ovário. A histologia das amostras de tecido das pacientes e algumas características das amostras são apresentadas nas Tabelas 1 e 2.

Foram obtidas 41 amostras de soro de mulheres com confirmação histológica para câncer de ovário, as quais foram classificadas de acordo com a International Federation of Gynecology and Obstetric, FIGO (1971) em estadiamento de I a IV, conforme mostra a Tabela 1. Também foram obtidas 28 amostras de soro de pacientes com massas pélvicas benignas confirmadas histologicamente e 10 amostras de soro de pacientes cujos ovários, após avaliação histopatológica, foram negativos para células tumorais. Estas amostras foram obtidas de pacientes submetidas à histerectomia ou anexectomia devido a outros tumores ginecológicos, como tumores do endométrio, do colo do útero, tumores de útero ou de um cisto folicular ovariano. A média de idade para a população com tumores malignos era de 55,3 anos, sendo a paciente mais velha e a mais nova com 90 e 26 anos de idade, respectivamente.

Tabela 1: Características das amostras utilizadas nos experimentos. Classificação das amostras em malignas, borderline (com baixo potencial maligno) e casos benignos.

VARIÁVEIS	Maligno n (%)	Borderline n (%)	Benigno n (%)
Número de casos	31 (44,9)	10 (14,5)	28 (40,5)
estadio I	14 (45,2)	8 (80,0)	
Ia	7 (50,0)	8 (100)	
Ib	1 (7,1)		
Ic	6 (42,8)		
estadio II	2 (6,4)	1 (10,0)	
IIa	1 (50,0)		
IIb	1 (50,0)	1 (100)	
IIc			
estadio III	13 (41,9)	1 (10,0)	
IIIa		1 (100)	
IIIb			
IIIc	13 (100,0)		
estadio IV	2 (6,4)	0	
Idade em anos (média)	55,3	48,5	46,89

As amostras de tumores malignos ainda foram classificadas em casos malignos (44,9%) e casos borderline (14,5%), sendo estas últimas aquelas que apresentam um baixo potencial maligno. Os casos benignos representam 40,5% do total de amostras (Tabela 1).

Todas as amostras incluídas neste estudo tiveram seus tipos histopatológicos e subtipos histológicos listados na Tabela 2.

Tabela 2: Diagnóstico histológico das massas pélvicas.

Tipos Histopatológicos	n (%)	Subtipos Histológicos	n (%)
Tumores Malignos	31 (100,0)		
epitelial	24 (77,4)	célula da granulosa	4 (12,9)
estromal	6 (19,3)	mucinoso	2 (6,4)
germinativo	1 (3,2)	seroso	2 (6,4)
		seroso-papilífero	12 (38,7)
		epitelial misto	3 (9,6)
		endometrióide	2 (6,4)
		células claras	1 (3,2)
		não definido	5 (16,1)
Tumores Borderlines	10 (100,0)	mucinoso	6 (60,0)
		seroso	3 (30,0)
		seroso-papilífero	1 (10,0)
Tumores Benignos	28 (100,0)	mucinoso	5 (17,8)
		estromal	7 (25,0)
		seroso	8 (28,5)
		germinativo	5 (17,8)
		endometrioma	2 (7,1)
		brenner	1 (3,5)

3.2 Extração de Proteínas Totais

Para extração de proteínas totais foram utilizadas 05 amostras de tecidos ovarianos, classificadas como tumores malignos epiteliais de ovário nos estadiamentos III e IV, obtidas de pacientes submetidas à ressecção da lesão tumoral do ovário.

Amostras com aproximadamente 20mg de ovário de cada paciente foram trituradas com um homogenizador elétrico em 800µL de tampão (400mM NaCl; 25mM EDTA pH 8,0; 50mM Tris pH 7,5; 2% SDS). Para preservação da integridade das proteínas foram adicionados os inibidores de protease: 10µL de benzamidina (100mM) e 3µL de PMSF (150mM). As amostras foram então incubadas a 37°C por 15 minutos e em seguida adicionou-se 300µL de solução saturada de NaCl e novamente incubou-se por 15 minutos a -20°C.

Após o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas a 15000rpm a 4°C por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e as proteínas precipitadas foram ressuspensas em tampão fosfato salino (PBS). Após a extração, as proteínas extraídas das pacientes individualmente foram reunidas, quantificadas e

visualizadas em gel SDS-PAGE, 12% (p/v), realizado segundo Barbas *et al.* (2001). Os géis foram corados com coomassie-blue para visualização e análise da qualidade das proteínas resolvidas.

3.3 Purificação de IgGs com Microesferas Magnéticas

3.3.1 Purificação de IgGs de amostras sorológicas

Para purificação de IgGs foram utilizadas 20 amostras de soro, sendo 10 classificadas como tumores benignos de ovário e 10 como tumores malignos ovarianos nos estádios I, III e IV. Foram, ainda, utilizadas 10 amostras de soro de pacientes negativas para tumores ovarianos.

A purificação de IgGs foi feita por meio de microesferas magnéticas (beads magnéticos) acopladas com proteína G (Dynabeads-Invitrogen).

Para cada 2×10^9 partículas ou microesferas, adicionou-se 100uL de um *pool* de soros contendo amostras de pacientes diagnosticadas com tumores malignos de ovário, massas pélvicas benignas e pacientes controle (as quais não apresentavam tumores ovarianos), seguida da incubação por 40 minutos sob forte agitação à temperatura ambiente (T.A). Anteriormente à adição das amostras de soro, as microesferas foram lavadas três vezes com solução de ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico (MES) 0,1 M pH=5,0 para ativação das mesmas.

Transcorrido o tempo de incubação, as microesferas foram precipitadas por captura magnética em separador próprio. O sobrenadante foi descartado e lavou-se três vezes com tampão MES 1M, pH 5,0. Ao retirar o campo magnético, as IgGs foram eluídas com tampão citrato de sódio 1M pH 2-3 e o pH neutralizado com Tris 1M pH 9,1, separando as IgGs das microesferas magnéticas pela introdução dos tubos no separador magnético.

Para certificar-se da purificação, realizou-se ensaios de dot-blot com 2uL das amostras purificadas em membrana de nitrocelulose 0,22µm (Hybond ECL, Amersham Biosciences) dos diferentes grupos. Depois de bloqueadas em solução de BSA 5% em PBS 1X, as membranas foram incubadas por 1 hora a 37°C com

anti-IgG (VH+VL, Sigma) humana diluído na proporção 1:5000 na solução de bloqueio. Após a incubação, o ensaio foi revelado com o substrato DAB (Sigma Fast™ DAB). Para parar a reação, a membrana foi lavada com água.

A dosagem das proteínas das amostras foi realizada pelo método descrito por Bradford (1976).

3.3.2 Purificação de IgGs de amostras teciduais

Para purificação de IgGs de amostras teciduais foram utilizadas proteínas totais extraídas de 05 amostras de tecido ovariano, classificadas como tumores malignos epiteliais de ovário nos estadiamentos III e IV, obtidas de pacientes submetidas à ressecção da lesão tumoral do ovário. O protocolo de purificação foi o mesmo citado anteriormente, utilizando 100µg/ml de proteínas totais.

3.4 Seleção dos Peptídeos Recombinantes Miméticos por *Phage Display*

3.4.1 Biopanning (seleção dos fagos)

Para a seleção dos peptídeos recombinantes miméticos a antígenos tumorais de câncer de ovário, foram realizadas duas estratégias distintas, conforme mostra a Figura 1. Em ambas as estratégias, foram utilizadas 5µl (1×10^{11} partículas virais) de duas diferentes bibliotecas de peptídeos randômicos fusionados em fagos: *Ph.D.-7 Heptapeptide Phage Display Library* (complexidade: $2,8 \times 10^9$ transformantes) e *Ph.D.-12 Peptide 12-mer Phage Display Library* (complexidade: $2,7 \times 10^9$ transformantes) Peptide Library Kits (New England Biolabs Inc.). As bibliotecas eram compostas de 7 e 12 aminoácidos randômicos respectivamente, seguidos por uma curta sequência espaçadora Gly-Gly-Gly fusionada à região N-terminal da Proteína III (pIII) de bacteriófagos filamentosos M13. Todas as cinco cópias da Proteína III dos fagos continham peptídeos amino-terminais.

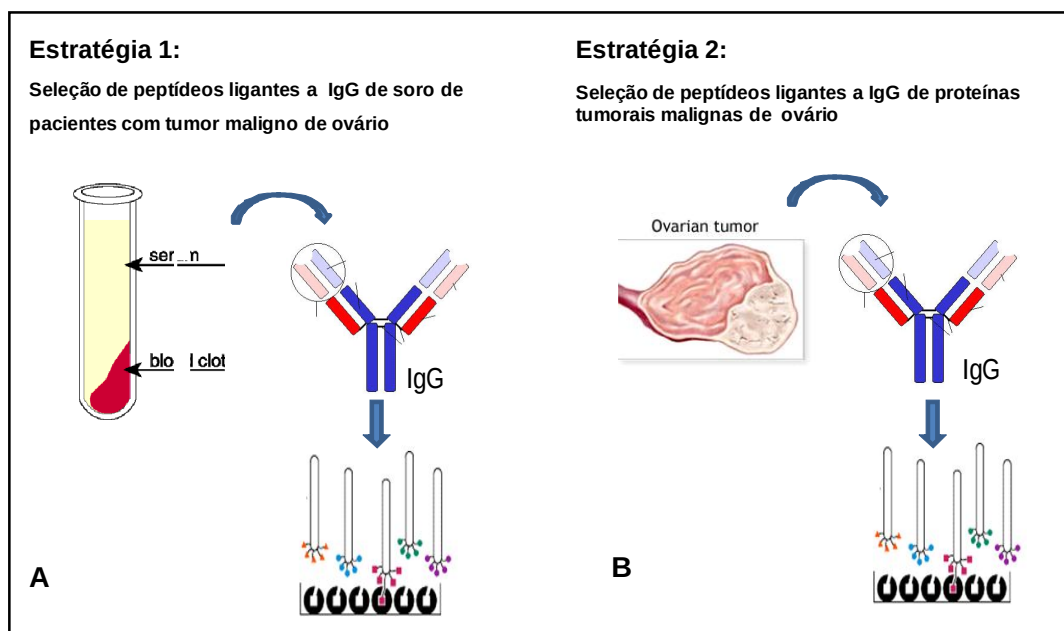


Figura 1: Esquema representativo da seleção de peptídeos miméticos a antígenos tumorais de carcinoma ovariano. **A:** Seleção de peptídeos ligantes a IgGs sorológicas de pacientes com tumores malignos de ovário. As bibliotecas de peptídeos randômicos fusionados em fagos *Ph.D.-7* e *Ph.D.-12* foram expostas às moléculas alvo – IgGs purificadas de soro de pacientes com tumores malignos de ovário. **B:** Seleção de peptídeos ligantes a IgGs de proteínas tumorais de pacientes com câncer de ovário. As bibliotecas de peptídeos randômicos fusionados em fagos *Ph.D.-7* e *Ph.D.-12* foram expostas às moléculas alvo – IgGs purificadas de proteínas tumorais malignas de ovário.

Dois poços de uma placa de microtitulação (*Corning Incorporated Costar*[®] 3591), sendo um para cada estratégia de seleção, foram previamente adsorvidos com 150µl de IgGs purificadas de soro de pacientes com câncer de ovário e 150µl de IgGs purificada de proteína total de tumores malignos ovarianos (100µg/mL em 0,1 M NaHCO₃, pH 8,6) por 16 horas (*overnight*) a 4°C sob leve agitação; bloqueada com 250µl de tampão de bloqueio (0,1M NaHCO₃, pH 8,6, 5mg/mL BSA) por 1 hora a 4°C; e lavada seis vezes com TBST (TBS contendo 0,1% Tween-20). Acrescentou-se, nos mesmos orifícios da placa, 5µl de cada biblioteca diluídos em 100µl de TBST, agitando-se por 1 hora à temperatura ambiente. Fagos não ligantes foram removidos por lavagem com TBST (0,1% Tween-20) por 10 vezes no primeiro ciclo de seleção e nos dois ciclos subsequentes com TBST (0,5% Tween-20). Foram realizados no total 3 ciclos de seleção.

Os fagos ligantes foram eluídos em duas etapas, como mostra a Figura 2. Primeiramente, realizou-se a eluição negativa na qual nos mesmos poços da placa adicionou-se 15µg de IgGs purificadas de soros de pacientes com tumores benignos de ovário e 15µg de IgGs purificadas de soros de pacientes controle, diluídos em TBS, em um volume final de 100µl, agitando-se por 1 hora a temperatura ambiente. A eluição negativa teve como objetivo retirar os fagos específicos a IgGs de amostras benignas e controle, que não eram alvos de nosso estudo. Posteriormente, os orifícios foram lavados 10 vezes com TBS (0,1% Tween-20) e prosseguiu-se com a eluição positiva, na qual os fagos ligantes foram eluídos por afinidade com 100µg de proteínas totais de tumores malignos de ovário, diluídos em TBS, em um volume final de 100µl, agitando-se por uma hora à temperatura ambiente. O eluato remanescente foi recolhido e utilizado na titulação e nos procedimentos de amplificação.

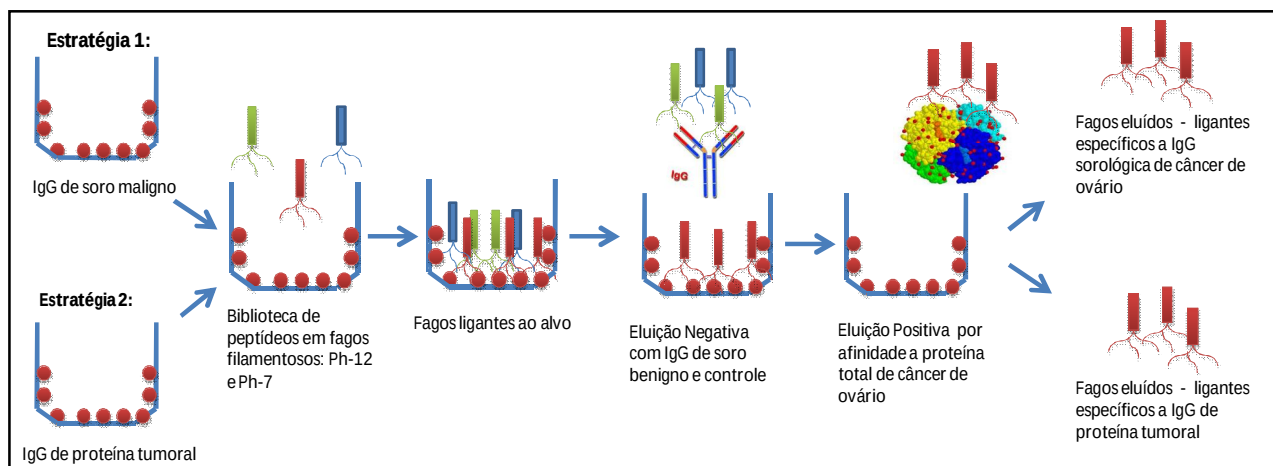


Figura 2: Esquema representativo da seleção de peptídeos miméticos a antígenos tumorais de câncer de ovário. Biblioteca de peptídeos em fagos filamentosos: *Ph-12* e *Ph-7* foram expostas às moléculas alvo. Os fagos ligantes foram eluídos negativamente com IgGs de soros de pacientes com tumores benignos e pacientes controle. Os fagos remanescentes e de interesse neste estudo foram eluídos e recuperados na eluição positiva por afinidade às proteínas totais de tumores malignos de ovário.

3.4.2 Amplificação e titulação dos fagos selecionados

Após a seleção, a amplificação dos fagos foi feita pela inoculação de um meio Luria Bertani (LB - Triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 10g/L), contendo tetraciclina (20mg/mL), com uma colônia isolada de *Escherichia coli* da linhagem ER2738. O meio foi incubado sob agitação a 37°C até a fase early-log ($OD_{600nm} \sim 0,3$).

Ao atingir esta fase, a cultura bacteriana foi inoculada com 90ul dos eluatos dos fagos e incubada a 37°C por 4-5 horas sob forte agitação. Em seguida, as culturas foram centrifugadas a 4°C a 10000rpm por 10 minutos e os sobrenadantes foram transferidos para um tubo esterilizado contendo uma solução de PEG/NaCl (20% de Polietilenoglicol 8000 e 2,5 M de NaCl – solução estéril) na quantidade de 1/6 do volume do sobrenadante. As soluções foram incubadas por 12-16 horas a 4°C para a precipitação do fago e centrifugadas a 10000rpm por 15 minutos a 4°C para descartar o sobrenadante. Os precipitados foram suspensos em 1mL de TBS e reprecipitados com 1/6 do volume de PEG/NaCl, por 1 hora no gelo. Centrifugou-se a 14000rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspensionado em 200uL de TBS a 0,02% de NaN_3 , obtendo-se, então, o eluato amplificado posteriormente titulado e armazenado a 4°C.

A titulação é um procedimento utilizado para determinar a quantidade de partículas virais durante entrada e saída de cada ciclo de seleção do *biopanning*. A solução de fagos foi submetida às diluições seriadas crescentes exponenciais sob log10 em meio LB. Para eluatos não amplificados de cada ciclo foram utilizadas as diluições de 10^1 até 10^4 . No caso das soluções com eluatos amplificados, a faixa de diluição utilizada foi entre 10^8 e 10^{11} . Para cada diluição, acrescentou-se 200μL da cultura de ER2738 na fase mid-log ($OD_{600nm} \sim 0,5$) e a solução foi agitada rapidamente e incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. As células bacterianas, agora infectadas, foram transferidas para tubos de cultura contendo 3mL de Ágar-Top a 45°C e espalhadas sobre uma placa de Petri contendo meio LB sólido, com IPTG/Xgal e tetraciclina (20mg/mL). As placas foram incubadas a 37°C, durante 16 horas e após este período, as colônias formadas nas placas foram contadas e quantificadas, multiplicando-se cada valor

obtido de colônias nas placas LB sólido pelo fator de diluição com intuito de obter o título dos fagos.

3.4.3 Extração de DNA dos fagos e sequenciamento

As colônias oriundas das placas tituladas do 3º ciclo de seleção foram isoladas e transferidas para poços de placas de cultura (tipo *deepwell*), contendo 1,2mL de cultura de ER2738 em fase *early-log* ($OD_{600nm} \sim 0,3$) para a extração do DNA dos fagos. A placa foi vedada com um adesivo perfurado e incubada a 37°C, por 24 horas, sob vigorosa agitação (250rpm). Para isolar os fagos das bactérias, as placas foram centrifugadas a 3700rpm, a 20°C, durante 30 minutos. Em seguida, 800µL do sobrenadante foram transferidos para outra placa e incubados, por 10 minutos, com 350µL de PEG/NaCl. Após o período de incubação, a placa foi centrifugada a 3700rpm, a 20°C, durante 40 minutos para precipitação dos fagos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 100µL de tampão iodeto (10mM de Tris-HCl pH 8,0, 1mM de EDTA e 4M de NaI) foram adicionados aos fagos precipitados. As placas foram agitadas vigorosamente por 40 segundos e 250µL de etanol absoluto foram acrescentados. Após uma incubação de 10 minutos, à temperatura ambiente, as placas foram centrifugadas (3700rpm, 20°C, 10 minutos) e o sobrenadante descartado. O DNA dos fagos foi lavado com 500µL de etanol a 70% e recentrifugado nas mesmas condições. Finalmente, o DNA precipitado remanescente foi diluído em 20µL de água Milli-Q. A qualidade do DNA fita simples foi verificada pela corrida eletroforética em gel de agarose 0,8% corado com solução de brometo de etídeo.

Nas reações de sequenciamento, foram utilizados 500ng de DNA molde, 5pmoles do *primer* -96 gIII (5'-OH CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3' - Biolabs) e Premix (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit – Amersham Biosciences). A reação de 35 ciclos foi realizada em um termociclador de placas (MasterCycler-Eppendorf) nas seguintes condições: desnaturação (a 95°C por 20 segundos); anelamento do *primer* (a 50°C por 15 segundos) e extensão (a 60°C por um minuto). A precipitação do DNA amplificado foi feito com 1µL de acetato de amônio e 27,5µL de etanol. Posteriormente, a placa foi centrifugada por 45

minutos, a 3700rpm e o sobrenadante descartado. Adicionou-se 150µL de etanol 70% ao DNA precipitado e centrifugou-se por 15 minutos, a 3700rpm. A solução de etanol foi descartada, a placa permaneceu invertida sobre um papel toalha e nesta posição foi pulsada a 800rpm durante um segundo. A placa foi coberta por papel alumínio e permaneceu em repouso durante 5 minutos para evaporar o etanol remanescente. Os precipitados resultantes foram ressuspensos em 10µL do tampão de diluição (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit – Amersham Biosciences). A leitura do sequenciamento foi realizada no sequenciador automático MegaBace 1000 (Amersham Biosciences).

3.4.4 Análises de Bioinformática

As sequências de DNA foram deduzidas pelo programa DNA2PRO12. Este programa é utilizado na dedução de sequências de insertos tanto de bibliotecas da New England Biolabs (*Ph.D.-12* ou *Ph.D.-7*) quanto de outras bibliotecas de interesse que contiverem as sequências inicial e final do vetor, no caso o bacteriófago M13. O programa automaticamente localiza a posição do inserto, traduz o mesmo e indica qualquer erro possível nas sequências de DNA, tais como códons inesperados ou erros na sequência próxima (<http://relic.bio.anl.gov/dna2pro12.aspx>).

As similaridades entre os peptídeos selecionados e as proteínas depositadas foram realizadas utilizando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), um conjunto de programas que comparam (alinham) as sequências a serem investigadas com todas as depositadas nos bancos de dados de ácidos nucleicos e proteínas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Dentro do Blast a busca foi realizada no “Protein blast” utilizando como database o “swissprot protein sequences (swissprot)”, algoritmo - blastp (protein-protein BLAST) e restrita a humanos (human - taxid: 9606).

As proteínas que apresentaram similaridade com as sequências dos peptídeos foram pesquisadas no banco de dados UniProtKB Swiss-Prot (<http://www.expasy.org>) para identificação do seu número de acesso e obtenção de maiores informações sobre as mesmas.

O programa de análise de alinhamento, MATCH (<https://www.relic.bio.anl.gov/match.aspx>), foi usado para alinhar o conjunto de clones sequenciados de fagos com as principais proteínas homólogas de câncer de ovário.

Para identificar possíveis epítomos antigênicos lineares, foi verificado se os alinhamentos fornecidos pelo programa MATCH prediz com uma possível região estimuladora na produção de anticorpos, utilizando-se o programa de predição de epítomos antigênicos lineares Bepipred (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred>). Essas predições são feitas por meio de métodos que utilizam uma escala de tendências como estrutura secundária, hidrofobicidade, acessibilidade, randomicidade, e assim dão valores para cada aminoácido.

A estratégia de localização dos peptídeos em proteínas específicas ao câncer de ovário foi baseada no uso do programa Pepsurf (MAYROSE, SHLOMI *et al.*, 2007). O Pepsurf tem como entrada um conjunto de peptídeos e uma proteína no formato PDB (*Protein Data Bank*). O algoritmo procura agrupar um subconjunto dos peptídeos para identificar uma região mimética na proteína alvo que potencialmente é mimetizada por aquele grupo de peptídeos.

Para alinhamento das sequências de aminoácidos obtidas no presente trabalho, foi utilizado o programa CLUSTALW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

Para analisar o alinhamento da sequência proteica dos peptídeos com moléculas do complexo MHC classe I e MHC classe II, utilizou-se como ferramenta o programa de alinhamento com moléculas MHC (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC>) e moléculas MHCII que prediz a ligação aos alelos HLA-DR, HLA-DQ e HLA-DP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCII-2.0>).

3.4.5. Pré-Screening por Phage-ELISA

Para quantificar a reatividade dos fagos contra IgGs de amostras sorológicas de pacientes com câncer de ovário foram realizados ensaios de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*). As placas de microtitulação carregadas (NUNC Maxisorp) foram sensibilizadas em duplicata com IgGs sorológicas 1µg/well para todas as amostras (malignas, benignas e controle) diluídas em tampão carbonato 50 mM pH 9,6 por 16 horas a 4 °C. Após o tempo de incubação, as placas foram bloqueadas com PBST (0,1% Tween 20) BSA 5% por 1 hora a 4°C. As placas foram então lavadas três vezes com PBST (0,1% Tween 20) e incubadas por 1 hora a 37°C com 1×10^{11} /well de fagos selecionados e purificados e com 1×10^{11} /well de fago selvagem (fago que não expressa qualquer proteína exógena) para controle da reação. Posteriormente, as placas foram lavadas cinco vezes e incubadas com anti-M13 conjugado com peroxidase diluído 1:5000 em PBST (0,1% Tween 20) 5% BSA, durante 1 hora a 37°C e, novamente, lavadas cinco vezes. A ligação antígeno-anticorpo foi detectada pela adição de tampão orto-fenilenodiamina (SIGMAFAST™ OPD) a 1mg/mL acrescida de 3% de água oxigenada (H₂O₂). A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 4N. A reatividade (OD) foi lida em leitor de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, EUA) a 492nm. Todas as amostras foram testadas em duplicata, e como controle negativo, foi utilizado o fago selvagem M13. A OD final foi ajustada, subtraindo as leituras dos clones de fagos selecionados pela OD do fago do tipo selvagem M13 (controle negativo do fago). Valores de corte foram estabelecidos utilizando a OD média de duas amostras não-reagentes mais duas vezes os desvios-padrão. Para comparar os diferentes experimentos, o índice ELISA (IE=OD/cut-off) foi calculado.

3.5 Validação Diagnóstica dos Fagos Seleccionados por *Phage-ELISA*

Os fagos seleccionados e confirmados como ligantes específicos a IgGs sorológicas de pacientes com tumores malignos de ovário, foram testados para determinar sua eficácia como marcadores biológicos. Foram utilizadas 58 amostras de soro, sendo 24 amostras de pacientes com tumores malignos de ovário, 24 amostras de pacientes com tumores benignos e 10 amostras classificadas como tumores bordelines de ovário.

As placas de microtitulação carregadas (NUNC Maxisorp) foram sensibilizadas com fagos purificados na diluição de 10^{10} pfu/poço em tampão carbonato 50mM pH 9,6 por 16 horas a 4°C. Após a sensibilização, as placas foram lavadas três vezes com PBS e, posteriormente, bloqueadas com PBS suplementado com 5% de BSA por 1 hora a 37°C. Em seguida, lavou-se as placas três vezes com PBS e incubou-se com soro de pacientes individuais com tumores malignos de ovário e com soro de pacientes individuais com tumores benignos de ovário, na proporção de 1:50 diluído em PBST (0,05% Tween 20) BSA 5% por 1 hora a 37°C. Lavou-se a placa cinco vezes com PBST (0,05% Tween 20) e, em seguida, incubou-as com anti-IgG humana conjugado com peroxidase (Sigma), diluído 1:5000 em PBST (0,05% Tween 20) BSA 5% durante 1 hora a 37°C. Lavou-se, novamente, cinco vezes com PBST (0,05% Tween 20) e a ligação antígeno/anticorpo foi detectada pela adição de tampão orto-fenilenodiamina (SIGMAFAST™ OPD) a 1mg/mL acrescida de 3% de água oxigenada (H₂O₂). A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 4N. A reatividade foi obtida em leitor de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories) pela leitura a 492nm. O experimento foi realizado em duplicata e a absorbância de cada fago foi obtida subtraindo-se o valor da média da sua absorbância pelo valor da média da absorbância do fago selvagem M13 (sem o peptídeo), para cada paciente analisada.

3.6 Caracterização dos Peptídeos Sintéticos

3.6.1 Peptídeos sintéticos

O peptídeo Synt1 (APVHKATLSMGF**GGGS**APVHKATLSMGF) foi deduzido a partir da sequência de DNA do fago selecionado Seq. ID N^o1, que apresentou ser o mais frequente na seleção de peptídeos ligantes a IgGs sorológicas. Este peptídeo foi sintetizado pela GenScript USA Inc. (Piscataway, USA) e, após purificação por cromatografia de afinidade em HPLC, apresentou 95% de pureza. Possui duas repetições da sua sequência de aminoácidos, entre as quais foi adicionado um espaçador GGGS, totalizando 28AA.

O peptídeo Synt2 (TSTLSLGLLETTGLLATSSSAETSTSTL) foi deduzido a partir do alinhamento dos peptídeos obtidos nos dois processos de seleção (*biopannings*) por *Phage Display* com a proteína CA125 utilizando o programa MATCH (Figura 4). Este peptídeo, que possui 28AA, representa a região compreendida entre os aminoácidos 11866 e 11895 da proteína CA125 e foi sintetizado pela GenScript USA Inc. (Piscataway, USA). Após purificação por cromatografia de afinidade em HPLC apresentou 97% de pureza.

3.6.2 Ensaio imunoenzimático para detecção de IgGs

A reatividade dos peptídeos sintéticos contra IgGs circulantes de pacientes diagnosticadas com carcinoma ovariano e pacientes com tumores benignos de ovário foram testadas em ensaio imunoenzimático (ELISA).

Placas de microtitulação (NUNC Maxisorp) foram sensibilizadas com os peptídeos sintéticos Synt1 e Synt2 a uma concentração de 0,5µg/poço em tampão carbonato 50mM pH 9,6 por 16 horas a 4°C. Após a sensibilização, as placas foram lavadas uma vez com PBS. Posteriormente, as mesmas foram bloqueadas com PBS suplementado com 5% de BSA por 1 hora a 37°C. Em seguida, lavou-se as placas uma vez com PBS e incubou-se com soro de pacientes individuais com tumores malignos de ovário e com soro de pacientes individuais com

tumores benignos de ovário, na proporção de 1:50 diluído em PBS, suplementado com 5% BSA, por 1 hora a 37°C. Lavou-se a placa três vezes com PBST (0,05% Tween 20) e, em seguida, incubou-as com anti-IgG humana conjugada com peroxidase (Sigma) diluída 1:5000 em PBS, suplementado com 5% BSA, durante 1 hora a 37°C. Lavou-se, novamente, três vezes com PBST (0,05% Tween 20) e a ligação antígeno/anticorpo foi detectada pela adição de tampão orto-fenilenodiamina (SIGMAFAST™ OPD) a 1mg/mL acrescida de 3% de água oxigenada (H₂O₂). A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 4N. A reatividade foi analisada em leitor de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories) à 492nm.

3.6.3 Ensaio *in vitro* com a linhagem tumoral de ovário OVCAR-3

Cultura da linhagem tumoral OVCAR-3 foi mantida no Laboratório de Nanobiotecnologia – UFU. As células foram utilizadas nos ensaios *in vitro* da redução do MTT com o peptídeo sintético Synt1.

A determinação da proliferação celular pelo método do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Reilly *et al.* (1998) com modificações. Segundo o princípio do método, as células viáveis e metabolicamente ativas reduzem o sal tetrazólio (MTT) pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase para um composto azul (formazan), insolúvel em solução aquosa. Uma vez solubilizado, a quantidade de formazan pode ser determinada espectroscopicamente.

A linhagem de carcinoma ovariano OVCAR-3 foi cultivada em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina) em placas de cultura celular com 96 poços (2x10⁵ células/poço). O peptídeo sintético Synt1 foi adicionado em cada poço e a atividade celular foi monitorada pelo ensaio de MTT. As quantidades do peptídeo Synt1 testadas foram de 50µM; 37µM; 25µM; 18,5µM; 12,5µM; 9,25µM; 6,25µM; 4,63µM e 3,12µM. Posteriormente, as células foram incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após o período de incubação, 50µl de uma solução estoque a 5mg/mL de MTT (Sigma Chemical Co.) foi adicionada

em cada poço e incubada a 37°C e 5% de CO₂ por 3,5 horas. Os cristais de formazan foram solubilizados com 100µl de dimetilformamida e SDS 20%. A absorbância foi monitorada em leitor de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories) à 590nm. Cada amostragem foi analisada em triplicata. Para cálculo da proliferação celular foi utilizada a fórmula:

$$\% \text{ Proliferação celular} = \frac{[(DO_{\text{células tratadas}} - DO_{\text{branco}})]}{[(DO_{\text{controle negativo}} - DO_{\text{branco}})]} \times 100$$

Onde:

DO Células tratadas = Densidade ótica dos poços com o peptídeo Synt1

DO Controle negativo = Densidade ótica dos poços do controle negativo (sem peptídeo)

DO Branco = Densidade ótica dos poços contendo apenas o meio de cultura

3.6.4 Ensaio *in vitro* com linhagem celular de macrófagos

Para analisar o efeito dos peptídeos sintéticos Synt1 e Synt2 na ativação de macrófagos, a produção de óxido nítrico foi estimada pela acumulação de NO₂, como descrito por Green *et al.* (1982). A linhagem celular de macrófagos murinos J774A.1, provenientes do Banco de células do Rio de Janeiro, foi mantida em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina). As células foram cultivadas em placas de cultura celular de 96 poços (1x10⁵ células/poço) e mantidas em câmara umidificada com 5% de CO₂ a 37°C por 4 horas para aderência celular.

As células não aderidas foram removidas e os macrófagos foram então tratados com os peptídeos sintéticos Synt1 e Synt2 nas quantidades de 50µM; 25µM; 12,5µM; 6,25µM e 3,12µM. A cultura celular de macrófagos também foi tratada com extrato protéico da linhagem tumoral de ovário OVCAR-3, nas mesmas quantidades utilizadas para os peptídeos sintéticos.

Posteriormente, as células foram incubadas por 36 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após o período de incubação, 100µl do sobrenadante de cultura foram transferidos para uma nova placa e armazenados a -80°C.

Para a mensuração de óxido nítrico, 50µL do reagente de Griess [1% sulfanilamida em 2.5% H₃PO₄ e 0.1% NEED in 2.5% H₃PO₄ (v/v)] foram adicionados a 50µL do sobrenadante de cada cultura em placas de 96 poços. Os controles e a curva padrão para referência foram também determinados. A absorbância foi mensurada a 570nm usando leitora de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Para avaliar a proliferação celular de macrófagos estimulados com os peptídeos Synt1 e Synt2 foram realizados ensaios *in vitro* da redução do MTT. A linhagem J774A.1 foi cultivada em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina) em placas de cultura celular com 96 poços (1x10⁵ células/poço). Após 4 horas de incubação em câmara umidificada com 5% de CO₂ a 37°C, as células não aderidas foram removidas e os macrófagos foram, então, tratados com os peptídeos Synt1 e Synt2 nas quantidades de 50µM; 25µM; 12,5µM; 6,25µM e 3,12µM. As células foram mantidas por 36 horas a 37°C e 5% de CO₂ e após o período de incubação, 50µl de uma solução estoque a 5mg/mL de MTT (Sigma Chemical Co.) foi adicionada em cada poço e incubada a 37°C e 5% de CO₂ por 5 horas. Os cristais foram solubilizados com 100µl de dimetilformamida e SDS 20% e absorbância foi mensurada à 590nm em leitor de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Para cálculo da proliferação celular foi utilizada a fórmula anteriormente citada. A cultura celular de macrófagos também foi tratada com extrato protéico da linhagem tumoral de ovário OVCAR-3, nas mesmas quantidades utilizadas para os peptídeos sintéticos.

3.7 Seleção de Anticorpos Fab Expressos na Superfície de Fagos

3.7.1 Biblioteca de anticorpos Fab

A biblioteca de anticorpos recombinantes Fab foi construída a partir de amostras de RNA total obtidas de leucócitos (sangue periférico) de 20 pacientes (média de idade de 54 anos) diagnosticadas com câncer de mama ductal invasivo grau I (1%), grau II (98%) e grau III (1%). O *Kit Super Script III* (Invitrogen) foi utilizado para a síntese do cDNA. Em seguida, as regiões referentes às cadeias pesadas e leves (VH e VL) de IgGs e IgMs foram amplificadas em reações de PCR, utilizando 20 oligonucleotídeos iniciadores distintos. Para a obtenção do Fab, duas reações de PCR por sobreposição foram realizadas, o qual foi posteriormente submetido a uma reação de restrição com a enzima *Sfi I* (New England Biolabs) para a clonagem. A digestão do vetor, o fagomídeo pComb 3X, com a mesma enzima foi feita simultaneamente e a reação de ligação foi realizada com a enzima T4 DNA Ligase. Ao final de todo o processo de construção, foi obtida uma biblioteca com diversidade de $1,7 \times 10^6$ clones diferentes (ARAÚJO, 2009).

3.7.2 Seleção de anticorpos recombinantes Fab por Phage Display

Para a seleção de anticorpos Fab, foram utilizados dois diferentes alvos: proteínas totais provenientes de tecidos tumorais de ovário e o peptídeo sintético synt1, produzido sinteticamente neste trabalho. Para extração de proteínas totais foram utilizadas 05 amostras de tecidos ovarianos, classificadas como tumores malignos epiteliais de ovário nos estadiamentos I e III, obtidas de pacientes submetidas à ressecção da lesão tumoral do ovário.

Foram conduzidos dois ciclos de seleção, sendo cada um deles antecedido pela reamplificação da biblioteca de Fab em *E.coli* XL1-Blue eletrocompetentes com o auxílio do fago auxiliar VCSM13, para a montagem e replicação das proteínas virais (BARBAS *et al.*, 2001).

Dois poços de uma placa de microtitulação (NUNC MaxiSorp®), sendo um para cada seleção, foram previamente adsorvidos com 1µg de proteínas totais de tumores malignos de ovário e 1µg de peptídeo Synt1, diluídos em 50µl de tampão de sensibilização (100µg/mL em 0,1 M NaHCO₃, pH 8,6) e incubados por 18 horas a 4°C sob leve agitação. Ao final da sensibilização, a placa foi bloqueada com 250µl de solução bloqueio TBS-leite em pó desnatado 5% por 1 hora a 37°C; e lavada seis vezes com TBST (0,1% Tween 20). Foram adicionados 50µl da biblioteca recém amplificada em cada poço e a placa foi incubada por 1 hora a 37°C. Os fagos ligantes foram eluídos com solução ácida (Glicina-HCl pH 2,2) e posteriormente neutralizados com 2M de Tris-HCL pH 7,4, e posteriormente, transferidos para a cultura de bactérias XL1-Blue eletrocompetentes já na OD_{600nm} ~ 1.0 para a infecção, amplificação e titulação dos bacteriófagos.

3.8 Análises dos Fab selecionados

Após o término do segundo ciclo de seleção, os bacteriófagos obtidos foram submetidos à extração do DNA plasmidial utilizando-se o *QIAprep Spin Miniprep Kit*. Este DNA foi utilizado para transformar a linhagem *E.coli* não supressora TOP10 (Invitrogen). Após a transformação, os clones obtidos foram induzidos para a produção de Fab na forma solúvel, para posteriores análises.

3.8.1 Produção de Fab na forma solúvel em placa deep well

Clones individuais, eluídos após o segundo ciclo de seleção foram inoculados em 1mL de meio SB contendo 100mg/mL de carbenicilina e 2% de glicose 2M (v/v), em placa *deep well* e crescidos O/N sob agitação a 37°C. No dia seguinte, 50µl da cultura de cada clone foram transferidas para uma nova placa de 96 poços, estéril, contendo 1 mL de meio SB suplementado com 100mg/mL de carbenicilina e 2% de glicose 2M (v/v) e crescida a 37°C até atingir uma OD_{600nm} ~ 1. Após este período, a cultura foi centrifugada a 3.700rpm durante 10 minutos e o

sedimento ressuspenso em 1,5 mL de SB suplementado com carbenicilina (100 µg/mL) e IPTG a 2 mM. A placa foi incubada sob agitação a 30°C por 18 horas, seguida de centrifugação a 3700rpm por 20 minutos. O sobrenadante de cultura foi transferido para uma nova placa e armazenado a 4°C até ser utilizado nos ensaios de ELISA.

3.8.2 *Análise dos fragmentos de anticorpos selecionados por meio de ensaios de ELISA*

Por meio dos ensaios de ELISA foram avaliadas as reatividades dos clones selecionados ao extrato protéico proveniente de tumores malignos de ovário, tumores benignos de ovário e tecidos normais de ovário, além da especificidade destes clones ao peptídeo Synt1, produzido sinteticamente neste estudo. No teste, placas de microtitulação (Nunc Maxisorp®) foram sensibilizadas com 1µg/poço dos alvos descritos anteriormente, diluídos em 50µL de tampão de sensibilização (100µg/mL em 0,1 M NaHCO₃, pH 8,6). Após incubação O/N a 4°C, a solução de proteínas foi descartada e procedeu-se o bloqueio dos sítios inespecíficos com 250µL de leite desnatado 5% diluído PBS durante 1,5 horas à temperatura ambiente. Em seguida, a solução de bloqueio foi descartada e foram adicionados 100µL do sobrenadante de cultura de indução dos Fabs. Seguiu-se incubação por 2 horas à temperatura ambiente, sob leve agitação. Como controle negativo, foi utilizado o sobrenadante de um clone inespecífico, ligante à proteína total de *Leishmania amazonensis* cepa (IFLA/BR/67/PH8).

Após a incubação, os sobrenadantes foram descartados e a placa lavada 3 vezes com PBST (0,05% Tween 20). O anticorpo secundário anti-HA conjugado com peroxidase foi posteriormente adicionado na diluição 1:1000 em PBS e a placa foi mantida por 1 hora a temperatura ambiente, sob leve agitação. O anticorpo foi descartado e a placa lavada 3 vezes com PBST (0,05% Tween 20). A ligação antígeno/anticorpo foi detectada pela adição de tampão orto-fenilenodiamina (SIGMAFAST™ OPD) a 1mg/mL acrescida de 3% de água oxigenada (H₂O₂), incubados à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por, pelo menos, 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 4N. A

reatividade foi obtida em leitor de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories) e realizada no comprimento de onda de 492nm, considerando-se os poços da placa que não foram sensibilizados como controles negativos da reação (brancos).

3.9 Análises Estatísticas

O software GraphPad Prism 5.0 foi utilizado para a análise descritiva dos dados, para as análises de correlação e para a criação dos diagramas apresentados no trabalho.

Foi utilizado o teste T não pareado com correções de Welch's, para comparar as absorbâncias dos fagos/peptídeos entre os grupos analisados. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado devido à distribuição não paramétrica dos dados, para comparar as absorbâncias relativas no soro de pacientes com câncer de ovário estratificados em grupos independentes. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Para avaliar a eficácia do valor discriminativo dos biomarcadores, foram utilizadas curvas ROC (*receiver operating characteristic*). Esta análise, por meio de um gráfico simples, permite a avaliação da sensibilidade (verdadeiros positivos) no eixo Y contra $1 -$ especificidade (falsos positivos) no eixo X, considerando cada valor observado como um possível valor de corte ou *cutoff*. Os índices de AUC (*area under the curve*) foram calculados como medida para o poder discriminativo do teste diagnóstico. Quando um marcador não possui valor discriminativo, a curva ROC tangencia a diagonal do gráfico e o valor de AUC está perto de 0,5. Quando um teste é fortemente discriminativo, a curva ROC se direciona para o ângulo superior esquerdo do gráfico e o valor de AUC se aproxima de 1,0.

As análises estatísticas dos ensaios *in vitro* com linhagem celular de macrófagos foram realizadas por análise de variância (one-way-ANOVA). As diferenças significativas foram analisados pelo pós-teste Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

4 Resultados

4.1. Seleção dos Peptídeos recombinantes miméticos a antígenos tumorais de câncer de ovário

Na seleção de peptídeos recombinantes miméticos e motivos protéicos sorológicos, foram obtidos 58 clones com sequências de DNA válidas, sendo 22 sequências distintas ligantes às imunoglobulinas totais (IgGs) de soro de pacientes com câncer de ovário. Já na seleção de peptídeos recombinantes miméticos a antígenos tumorais teciduais, foram obtidos 63 clones com sequências de DNA válidas, sendo 19 sequências distintas. Deste total, 16 clones apresentavam 12 aminoácidos em suas sequências protéicas e apenas 3 peptídeos identificados apresentavam 7 aminoácidos em suas sequências (Tabela 3).

Tabela 3: Sequência de aminoácidos dos peptídeos obtidos por *Phage Display* e suas respectivas frequências no *biopanning*.

PEPTÍDEOS MIMÉTICOS A PROTEÍNAS SOROLÓGICAS				PEPTÍDEOS MIMÉTICOS A PROTEÍNAS TECIDUAIS			
Clone	Peptídeo	Freq	%	Clone	Peptídeo	Freq	%
Seq. ID N° 1	apvhkatlsmgf	9/58	15,5	Seq. ID N° 47	ypfhfntspsh	27/63	41,3
Seq. ID N° 2	aphkhkaslsiy	7/58	12,1	Seq. ID N° 48	mhkpvhnppkll	16/63	25,4
Seq. ID N° 3	slyhvsslssav	6/58	10,3	Seq. ID N° 49	spypsws tpagr	3/63	4,8
Seq. ID N° 4	dykhtsfqirmi	6/58	10,3	Seq. ID N° 50	allrgptaltcc	1/63	1,6
Seq. ID N° 5	spLhrstlsiga	5/58	8,6	Seq. ID N° 51	mhkpvhdppkll	1/63	1,6
Seq. ID N° 6	awvhvstlsavp	3/58	5,2	Seq. ID N° 52	aelywthtvpts	1/63	1,6
Seq. ID N° 7	thqhihvsemsi	2/58	3,4	Seq. ID N° 53	ymtpktpspsya	1/63	1,6
Seq. ID N° 8	sflhssalsydp	2/58	3,4	Seq. ID N° 54	svsvgmkp sprp	3/63	4,8
Seq. ID N° 9	nhwhvhtgvl sf	2/58	3,4	Seq. ID N° 55	sryksperqnpp	1/63	1,6
Seq. ID N° 10	apwhsssiafis	2/58	3,4	Seq. ID N° 56	sefspntskyvy	1/63	1,6
Seq. ID N° 11	drLhvsniayst	2/58	3,4	Seq. ID N° 57	stsvystyqytp	1/63	1,6
Seq. ID N° 12	gfrhtsylynnp	2/58	3,4	Seq. ID N° 58	ykynypqhsnyt	1/63	1,6
Seq. ID N° 13	spLhratlqipw	1/58	1,7	Seq. ID N° 59	saphnlstnpad	1/63	1,6
Seq. ID N° 14	dhtlytpythp	1/58	1,7	Seq. ID N° 60	nlfhyrshdhsi	1/63	1,6
Seq. ID N° 15	wtthtssisnrp	1/58	1,7	Seq. ID N° 61	shhpmmslliap	1/63	1,6
Seq. ID N° 16	qalhissvaasr	1/58	1,7	Seq. ID N° 62	sptsfstvhwel	1/63	1,6
Seq. ID N° 17	astpwppttfv	1/58	1,7	Seq. ID N° 63	vsnakns	1/63	1,6
Seq. ID N° 18	lemprarivney	1/58	1,7	Seq. ID N° 64	tgallana	1/63	1,6
Seq. ID N° 19	apvhkatlsmgl	1/58	1,7	Seq. ID N° 65	tnnvmpf	1/63	1,6
Seq. ID N° 20	lladtthhspwt	1/58	1,7				
Seq. ID N° 21	eykhtstlkylp	1/58	1,7				
Seq. ID N° 22	nhwhvhagvl sf	1/58	1,7				

Com auxílio das ferramentas de bioinformática, os 22 clones ligantes a imunoglobulinas totais (IgGs) de soro de pacientes com câncer de ovário foram alinhados pelo programa BLAST (data base: swissprot) com proteínas humanas depositadas no GenBank cujos resultados podem ser visualizados na Tabela 4.

Tabela 4: Proteínas identificadas na seleção de peptídeos miméticos sorológicos à proteínas tumorais de câncer de ovário por *Phage Display*.

Proteína	Nome; Função	Acesso	SCORE (bits)	E value	Peptídeos com similaridade
MUC16	CA125 - marcador tumoral de câncer de ovário	Q8WXI7.2	18.0	34,2	22/22 (100%)
BRCA1	proteína de susceptibilidade ao câncer de mama - tipo 1	P38398.2	14.9	98,5	7/22 (31,8%)
BRCA2	proteína de susceptibilidade ao câncer de mama - tipo 2	P51587.2	15.2	53,3	5/22 (22,7%)
ErbB-1	receptor de fator de crescimento epidermal	P00533.2	16.1	32,0	2/22 (9,0%)
MUC-1	mucina associada a tumor	P15941.2	18.0	9,8	2/22 (9,0%)
Cadherin-1	glicoproteína de adesão celular	P12830.3	16.3	27,0	1/22 (4,5%)

SCORE - É um valor calculado a partir do número de lacunas e substituições associados a cada sequência alinhada. Quanto maior o escore, o mais significativo o alinhamento. **E value**: descreve a probabilidade de que uma sequência com uma pontuação semelhante ocorrerá no banco de dados por acaso. Quanto menor o seu valor, o mais significativo o alinhamento.

Os peptídeos selecionados apresentaram similaridade com o MUC16 (antígeno de carcinoma ovariano CA125), BRCA1 (proteína de susceptibilidade ao câncer de mama - tipo 1), BRCA2 (proteína de susceptibilidade ao câncer de mama - tipo 2), ErbB-1 (receptor de fator de crescimento epidermal), MUC1 (mucina associada a tumor) e caderina-1 (glicoproteína de adesão celular). Entre os 22 clones selecionados no *biopanning*, todos apresentaram similaridade com a proteína MUC16, também conhecida como antígeno CA125, principal marcador tumoral sérico do câncer de ovário (Tabela 4).

Os peptídeos obtidos na seleção, ligantes às imunoglobulinas totais (IgGs) de extrato protéico de tumores malignos de ovário, também foram alinhados pelo programa BLAST (data base: swissprot) com proteínas humanas e os resultados são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5: Proteínas identificadas na seleção de peptídeos miméticos teciduais à proteínas tumorais de câncer de ovário por *Phage Display*.

Proteína	Nome; Função	Acesso	SCORE (bits)	E value	Peptídeos com similaridade
MUC16	CA125 - marcador tumoral de câncer de ovário	Q8WXI7.2	15.4	29,6	14/19 (73,7%)
BRCA2	proteína de susceptibilidade ao câncer de mama - tipo 2	P51587.2	15.2	35,0	7/19 (36,8%)
BRCA1	proteína de susceptibilidade ao câncer de mama - tipo 1	P38398.2	16.6	42,0	3/19 (15,7%)
ErbB-1	receptor de fator de crescimento epidermal -1	P00533.2	14.7	74,5	2/19 (10,52%)
Cadherin-1	glicoproteína de adesão celular	P12830.3	15.9	34,0	2/19 (10,52%)
MUC-1	mucina associada a tumor	P15941.2	17.9	12,4	2/19 (10,52%)
ErbB-2	receptor de fator de crescimento epidermal -2	P04626.1	16.1	32,0	2/19 (10,52%)
OVCA2	candidato a supressor de tumor ovariano	Q8WZ82.1	16.1	4,7	2/19 (10,52%)
ESR1	receptor de estrogênio	P03372.2	18.3	7,9	2/19 (10,52%)

SCORE - É um valor calculado a partir do número de lacunas e substituições associados a cada sequência alinhada. Quanto maior o escore, o mais significativo o alinhamento. **E value**: descreve a probabilidade de que uma sequência com uma pontuação semelhante ocorrerá no banco de dados por acaso. Quanto menor o seu valor, o mais significativo o alinhamento.

Esses peptídeos apresentaram similaridade com as mesmas proteínas encontradas para os peptídeos ligantes à IgGs sorológicas de pacientes com câncer de ovário, como o MUC16 (antígeno de carcinoma ovariano CA125), BRCA2 (proteína de susceptibilidade ao câncer de mama - tipo 2), BRCA1 (proteína de susceptibilidade ao câncer de mama - tipo 1), ErbB-1 (receptor de fator de crescimento epidermal-1), caderina-1 (glicoproteína de adesão celular) e MUC1 (mucina associada a tumor). Apresentaram também similaridade com outras três proteínas: ErbB-2 (receptor de fator de crescimento epidermal-2), OVCA2 (proteína candidata a supressor tumoral de ovário) e ERS1 (receptor de estrogênio). Em relação ao antígeno CA125, 14 dos 19 clones obtidos no *biopanning* (73,7%) apresentaram similaridade com esta proteína (Tabela 5).

A especificidade da seleção e a reatividade dos peptídeos anteriormente descritos foram analisadas nos ensaios de ELISA. A Figura 3 apresenta a razão do índice ELISA entre tumores malignos e benignos (maligno/benigno) e entre tumores malignos e amostras não tumorais (maligno/controle) de vinte e seis clones.

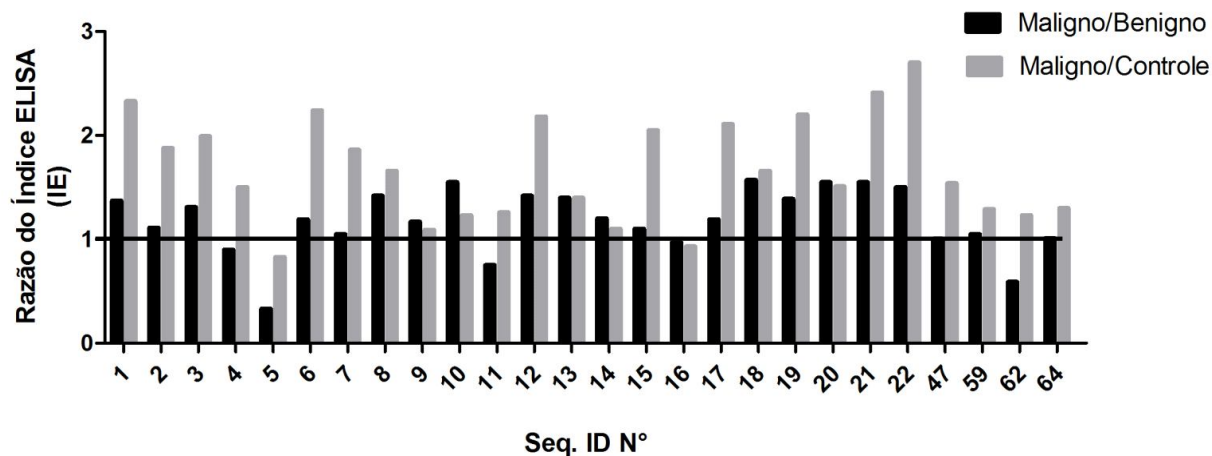


Figura 3: Gráfico representativo da razão do Índice ELISA (IE) entre tumores malignos/benignos e entre tumores/controles, indicando a reatividade dos clones de fagos, detectada pelo anticorpo anti-M13, contra IgGs de amostras sorológicas de pacientes com tumores malignos de ovário, com tumores benignos e de mulheres clinicamente saudáveis. Para comparar os diferentes experimentos, o índice IE ($IE = OD/cut-off$) foi calculado. As amostras mostrando razão do IE > 1 para ambas as amostras foram consideradas positivas.

Do total de clones analisados, 21 apresentaram razão do índice ELISA (IE) maior que 1 e foram considerados positivos, por apresentarem maior reatividade com amostras malignas do que com amostras benignas e normais. Entre os peptídeos reativos estão os clones identificados por Seq. ID N°1, N°2, N°3, N°6, N°7, N°8, N°9, N°10, N°12, N°13, N°14, N°15, N°17, N°18, N°19, N°20, N°21, N°22, N°47, N°59 e N°64. Os resultados obtidos demonstram que os peptídeos foram específicos para o alvo utilizado, sendo possível a seleção de peptídeos recombinantes miméticos a antígenos tumorais de câncer de ovário.

4.2. Peptídeos recombinantes miméticos ao CA125

Dentre os clones selecionados nos dois *biopannings*, 87,8% (36/41) apresentaram similaridade com a proteína MUC16 ou antígeno de carcinoma ovariano CA125. Desta forma, os peptídeos ligantes às IgGs circulantes e às IgGs de tecido tumoral foram alinhados pelo programa MATCH com a sequência inteira do CA125 (acesso sp|Q8WXI7.2|MUC16_HUMAN). Os resultados do alinhamento da proteína CA125 são mostrados na Figura 4.

CA125	
Seq. ID N° 85	lsthpgtettstmiptstlsiglltettgllatsssaetststltl 11895
Seq. ID N° 59	saphnlstnpad
Seq. ID N° 03	slyhvsslsav
Seq. ID N° 47	ypfhfntspsh
Seq. ID N° 64	tgalana
Seq. ID N° 01	apvhkatlsngf
Seq. ID N° 15	wtthtsslsnlp
Seq. ID N° 19	apvhkatlsngl
Seq. ID N° 06	awvhvstlsavp
Seq. ID N° 08	sflhssalsydp
Seq. ID N° 21	eykhtstlkylp

Figura 4: Alinhamento dos peptídeos obtidos nos dois processos de seleção por *Phage Display* com a proteína CA125 pelo programa MATCH (<https://www.relic.bio.anl.gov/match.aspx>). Os peptídeos identificados na figura alinham com a sequência proteica do antígeno tumoral de carcinoma ovariano entre os aminoácidos 11852 e 11895 denominada Seq. ID N° 85. Os aminoácidos em destaque demonstram o alinhamento.

Dentre os 41 peptídeos analisados, 10 alinham com a proteína CA125 entre as posições 11850 a 11900. A região compreendida entre os aminoácidos 11852 e 11895, identificada por Seq. ID N° 85 demonstrou ser a principal região de similaridade da proteína CA125 com alguns dos peptídeos aqui mencionados e, portanto alvo de bastante interesse neste trabalho.

Os 10 peptídeos aqui identificados foram considerados positivos nos ensaios de ELISA, demonstrando serem clones reativos às IgGs circulantes de pacientes com tumores malignos de ovário.

Para confirmação da similaridade dos peptídeos obtidos no presente trabalho com a proteína CA125, os mesmos foram alinhados com a estrutura tridimensional do domínio SEA em proteína hipotética de camundongo, homóloga à MUC16 em humanos. Os resultados demonstraram que os 10 clones alinharam com a estrutura tridimensional da proteína e um *cluster* de 30 resíduos foi formado. A Figura 5 apresenta o mapeamento putativo do epítopo da proteína homóloga à MUC16/CA125 e demonstra o *cluster* de quatro peptídeos miméticos (Seq.ID N° 47, Seq.ID N° 1, Seq.ID N° 8 e Seq.ID N° 21) e seus respectivos alinhamentos (Fig. 5A). Também está demonstrado em detalhes o alinhamento do clone Seq.ID N° 1 com a proteína homóloga à MUC16 (Fig. 5B). Este clone apresentou ser o mais frequente na seleção de peptídeos ligantes às IgGs sorológicas.

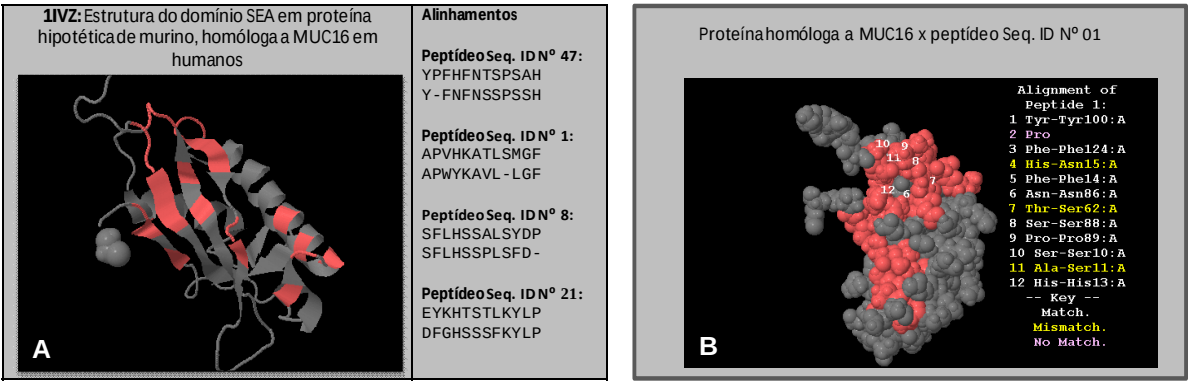


Figura 5: Mapeamento putativo da região mimética da proteína homóloga à MUC16/CA125, utilizando-se 10 peptídeos obtidos no processo de seleção em estrutura protéica catalogada no Protein Data Bank. (A) Cluster formado com 4 peptídeos (Seq.ID N° 47, Seq.ID N° 1, Seq.ID N° 8 e Seq.ID N° 21). (B) Detalhes do alinhamento do clone Seq.ID N° 1 com a proteína homóloga à MUC16.

4.3 Antiidiotipo do CA125

O peptídeo denominado Seq.ID Nº 1 foi alinhado pelo programa CLUSTALW2 com a sequência do antiidiotipo CA125 (ACA125) obtido pela World Health Organization (2007). O resultado mostrado na Figura 6 indica que o peptídeo mais frequente na seleção por *Phage Display*, mimético ao antígeno tumoral CA125, alinhou-se à cadeia pesada do anticorpo monoclonal murino ACA125, também denominado antiidiotipo anti-CA125 (Abagovomab), na região compreendida entre os aminoácidos 155 e 172.

ACA125	TLGCLVKGYFPE	P	V	T	V	T	W	N	S	G	S	L	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	D	L	180
Seq.ID Nº 1		A	P	V	-	-	-	-	H	K	A	T	L	S	M	G	-	-	-	F							12
		*	*						:	.	.	.	*	*	*	*	*										

Figura 6: Alinhamento do peptídeo Seq.ID Nº1 mimético à proteína CA125 com anticorpo monoclonal murino ACA125 obtido pelo programa CLUSTALW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). Os aminoácidos em destaque demonstram o alinhamento: (*) aminoácidos idênticos, (:) e (.) aminoácidos semelhantes.

O mesmo alinhamento anteriormente descrito foi repetido inserindo-se a sequência da proteína CA125 cujos resultados podem ser visualizados na Figura 7. As análises de similaridade demonstraram que a mesma região da proteína CA125, compreendida entre os aminoácidos 11852 e 11895, mapeada neste estudo e identificada por Seq. ID Nº 85 alinhou-se com a porção compreendida entre os aminoácidos 155 e 172 da cadeia pesada do anticorpo monoclonal murino ACA125.

ACA125	TLGCLVKGYFPE	P	-	-	-	V	T	V	T	W	N	S	G	S	L	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	D	L	180				
Seq.ID Nº 1		A	P	-	-	-	-	-	-	V	H	K	A	T	L	S	M	G	F											12				
CA125		L	S	T	H	P	G	T	E	T	S	T	M	I	P	T	S	T	L	S	L	G	L	L	E	T	T	G	L	L	A	T	S	11888
		*														.	.	.	*	*	*	*												

Figura 7: Alinhamento do peptídeo Seq.ID Nº1 com a proteína CA125 e com o anticorpo monoclonal murino ACA125 obtido pelo programa CLUSTALW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). Os aminoácidos em destaque demonstram o alinhamento: (*) aminoácidos idênticos, (:) e (.) aminoácidos semelhantes.

Utilizando-se o programa de predição de epítomos antigênicos lineares Bepipred (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred>) foi verificado que essa região da proteína CA125 (11850-11900) prediz com uma possível região estimuladora na produção de anticorpos.

Outros clones obtidos nos *biopannings* também foram alinhados com a proteína CA125 e com a sequência do antiidiotipo CA125 (ACA125) e os resultados podem ser visualizados na Figura 8.

As sequências dos clones Seq.ID Nº 62, Seq.ID Nº 3, Seq.ID Nº 19, Seq.ID Nº 1, Seq.ID Nº 6, Seq.ID Nº 21, Seq.ID Nº 59 e Seq.ID Nº 8 alinharam com a mesma região da proteína CA125, identificada por Seq. ID Nº 85 e com a porção compreendida entre os aminoácidos 155 e 172 da cadeia pesada do anticorpo monoclonal murino ACA125, anteriormente descrita.

As sequências foram repetidas entre uma a três vezes conforme alinhamento parcial com a sequência do CA125 e do ACA125, com pelo menos 3 resíduos homólogos entre os peptídeos e as sequências originais. Estes alinhamentos determinaram os prováveis epítomos das sequências do CA125 e ACA125.

A sequência do clone Seq.ID Nº 1 (APVHKATLSMGF) quando repetida duas vezes, alinha-se aos dois prováveis epítomos da proteína CA125, o que nos sugere a identificação de um epítopo conformacional (mimetopo), ou seja, sequências de regiões da proteína não-sequencial na estrutura primária que contribuem para um único sítio tridimensional.

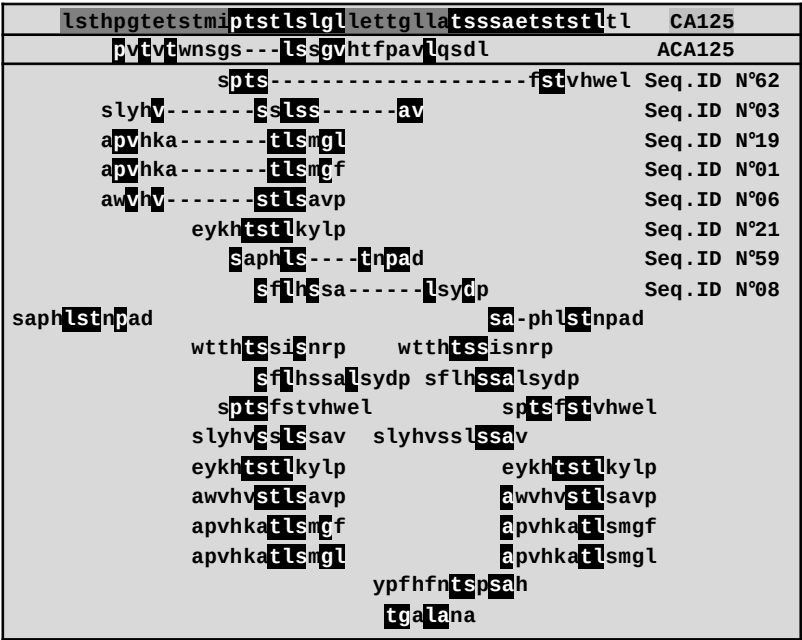


Figura 8: Alinhamento dos clones obtidos nos *biopannings* e prováveis motivos protéicos para os peptídeos miméticos do CA125 e do ACA125. As sequências dos peptídeos foram repetidas entre uma a três vezes conforme alinhamento parcial com a sequência do CA125 e do ACA125, com pelo menos 3 resíduos homólogos entre os peptídeos e as sequências originais. Em preto estão marcados os prováveis epítomos das sequências do CA125 e ACA125.

O peptídeo sintético Synt1 (APVHKATLSMGFGGGSAPVHKATLSMGF) contendo duas repetições da sequência do clone Seq.ID N°1, sendo o provável mimetopo da proteína CA125, foi analisada pelo programa NetMHCII 2.2, cujos resultados podem ser visualizados na Tabela 6. Este programa prediz a ligação dos peptídeos a alelos HLA-DR, HLA-DQ e HLA-DP do complexo MHC classe II.

Tabela 6: Alelos do complexo MHCII ligantes ao peptídeo sintético Synt1:

Alelos MHCII	Peptídeo	Core	1-log50k(aff)	afinidade(nM)	Ligação
HLA-DQA10501-DQB10301	GGGSAPVHKATL	GGGSAPVHK	0.687	29.5	forte
HLA-DQA10501-DQB10301	APVHKATLSMGF	APVHKATLS	0.583	90.9	fraca
HLA-DRB10701	APVHKATLSMGF	HKATLSMGF	0.595	80.2	fraca

Nestas análises, o peptídeo Synt1 foi capaz de se ligar fortemente a um dos subtipos do alelo HLA-DQ (HLA-DQA10501-DQB10301) e fracamente a um dos subtipos do alelo HLA-DR (HLA-DRB10701). O mesmo peptídeo foi analisado pelo programa NetMHC 3.2, que prediz a ligação de peptídeos a alelos do complexo MHC classe I, mas nenhuma ligação foi detectada.

Os resultados aqui demonstrados indicam que pela seleção por *Phage Display* foi possível a seleção de peptídeos miméticos ao antígeno de carcinoma ovariano CA125, sendo possível o mapeamento dos epítomos desta proteína. As análises *in silico* aqui apresentadas indicam também que estes peptídeos mimetizam a região compreendida entre os aminoácidos 155 e 172 da cadeia pesada do anticorpo monoclonal murino ACA125, e que, portanto podem estar mimetizando o antiidiotipo do CA125. Estes resultados apontam o peptídeo Synt1, sintetizado a partir do clone Seq.ID Nº 1 e desenhado para adquirir uma conformação tridimensional específica, capaz de se ligar a um dos subtipos do alelo HLA-DQ do complexo MHCII, como o principal clone obtido neste estudo.

4.4 Ensaios *in vitro* com o Antiidiotipo do CA125

Com a finalidade de determinar a atividade celular do peptídeo Synt1, procedeu-se com os testes *in vitro*, utilizando a linhagem tumoral de ovário OVCAR-3. A citotoxicidade do peptídeo sintético e provável antiidiotipo do CA125 foi avaliada utilizando-se como marcador o ensaio de redução do MTT. Nestas condições experimentais, o peptídeo Synt1 não causou efeitos citotóxicos para estas células, visto que a proliferação celular esteve sempre próxima a 100%, independente da concentração utilizada de peptídeo, quando comparado ao experimento controle, no qual não existia a presença do mesmo (Figura 9).

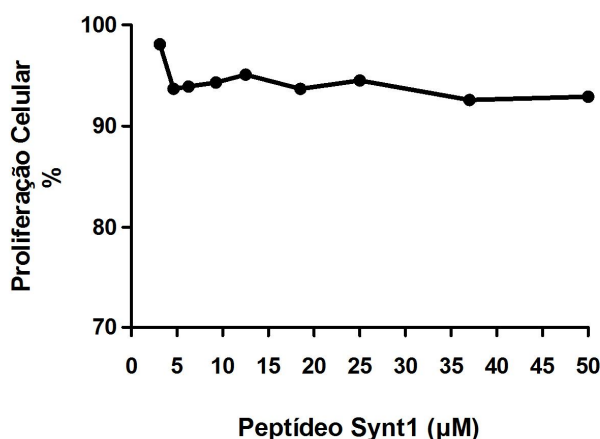


Figura 9: Efeito do peptídeo Synt1 na proliferação de células OVCAR-3 pelo ensaio de MTT *in vitro*. Células da linhagem de carcinoma ovariano OVCAR-3 foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) em placas de 96 poços (2×10^5 células/poço). As quantidades do peptídeo sintético Synt1 testadas foram de 50µM; 37µM; 25µM; 18,5µM; 12,5µM; 9,25µM; 6,25µM; 4,63µM e 3,12µM. 100% de proliferação correspondem à proliferação celular determinada para as células cultivadas em meio de cultura sem peptídeo.

O mesmo peptídeo Synt1 foi avaliado quanto sua atividade *in vitro* em experimentos com a linhagem celular de macrófagos murinos J774A.1. A Figura 10 apresenta os resultados obtidos nos ensaios de proliferação celular utilizando-se como marcador o ensaio de redução do MTT.

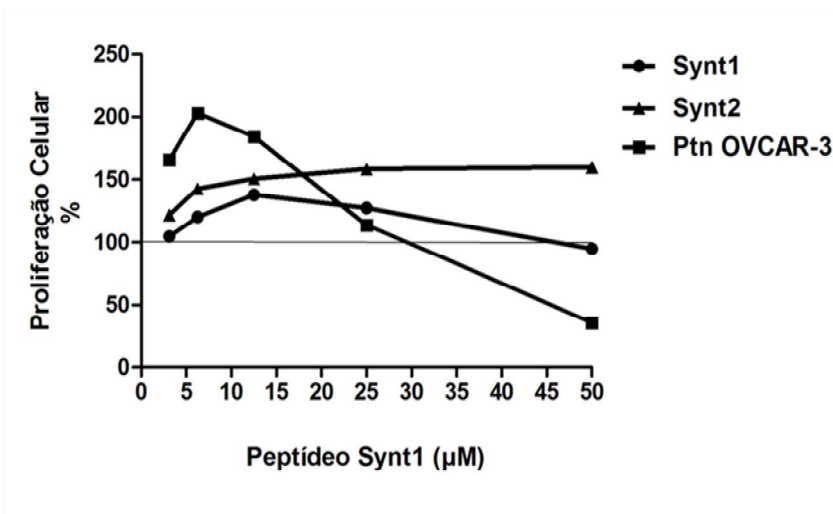


Figura 10: Efeito dos peptídeo Synt1 e Synt2 na proliferação da linhagem celular de macrófagos murinos J774A.1, pelo ensaio de MTT *in vitro*. A linhagem de macrófagos foi cultivada em meio RPMI 1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) em placas de 96 poços (1×10^5 células/poço). As quantidades dos peptídeos Synt1 e Synt2 testadas foram de 50µM; 25µM; 12,5µM; 6,25µM e 3,12µM. 100% de proliferação correspondem à proliferação celular determinada para as células cultivadas em meio de cultura sem peptídeo. A cultura celular de macrófagos também foi tratada com extrato protéico da linhagem tumoral de ovário OVCAR-3, nas quantidades de 68µg, 34µg, 17µg 8,5µg e 4,25µg, correspondentes às quantidades em µM utilizadas para os peptídeos sintéticos.

Os resultados aqui demonstrados indicam que os tratamentos de macrófagos com os peptídeos Synt1 e Synt2 induziram à proliferação celular, visto que somente as células viáveis reduzem o MTT (amarelo) para o formazan (azul). A proliferação celular esteve superior a 100% em todas as quantidades testadas dos peptídeos, com exceção do peptídeo Synt1, que na maior dose avaliada (50µM), a proliferação celular foi reduzida para 94,6%, quando comparada ao experimento controle, no qual não existia a presença dos peptídeos. Este comportamento foi semelhante ao apresentado pelo extrato protéico da linhagem tumoral de ovário OVCAR-3. Nas quantidades de 4,25µg a

34 μ g observou-se uma intensa proliferação celular, no entanto, em doses muito elevadas (68 μ g) o extrato mostrou ser tóxico para as células, reduzindo a proliferação celular para 36%.

A Figura 11 apresenta os resultados de produção de óxido nítrico, estimado como nitrito, pela linhagem celular de macrófagos tratados com os peptídeos Synt1 e Synt2. Os macrófagos tratados com 50 μ M do peptídeo Synt1 induziram um aumento significativo nas concentrações de nitrito quando comparadas ao grupo controle (tratamento com PBS) com valor de $p < 0,05$. O mesmo comportamento foi observado nos tratamentos com menores quantidades de peptídeo, porém, com diferenças não significativas.

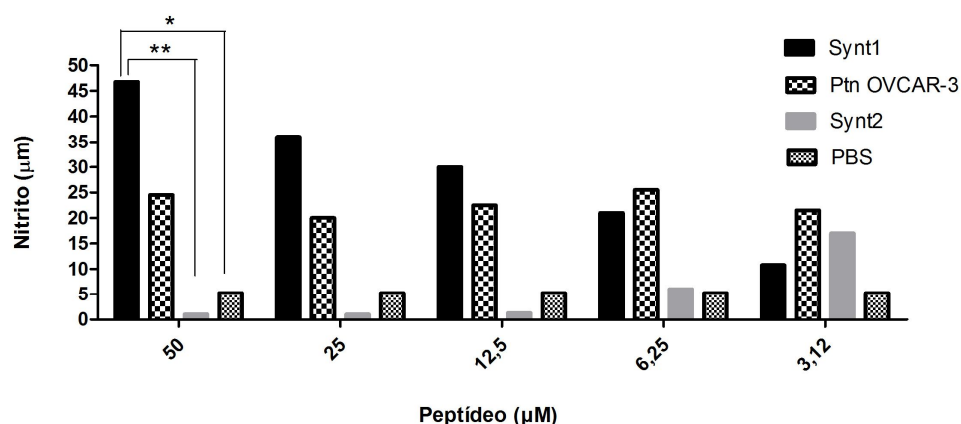


Figura 11: Produção de óxido nítrico (NO) estimado como nitrito, por células de macrófagos J774A.1 tratadas com os peptídeos Synt1 e Synt2 nas quantidades de 50 μ M; 25 μ M; 12,5 μ M; 6,25 μ M e 3,12 μ M. Como controle negativo foi utilizado o diluente dos peptídeos (PBS) para tratamento dos macrófagos. A cultura celular de macrófagos também foi tratada com extrato protéico da linhagem tumoral de ovário OVCAR-3, nas quantidades de 68 μ g, 34 μ g, 17 μ g 8,5 μ g e 4,25 μ g, correspondentes às quantidades em μ M utilizadas para os peptídeos sintéticos. Os testes foram realizados em triplicata e analisados pelo teste de variância (one-way-ANOVA), seguido pelo teste de Bonferroni: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$;

O tratamento de macrófagos com o peptídeo Synt1 apresentou diferenças significativas ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo tratado com o peptídeo Synt2, na quantidade de 50 μ M. Este último peptídeo induziu a uma redução na produção de óxido nítrico pelos macrófagos tratados quando comparados ao

grupo controle (tratamento com PBS) nas quantidades de 50 μ M, 25 μ M e 12,5 μ M, porém não consideradas estatisticamente significantes. Na menor dose testada para o peptídeo Synt2 (3,12 μ M) observou um aumento na produção de nitrito quando comparada ao grupo controle (PBS), porém não estatisticamente significativa.

Os resultados obtidos no tratamento de macrófagos com o extrato protéico da linhagem tumoral de ovário OVCAR-3, indicou uma indução na produção de óxido nítrico em todas as quantidades testadas, porém também não consideradas estatisticamente significativas.

4.5 Seleção de anticorpos Fab

A seleção de fagos obtidos na biblioteca combinatorial Fab apresentou um enriquecimento no número de clones eluídos do primeiro para o segundo ciclo. A detecção de moléculas solúveis utilizando o anticorpo anti-HA nos ensaios de ELISA evidenciou a presença da região VH, uma vez que o epítipo de hemaglutinina encontra-se fusionado a essa cadeia.

4.5.1 Anticorpos Fab específicos ao antiidiotipo do CA125

Dos 47 clones selecionados no *biopanning*, 4 deles produziram Fab na forma solúvel e apresentaram maior reatividade nos ensaios de ELISA, sendo considerados clones específicos e ligantes ao peptídeo sintético Synt1, denominados de FabA1, FabA6, FabH1 e FabH4, como mostra a Figura 12.

Destes quatro clones, apenas um (FabA6) teve sua sequência de VH parcialmente sequenciada e foi identificado como pertencente à família IGHV4-34*11. O clone de Fab específico à proteína total de *Leishmania amazonensis*, utilizado como controle negativo do experimento, demonstrou baixa reatividade, confirmando nossos resultados, de que a seleção de anticorpos recombinantes Fab, ligantes específicos ao peptídeo Synt1, mimético ao antiidiotipo do CA125, foi eficiente.

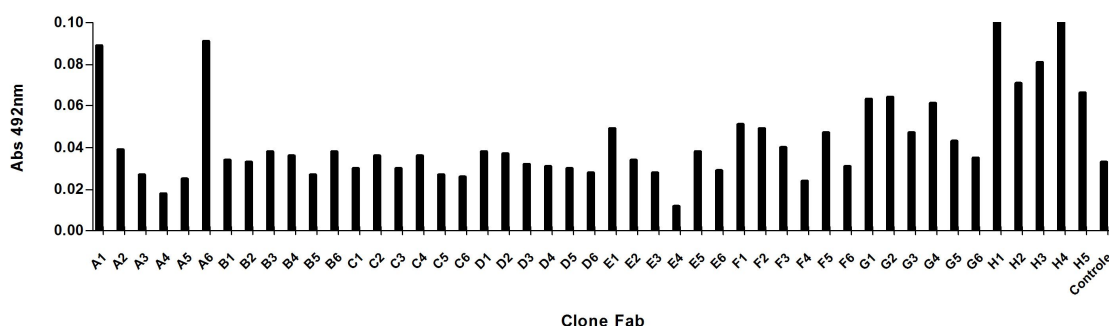


Figura 12: Reatividade dos clones selecionados pelo *biopanning*, expressando anticorpos recombinantes Fab na forma solúvel e ligantes específicos ao peptídeo Synt1. A reatividade dos clones foi detectada nos ensaios de ELISA pela ligação ao anticorpo anti-HA que evidencia a presença da região VH do anticorpo recombinante Fab. Como controle negativo, utilizou-se um clone produzindo Fab específico à proteína total de *Leishmania amazonensis*.

4.5.2 Anticorpos Fab específicos a antígenos tumorais de câncer de ovário

Ensaio de ELISA permitiram uma abordagem rápida da produção, secreção e reatividade dos anticorpos Fab reativos a proteínas tumorais de ovário. Dos 45 clones obtidos no *biopanning*, 18 foram selecionados como anticorpos específicos a antígenos tumorais. No entanto, estes clones foram ainda analisados quanto à sua reatividade com proteínas de tumores benignos e proteínas ovarianas não tumorais, sendo obtidos valores para a razão entre maligno/benigno e maligno/controle como mostra a Figura 13. Do total de 18 clones analisados, apenas 1 clone apresentou razão entre tumor maligno e tumor benigno maior que 3, sendo considerado positivo (FabPtnG4) e como um anticorpo Fab ligante específico a proteínas tumorais de câncer de ovário. Os clones de Fab (FabPtnD1; FabPtnD3; FabPtnD4 e FabPtnH1) foram selecionados por apresentarem razão entre tumor maligno e controle maiores que 3.

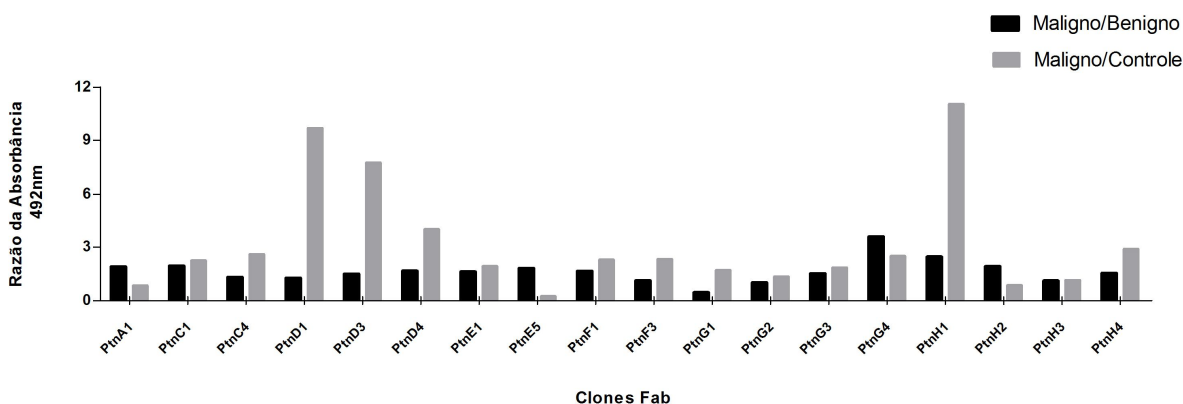


Figura 13: Ensaio de ELISA representando a razão da absorbância dos clones selecionados pelo *biopanning*, expressando anticorpos recombinantes Fab na forma solúvel, entre proteínas tumorais de ovário e proteínas de tumores benignos (maligno/benigno), e entre proteínas tumorais malignas e entre proteínas não tumorais (maligno/controle). Os resultados aqui demonstrados indicam a reatividade dos clones de Fab selecionados, ligantes específicos a proteínas tumorais malignas de ovário. A reatividade dos clones foi detectada pela ligação ao anticorpo anti-HA que evidencia a presença da região VH anticorpo recombinante Fab. As amostras que apresentaram razão das absorbâncias maiores que 3 foram consideradas positivas.

Os 18 clones de anticorpos Fab selecionados, ligantes a proteínas tumorais de ovário, foram analisados quanto à sua reatividade com o peptídeo Synt1, mimético ao antiidiotipo do CA125. Os resultados demonstrados na Figura 14 indicam a seleção de 7 clones que apresentaram maior reatividade ao peptídeo sintético, sendo que entre estes, o clone mais reativo foi o FabPtnG1. O clone de Fab específico à proteína total de *Leishmania amazonensis*, não demonstrou reatividade, confirmando a especificidade dos anticorpos obtidos no *biopanning*. Entre os 7 clones selecionados, 3 deles (FabPtnD1; FabPtnD3; FaPtnD4) também mostram serem anticorpos específicos a antígenos tumorais de ovário, e portanto, clones Fab de grande interesse neste estudo.

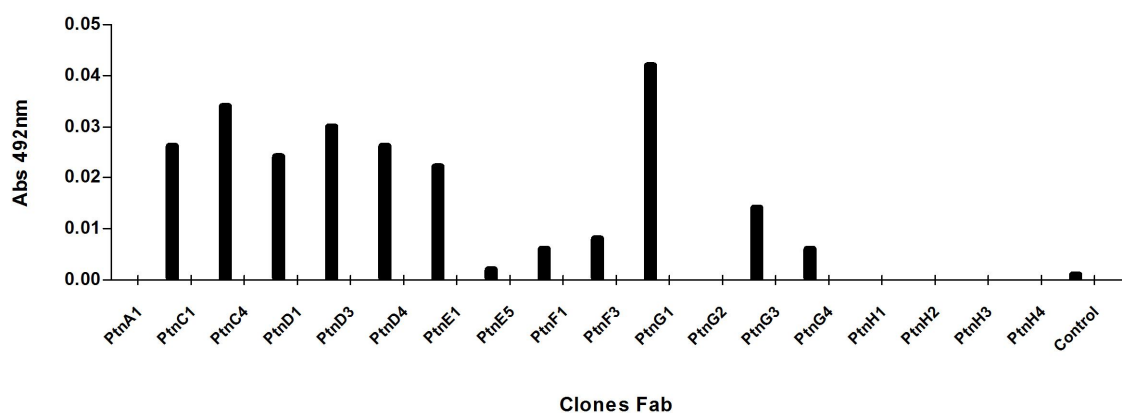


Figura 14: Reatividade dos clones selecionados pelo *biopanning*, expressando anticorpos Fab ligantes a antígenos tumorais de ovário, ao peptídeo Synt1. A reatividade dos clones foi detectada nos ensaios de ELISA pela ligação ao anticorpo anti-HÁ, que evidencia a presença da região VH anticorpo recombinante Fab. Como controle negativo da reação utilizou-se um clone produzindo Fab específico à proteína total de *Leishmania amazonensis*.

Os resultados aqui apresentados, indicam que foi possível a seleção de anticorpos recombinantes Fab, específicos a antígenos tumorais de ovário, e que também apresentaram serem ligantes específicos ao peptídeo Synt1, o qual mostrou ser mimético ao antígeno CA125 e de seu auto-anticorpo antiidiotipo, confirmando assim, os dados obtidos neste trabalho.

4.6 Peptídeos recombinantes miméticos no diagnóstico do câncer de ovário

Imunoglobulinas G (IgGs) circulantes contra antígenos sorológicos de câncer de ovário foram detectadas pelos clones Seq.ID N° 3 e Seq.ID N° 1, em todas as amostras de pacientes com carcinoma ovariano (n=34) e também em pacientes com tumores benignos de ovário (n=24). No entanto, as análises revelaram um aumento significativo nos níveis de IgGs detectadas no soro de pacientes malignos (casos malignos e casos borderline) quando comparado às amostras de pacientes com tumores benignos ($p = 0,017$ e $p = 0,004$ respectivamente). Os resultados obtidos para a absorvância relativa de cada clone em soro de pacientes malignos x benignos estão apresentados na Figura 15.

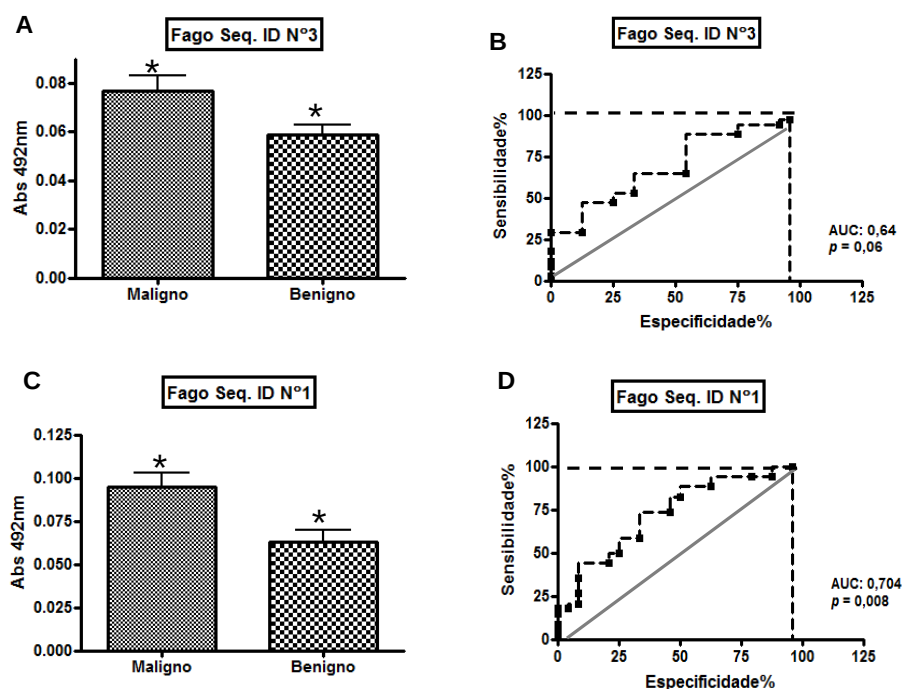


Figura 15: Absorvância relativa dos fagos selecionados ligantes a IgGs sorológicas de pacientes com câncer de ovário. (A e C) O diagrama representativo mostra um aumento estatisticamente significativo dos fagos na detecção de IgGs em soro de pacientes com tumor maligno (24 casos malignos e 10 borderlines) em relação a pacientes com tumores benignos (24 casos benignos). (A) Seq.ID N° 3, $p = 0,017$ (C) Seq.ID N° 1, $p = 0,004$. (B e D) Curva ROC combinada aos diagramas indicando a eficiência do diagnóstico por meio de AUC e respectivos valores de p . A linha pontilhada com pontos e sólida em cinza ilustram a absorvância de cada clone e o valor de referência, respectivamente. Foi utilizado o teste T não pareado com correções de Welch's para comparar as absorvâncias dos fagos entre os grupos analisados: * $p < 0,05$.

Os resultados demonstrados na Figura 15 (A e C) indicam que os ensaios de *Phage*-ELISA revelaram que a absorbância relativa dos clones Seq.ID N° 3 é 1,3 vezes maior em pacientes com tumores malignos que em mulheres com tumores benignos de ovário. Para o clone Seq.ID N° 1, a absorbância relativa é 1,5 vezes maior para pacientes com casos malignos. O valor diagnóstico do teste foi avaliado pela análise da curva ROC que revelou o valor de AUC = 0,64 (95% IC; 0.49 – 0.78) para o clone Seq.ID N° 3 e valor de AUC = 0,70 (95% IC; 0.56 – 0.83) para o clone Seq.ID N° 1. (Fig.15B e 15D). Os fagos Seq.ID N° 3 e Seq.ID N° 1 também foram eficazes na discriminação de tumores malignos de ovário (n=24), tumores benignos (n=24) e tumores malignos borderline, com baixo potencial maligno (n=10). A Figura 16 apresenta os resultados obtidos com estes dois clones e revelam um poder discriminativo significativo ($p = 0,034$ e $p = 0,023$, respectivamente) entre os tumores malignos, benignos e borderline.

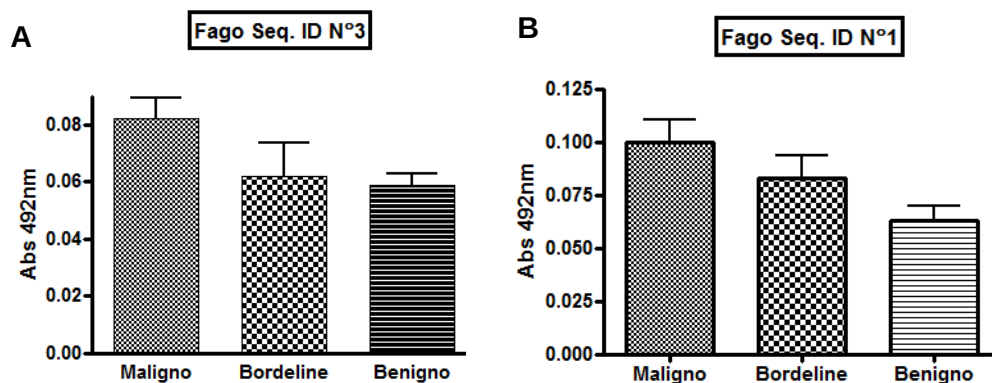


Figura 16: Absorbância relativa dos fagos selecionados, ligantes a IgGs sorológicas de pacientes com câncer de ovário, em relação a tumores malignos (24 amostras), bordelines (10 amostras) e benignos (24 amostras). (A) Diagrama representativo mostrando poder discriminativo significativo ($p = 0,034$) do fago Seq.ID N° 3 para os tumores. (B) Diagrama representativo mostrando poder discriminativo significativo ($p = 0,023$) do fago Seq.ID N° 1. Nas análises estatísticas foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis devido à distribuição não paramétrica dos dados.

Neste estudo também foi analisado o poder diagnóstico dos peptídeos sintéticos (Synt1 e Synt2). O peptídeo Synt1, que é deduzido da sequência de DNA do fago Seq. ID N^o1, com algumas modificações, mostrou-se eficiente em discriminar significativamente as amostras de soros de pacientes com tumores malignos (n=24) das amostras com tumores borderline (n=10), apresentado um valor de $p = 0,032$. Os resultados obtidos para a absorbância relativa do peptídeo sintético em soro de pacientes malignos x borderline estão apresentados na Figura 17. As análises estatísticas indicam que a absorbância relativa é 1,9 vezes maior em pacientes com tumores malignos que em mulheres com tumores classificados como borderline. O valor diagnóstico do teste foi avaliado pela curva ROC que revelou o valor de $AUC = 0,70$ (95% IC; 0.51 – 0.87) (Fig. 17B). O peptídeo Synt2 não apresentou reatividade ao soro (IgGs) das pacientes utilizadas neste trabalho.

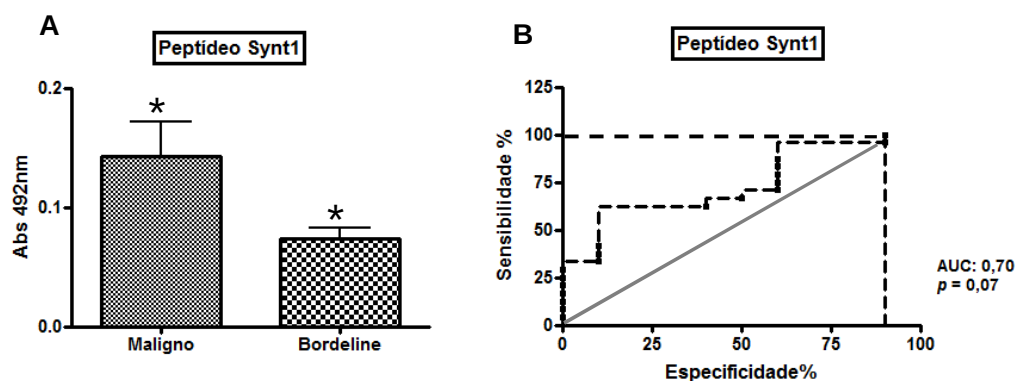


Figura 17: Absorbância relativa do peptídeo sintético Synt1, ligante a IgGs sorológicas de pacientes com câncer de ovário, em relação a tumores malignos (24 amostras) e borderlines (10 amostras). (A) Diagrama representativo mostrando poder discriminativo significativo ($p = 0,032$) do peptídeo Synt1 para os tumores. (B) Curva ROC combinada ao diagrama indicando a eficiência do diagnóstico por meio de AUC e valor de p . A linha pontilhada com pontos e sólida em cinza ilustram a absorbância do peptídeo e o valor de referência, respectivamente. Foi utilizado o teste T não pareado com correções de Welch's, para comparar as absorbâncias do peptídeo entre os grupos analisados.

O perfil clínico e histopatológico dos pacientes com tumores malignos de ovário, e suas associações com a capacidade de detecção de IgGs circulantes pelos marcadores selecionados neste estudo, encontram-se descritos na Tabela 07. Nesta tabela, também estão sumarizados as análises estatísticas anteriormente citadas pelos fagos Seq.ID N° 3, Seq.ID N° 1 e pelo peptídeo sintético Synt1. Análises comparativas indicaram que estes marcadores conseguem detectar a presença de IgGs em todos os estadiamentos e tipos histológicos de tumores malignos de ovário. Não obteve-se resultados discriminativos significativos entre tumores epiteliais e não-epiteliais de ovário. Os marcadores Seq.ID N° 3, Seq.ID N° 1 e Synt1 não apresentaram diferenças significativas na distinção entre amostras com estadiamentos distintos do carcinoma ovariano.

Tabela 7: Correlação entre as absorbâncias dos marcadores identificados por fagos Seq.ID N° 3, Seq.ID N° 1 e pelo peptídeo sintético Synt1, e o perfil clínico e histopatológico do câncer de ovário.

Variáveis	Número de casos (%)	Abs relativa do fago Seq.ID N 03	Valor de p	Abs relativa do fago Seq.ID N 01	Valor de p	Abs relativa do peptídeo Synt1	Valor de p
Tumor							
Maligno	41,4	0,082	0,034*	0,100	0,023*	0,142	0,192
Bordeline	17,2	0,062		0,083		0,074	
Benigno	41,4	0,058		0,063		0,120	
Classificação Maligno x Benigno							
Tumor Maligno (maligno + bordeline)	58,6	0,077	0,017*	0,095	0,004*	0,122	0,924
Tumor benigno	41,4	0,059		0,062		0,120	
Casos Malignos							
Tumor Maligno	70,6	0,082	0,161	0,100	0,272	0,143	0,032*
Tumor Bordeline	29,4	0,062		0,083		0,074	
Tipos Histopatológicos Malignos							
Epitelial	75,0	0,094	0,400	0,093	0,446	0,149	0,618
Não-epitelial	25,0	0,118		0,118		0,125	
Estadiamento							
I	55,9	0,086	0,576	0,092	0,237	0,109	0,959
II	8,82	0,095		0,180		0,117	
III	29,4	0,078		0,092		0,197	
IV	5,88	0,060		0,100		0,108	

*Valor de *p* significativo com um nível de probabilidade de 0,05.

Neste estudo, também foi avaliado o poder diagnóstico dos marcadores tumorais CA125 e CEA (antígeno carcinoembriogênico) e que são utilizados na clínica médica. Quando se comparou a dosagem sérica destes marcadores tumorais no pré-operatório, observou-se que a média de ambos os antígenos eram maiores que os valores considerados como *cutoff*, ou ponto de corte, estabelecidos na clínica médica (35 U/mL para o CA125 e 5,0 ng/mL para o CEA) tanto para pacientes com tumores malignos como para pacientes com tumores benignos, como é mostrado na Tabela 8.

Tabela 8: Dosagem sérica dos marcadores tumorais CA125 e CEA para pacientes com tumor maligno de ovário, tumor borderline e tumor benigno de ovário.

VARIÁVEIS	Maligno			Borderline			Benigno		
	n (%)	CA125 (U/mL)	CEA (ng/mL)	n (%)	CA125 (U/mL)	CEA (ng/mL)	n (%)	CA125 (U/mL)	CEA (ng/mL)
Número de casos	24	871,01	16,3	10	76,16	3,48	24	56,52	7,39
estadio I	11 (45,8)	562,49	22,84	8 (80,0)	74,16	4,11	não	não	não
Ia	6 (54,5)	290,71	4,6	8	74,16	4,11			
Ib	1 (9,0)	375,7	98	0					
Ic	4 (36,3)	1016,85	26,8	0					
estadio II	2 (8,3)	631,47	3,15	1 (10,0)	128	1,13	não	não	não
IIa	1 (50,0)	1130,94	4,42	0					
IIb	1 (50,0)	132	1,87	1	128	1,13			
IIc	0			0					
estadio III	9 (37,5)			1 (10,0)	35,5	0,73	não	não	não
IIIa	0			1	35,5	0,73			
IIIb	0			0					
IIIc	9 (100,0)	1205,66	14,38	0					
estadio IV	2 (8,3)	1301,5	6,1	0			não	não	não

No entanto, o marcador CA125 mostrou-se eficaz na distinção entre os tumores malignos e benignos ($p = 0,0031$). O valor diagnóstico do teste foi avaliado pela análise da curva ROC que revelou o valor de AUC = 0,74 (95% IC; 0.69 – 0.87) (Figura 18). Quando estes resultados são comparados aos valores obtidos com os marcadores Seq.ID N° 3 e Seq.ID N° 1, observa-se que este último clone também apresentou altos valores discriminativos para tumores

malgnos e benignos ($p = 0,004$). A análise da curva ROC revelou valor de AUC = 0,70 para o clone Seq.ID N° 1 e valor de AUC = 0,64 para o clone Seq.ID N° 3 (Figura 18). Já em relação ao CEA, os resultados obtidos com este marcador, na distinção entre tumores malignos e benignos não se mostraram significativos ($p = 0,4$). O valor diagnóstico do teste também foi avaliado pela curva ROC e revelou o valor de AUC = 0,60 (95% IC; 0,45 – 0,75) (Figura 18). Tanto o clone Seq.ID N° 3 como o clone Seq.ID N° 1 apresentaram poder discriminativo entre tumores malignos e benignos de ovário superiores a este marcador ($p = 0,017$ e $p = 0,004$ respectivamente).

Nenhum desses marcadores (CA125 e CEA) apresentaram resultados significativos na distinção entre os estadiamentos clínicos nos testes estatísticos aplicados. Comportamento semelhante foi apresentado pelos marcadores Seq.ID N° 3, Seq.ID N° 1 e peptídeo Synt1, identificados neste trabalho.

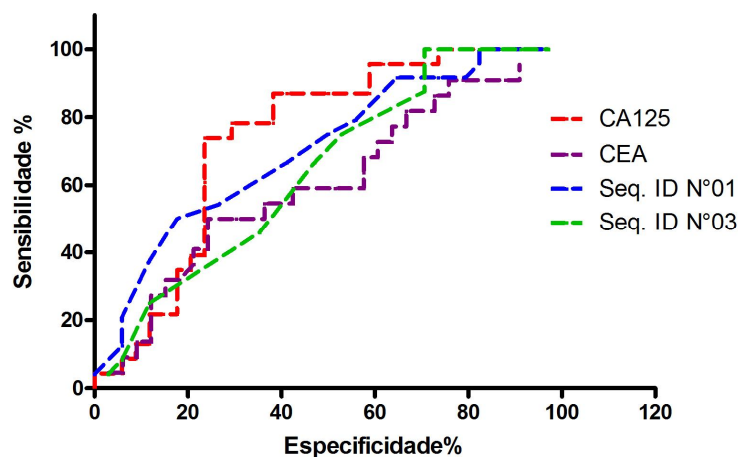


Figura 18: Comparação dos valores das áreas abaixo das curvas ROC ou índices de AUC para os testes de diagnóstico entre tumores malignos ($n=34$) e tumores benignos de ovário ($n=24$), comparando os marcadores CA125 e CEA, comumente utilizados na clínica médica e os fagos Seq.ID N° 3 e Seq.ID N° 1. CA125 (AUC= 0,74 95% IC: 0,60-0,87); CEA (AUC= 0,60 95% IC: 0,44-0,75); Seq.ID N° 1 (AUC= 0,70 95% IC: 0,57-0,83); Seq.ID N° 3 (AUC= 0,64 95% IC: 0,45-0,78).

A especificidade, sensibilidade e acurácia dos marcadores selecionados neste estudo foram analisadas e estão compiladas na Tabela 12. Os resultados demonstram que os marcadores aqui selecionados apresentam melhor especificidade dos testes de diagnóstico que o antígeno CA125, porém com menor sensibilidade. Em relação ao marcador CEA, os marcadores selecionados neste estudo (Seq.ID Nº 3 e Seq.ID Nº 1) apresentaram sensibilidade superior. Tanto para o CA125 como para o CEA, os valores considerados como *cutoff* ou ponto de corte foram os estabelecidos na clínica médica (35 U/mL para o CA125 e 5,0 ng/mL para o CEA).

A análise da Tabela 12 ainda demonstra que a combinação dos marcadores CA125/Fago Seq.ID Nº 3 e CA125/Fago Seq.ID Nº 1 aumentam consideravelmente a especificidade dos testes de diagnóstico entre tumores malignos e tumores benignos de ovário. Os marcadores selecionados neste estudo como peptídeos miméticos a antígenos tumorais de câncer de ovário podem melhorar o valor diagnóstico do CA125.

Tabela 9: Sensibilidade, especificidade e acurácia dos testes de diagnósticos para CA125, fago Seq.ID Nº 3, Seq.ID Nº 1, peptídeo sintético Synt1, CEA e os marcadores combinados.

VARIÁVEIS	CA125	Fago Seq ID Nº3	Fago Seq ID Nº1	Peptídeo Synt1	CEA	CA125 + Fago Seq ID Nº3	CA125 + Fago Seq ID Nº1
Sensibilidade	76,4%	47,1%	35,3%	26,5%	29,4%	38,2%	29,4%
Especificidade	75,0%	79,2%	79,2%	66,7%	83,4%	91,7%	95,8%
Acurácia	75,8%	60,4%	53,5%	43,1%	51,7%	60,4%	56,9%

5 Discussão

5.1 Seleção de moléculas recombinantes e seu valor diagnóstico no câncer de ovário

Este trabalho descreve pela primeira vez na literatura, uma seleção por *Phage Display* de peptídeos ligantes a IgGs sorológicas e teciduais de pacientes diagnosticadas com câncer de ovário. Também identifica clones com similaridade com as principais proteínas e marcadores tumorais utilizados no diagnóstico deste tipo de câncer.

Os peptídeos selecionados, ligantes a IgGs sorológicas, apresentaram similaridade com proteínas consideradas alvos importantes para a imunoterapia e diagnóstico do câncer de ovário como: MUC1 (WANG *et al.*, 2011; THIE *et al.*, 2011; VAN ELSEN *et al.*, 2010), BRCA1 e BRCA2 (PRESS *et al.*, 2008; HENNESSY *et al.*, 2009; KAUFF, 2008), ErbB-1 (DE GRAEFF *et al.*, 2009), caderina-1 (FALEIRO-RODRIGUES, *et al.*, 2004; CHO *et al.*, 2006; SHIM *et al.*, 2009) e finalmente MUC16 (antígeno de carcinoma ovariano CA125) que é o marcador tumoral mais utilizado no câncer de ovário, (MARKMAN *et al.*, 2006; HOGDALL, 2008; GUPTA e LIS, 2009; PAN *et al.*, 2011). Dos 22 clones selecionados, todos apresentaram similaridade com o antígeno CA125. Tais informações demonstram a especificidade e o sucesso da seleção na busca de peptídeos miméticos a antígenos tumorais de ovário. Os dados aqui obtidos também demonstram a capacidade desses antígenos em ativar a resposta imune ao tumor, possibilitando o uso destes peptídeos como biomarcadores para o diagnóstico sorológico do câncer de ovário.

Os peptídeos selecionados ligantes a IgGs de proteínas tumorais de ovário apresentaram similaridades com as mesmas proteínas anteriormente citadas e ainda com outras três relacionadas ao carcinoma ovariano como: ErbB-2 (GADDUCCI *et al.*, 2009), OVCA2 (PROWSE *et al.*, 2002) e ERS1 (BARDIN *et al.*, 2004; LINDGREN *et al.*, 2004). Tais resultados confirmam os processos de seleção na busca de peptídeos miméticos a antígenos tumorais de câncer de

ovário, já que os mesmos ligantes de IgGs circulantes foram também encontrados em tecido específico, o que demonstra a resposta imune no próprio tumor.

A detecção precoce do câncer de ovário é um desafio na oncologia clínica, e detectá-lo em estágio inicial pode resultar em uma taxa de cura de 90% (CHATTERJEE *et al.*, 2006). Para esse efeito, temos desenvolvido uma abordagem de seleção de alto rendimento de biomarcadores com aplicações promissoras no câncer de ovário. Em contraste com a detecção de antígenos sorológicos, a detecção de anticorpos séricos contra antígenos do tumor pode fornecer um marcador sorológico mais confiável para o diagnóstico do câncer (NAORA *et al.*, 2001; SCANLAN *et al.*, 1998; SCANLAN *et al.*, 1999; STRUSS *et al.*, 2001), já que os anticorpos séricos são mais estáveis que os antígenos sorológicos. Além disso, os anticorpos podem ser mais abundantes que os antígenos, especialmente em baixa carga tumoral característica de estágios iniciais. Nosso trabalho buscou analisar auto-anticorpos contra antígenos associados ao tumor de ovário e demonstrou que os mesmos podem ser precisos biomarcadores para o diagnóstico da doença. Em estudos com endometrioma ovariano Yi *et al.* (2010) também determinaram que auto-anticorpos sorológicos contra antígenos associados a tumor (TAAs) podem ser utilizados como biomarcadores.

Alterações nos níveis de expressão gênica e expressão anormal de produtos de genes tecido-específico no câncer são fatores para o desenvolvimento de uma resposta imune humoral em pacientes diagnosticados positivamente. Neste contexto, a análise sorológica para detecção de IgGs contra antígenos tumorais do câncer de ovário, como propõe este estudo, é uma vertente promissora para o estudo e diagnóstico do carcinoma ovariano.

Estudos anteriores também utilizaram análises sorológicas de expressão em pacientes com carcinoma ovariano, utilizando uma biblioteca de cDNA expressa em fagos T7, identificando alguns antígenos tumorais relevantes para diagnóstico do câncer de ovário (CHATTERJEE *et al.*, 2006). A principal limitação da utilização do método baseado na expressão de cDNA é que as sequências gênicas identificadas não necessariamente refletem a funcionalidade das proteínas codificadas, em virtude da atividade transcricional tumoral, das diversas

interações proteína-proteína e modificações conformacionais, que podem alterar o padrão de proteínas encontrado na circulação.

Portanto, neste trabalho foi possível selecionar peptídeos ligantes a IgG de pacientes com câncer de ovário e que exibiram baixa ligação com IgGs circulantes de pacientes com tumores benignos de ovário e de mulheres saudáveis. O estudo mostra que a metodologia empregada foi eficaz para identificar o perfil molecular da resposta imune humoral no câncer de ovário e identifica 10 clones miméticos a antígenos tumorais de ovário com potencial para uso na imunoterapia e diagnóstico do carcinoma ovariano.

5.2 Análises comparativas entre os marcadores sorológicos sobre o aspecto epidemiológico do câncer de ovário

A falta de marcadores específicos para o carcinoma ovariano torna difícil atingir o objetivo clínico da detecção precisa por meio de métodos não-invasivos de triagem da doença. Assim, a identificação de outros marcadores específicos para o câncer de ovário é essencial para melhorar a capacidade de detectar com precisão as mudanças pré-malignas ou em fase inicial da doença em mulheres assintomáticas. No presente estudo, descrevemos a caracterização de peptídeos ligantes a IgGs que apresentam potencial aplicação como ferramenta clínica no rastreamento não invasivo do carcinoma ovariano apresentados como clones Seq.ID N° 1 e Seq.ID N° 3 e peptídeo Synt1.

Os resultados demonstrados neste estudo apontam dois fagos, Seq.ID N° 1 e Seq.ID N° 3, que apresentaram reatividade em todas amostras sorológicas testadas. No entanto, as análises revelaram um aumento significativo nos níveis de IgGs detectadas no soro de pacientes malignos (casos malignos e casos borderline) quando comparado aos pacientes benignos. Portanto, tais clones mostraram serem eficazes na triagem e distinção entre tumores malignos e benignos de ovário, o que é de extrema importância na clínica médica. Biomarcadores para o câncer de ovário têm sido aplicados para o monitoramento da resposta ao tratamento, para distinguir massas pélvicas malignas de benignas, para estimar o prognóstico, para monitorar a resposta a certos medicamentos e

na detecção de doença primária em fase inicial (BAST *et al.*, 2005). Como exemplos de biomarcadores em estudo para o câncer de ovário podemos citar o CA549, CASA (nível sérico de antígeno do câncer associado), CA19-9, CA15-3, MCA, MOV-1 e TAG72. Os marcadores de proliferação celular CYFRA21 e TPS-1 também foram explorados no carcinoma ovariano (MEYER e RUSTIN, 2000).

A estratégia atualmente em uso para o diagnóstico sorológico do câncer de ovário é a detecção do antígeno CA125 em mulheres com suspeita de câncer. As análises aqui empregadas demonstraram que os clones Seq.ID Nº 1 e Seq.ID Nº 3 apresentam similaridade com este antígeno. Os níveis séricos deste marcador são usados para monitorar recidivas, resposta a quimioterapia e a progressão da doença em pacientes com câncer de ovário (YIN e LLOYD, 2001). Os níveis de CA125 podem ser elevados no soro antes mesmo do desenvolvimento clínico primário e recorrente do carcinoma ovariano (BURGER *et al.*, 2004).

O que o presente estudo propõe é a utilização de marcadores que mimetizando o antígeno CA125 e outros antígenos tumorais, possam detectar a resposta humoral, gerada pela presença destes antígenos, no soro de pacientes, distinguindo de maneira significativa tumores malignos de tumores benignos de forma não invasiva, melhorando assim o poder discriminativo do CA125.

A possibilidade de mensuração da resposta imune humoral contra diferentes tipos de antígenos tumorais, por meio de testes sorológicos, tem despertado o interesse dos pesquisadores. Estudos como o de STEFATÍĆ *et al.* (2008) buscou identificar e validar novos marcadores para o antígeno cancerígeno ecPKA, os quais foram quantificados indiretamente por meio da detecção da presença de auto-anticorpos sorológicos, utilizando ensaios de ELISA. ANDERSON *et al.* (2010) analisaram o valor de auto-anticorpos séricos p53 (p53-AAB) como um biomarcador na detecção e no prognóstico do câncer de ovário e observou que estes anticorpos são detectados no soro de 42% dos pacientes com câncer seroso de ovário avançado.

Na clínica médica, além da necessidade de marcadores que possam distinguir de forma significativa tumores malignos e benignos, como é o caso de nossos clones, seria necessário marcadores que consigam discriminar entre os três tipos de tumores: malignos, benignos e bordelines. Sendo este último uma manifestação mais moderada da doença, seria necessário marcadores que

consigam distinguir entre tumores malignos e borderline, de forma não invasiva, antes que a paciente seja levada para a cirurgia. Com este propósito, nosso trabalho apresentou o peptídeo sintético Synt1 que mostrou valor significativo na distinção entre estes dois tipos de tumores, representando uma ferramenta potencial de grande aplicação na clínica médica.

Ao avaliar a dosagem sérica do marcador tumoral CEA no soro de pacientes com tumores ovarianos ginecológicos, observou-se que este marcador não foi eficaz na distinção entre tumores malignos e benignos de ovário. No entanto, é comumente utilizado na clínica média para complementar o valor diagnóstico do antígeno CA125. Desta maneira, torna-se clara a necessidade da descoberta de novos biomarcadores que possam contribuir no diagnóstico da doença. Uma série de outros potenciais biomarcadores de câncer de ovário tem sido identificados, mas a maioria ainda está sem valor clínico estabelecido (KUK *et al.*, 2010).

A disponibilidade de imunoensaios de confiança, tal como os desenvolvidos neste estudo para detectar resposta humoral contra antígenos tumorais de ovário, como o CA125, no soro de pacientes com suspeita de câncer, pode facilitar mais estudos para estabelecer a utilidade clínica destes marcadores no câncer de ovário. Atualmente, aceita-se que nenhum biomarcador de câncer pode, sozinho, fornecer todas as informações necessárias para um diagnóstico ideal. A tendência atual é a identificação de múltiplos biomarcadores que podem ser utilizados em combinação e melhorar as expectativas de tratamento.

5.3 Implicações da resposta imune no desenvolvimento do câncer de ovário

Phage Display é uma tecnologia amplamente aplicada na identificação de novos receptores, ligantes naturais e na descoberta de novas drogas, bem como para a concepção de vacinas (YIP e WARD, 1999; SCOTT e SMITH, 1990; AINA e SROKA, 2002; SAMOYLOVA *et al.*, 2006; LANDON e DEUTSCHER, 2003; LANDON *et al.*, 2004; UCHIYAMA *et al.*, 2005). Quando um anticorpo é usado em uma seleção por afinidade, os peptídeos selecionados pela biblioteca de peptídeos randômicos são miméticos aos epítomos do antígeno natural

correspondente. Estes peptídeos são capazes de induzir a produção de novos anticorpos que reagem com o epítopo natural, mesmo que o animal nunca tenha sido diretamente exposto a ele (LIU *et al.*, 2009). Para confirmar esse mimetismo preconizado pela técnica de *Phage Display* utilizamos várias ferramentas de bioinformática, as quais nos demonstraram o alinhamento de 10 dos 41 peptídeos selecionados com a proteína CA125 na posição 11850 a 11900. A região compreendida entre os aminoácidos 11852 e 11895, identificada por Seq. ID Nº 85 demonstrou ser a principal região de similaridade da proteína CA125 com alguns dos peptídeos aqui mencionados e, portanto alvo de bastante interesse neste trabalho, sugerindo esta região como um provável epítopo. A mesma sequência de aminoácidos foi ainda predita como sendo uma possível região estimuladora na produção de anticorpos.

Geralmente, o epítopo pode ser um fragmento linear ou região conformacional. Epítomos lineares correspondem à sequência ordenada de aminoácidos nas proteínas. No entanto, em epítomos conformacionais (mimetopos), sequências de regiões da proteína não-sequencial na estrutura primária contribuem para um único sítio tridimensional. Seleção de peptídeos por *Phage Display* pode ser uma forma simples e conveniente para descobrir não apenas epítomos lineares, mas também epítomos conformacionais. As análises *in silico*, realizadas neste estudo, confirmaram nossas expectativas e demonstraram o sucesso na seleção de epítomos conformacionais do CA125.

Apesar dos significativos avanços nas formas de tratamento atualmente em uso, o câncer de ovário apresenta uma probabilidade de recidiva em cerca de 70% dos casos (OZOLS *et al.*, 2003). Como resultado, diferentes estratégias de tratamentos imunoterápicos estão sendo explorados (KIRBY *et al.*, 2002). Uma delas é a vacinação com anticorpos antiidiotipos (Ab2). Estes anticorpos podem substituir com êxito os antígenos tumorais em estratégias de vacinação, desencadeando resposta imune humoral e celular contra o antígeno original (BHATTACHARY-CHATTERJEE *et al.*, 2000). Estudos clínicos com mAbs murinos antiidiotipo (anti-Id) têm demonstrado que a indução de anticorpos específicos por vacinas de anti-Id está associado com a sobrevida prolongada dos pacientes em casos de melanoma maligno (MITTLEMAN *et al.*, 1994; FOON *et al.*, 2000) e câncer colorretal avançado (FOON *et al.*, 1995; FOON *et al.*, 1999).

Outros estudos confirmaram essas observações para o tratamento de carcinoma ovariano avançado utilizando o mAb anti-Id ACA125 como vacina (WAGNER *et al.*, 1997; WAGNER, 1998; WAGNER *et al.*, 2001).

A imunização ativa com antígenos tumorais é limitada pela sua baixa imunogenicidade e pela condição debilitada do sistema imune dos pacientes com tumor. Por outro lado, mAb anti-Id ACA125, que mimetiza o antígeno CA125, pode induzir a resposta contra seu antígeno original com a produção de anticorpos específicos anti-anti-Id CA125 (Ab3) como demonstrado em modelos animais (SCHLEBUSCH *et al.*, 1995) e em ensaios clínicos (WAGNER *et al.*, 1997; WAGNER, 1998; WAGNER *et al.*, 2001; REINARTZ *et al.*, 2003).

Este estudo aponta o clone Seq.ID Nº1 e sugere que, por meio da metodologia de *Phage Display*, foi possível a seleção de um peptídeo de 12 aminoácidos que, além de mimetizar uma pequena região da proteína CA125, seu provável epítipo, foi também capaz de mostrar similaridade da sua estrutura com a cadeia pesada do anticorpo monoclonal murino ACA125. Baseando-se na teoria de Niels Jerne (JERNE, 1974), segundo a qual um antiidiotipo (Ab2) de um antígeno é funcionalmente mimético à estrutura tridimensional deste mesmo antígeno, e que a imunização seletiva com o Ab2 pode induzir uma resposta imune específica contra o antígeno original, podemos sugerir, que no presente trabalho, foi possível a seleção de um peptídeo mimético ao antiidiotipo ACA125.

As análises *in vitro* com linhagens celulares revelaram que os peptídeos obtidos sinteticamente neste trabalho, induziram a proliferação e ativação celular de macrófagos. Estas células, quando ativadas são capazes de reconhecer, ligar e subsequentemente eliminar células tumorais (KLIMP *et al.*, 2002). Chen *et al.* (2003) demonstraram que em macrófagos co-cultivados com células cancerosas de pulmão (CL1-5), pode ocorrer a expressão de IL-8. A expressão de IL-8 por macrófagos cultivados com células tumorais sugere que estas células possam estimular células inflamatórias para expressar fatores angiogênicos e promover o crescimento do tumor (WHITE *et al.*, 2001). Cortes histológicos de diferentes tumores podem apresentar infiltrados de macrófagos (TIM⁺s), como nos casos de câncer de ovário (ORRE e ROGERS, 1999) e câncer de mama (QIAN *et al.*, 2009), e tem sido associados com a expressão de VEGF e fator de crescimento epidermal (EGFR) pelas células cancerígenas, levando à formação de vasos

sanguíneos. Além da produção de citocinas, os macrófagos ativados desencadeiam o *burst* respiratório, ou seja, a síntese de espécies reativas do oxigênio e a produção de óxido nítrico (NO), respostas bioquímicas de duas vias oxidativas diferentes, por meio das quais os macrófagos ativados matam as células tumorais (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). No entanto, o óxido nítrico produzido por macrófagos associados a tumores (TAM) desenvolve angiogênese tumoral (MacMICKING *et al.*, 1997).

Na busca de novas metodologias de tratamento do câncer de ovário, a resposta imunológica contra o tumor pode ser um alvo promissor, especialmente com estudos recentes que têm associado diversos elementos do sistema imune com o prognóstico do carcinoma ovariano. Entre eles destacam-se os relatos de vários epítomos derivados de NY-ESO-1 apresentados pelos alelos HLA-DRB1 * 0401, HLA-DRB4 * 0101 e HLA-DP4 capazes de estimular células T CD4⁺ (JÄGER *et al.*, 2000; ZAROOUR *et al.*, 2000; ZAROOUR *et al.*, 2002; ZENG *et al.*, 2000; ZENG *et al.*, 2001; FENG *et al.*, 2004). Estes alelos do complexo MHC classe II são particularmente importantes, com evidências crescentes de ambos em estudos com humanos e animais, sugerindo que as células T CD4⁺ são necessárias para a geração e manutenção de uma resposta imune antitumoral (ZEN *et al.*, 2001).

Os peptídeos ligantes a moléculas do MHC classe II são apresentados para as células T helper CD4⁺, as quais são cruciais, tanto para a resposta humoral como para a imunidade mediada por células. Por conseguinte, peptídeos ligantes a moléculas MHC classe II podem ser de extrema importância no desenvolvimento de vacinas potenciais (GOWTHAMAN e AGREWALA, 2008). Nas análises aqui realizadas, o peptídeo sintético Synt1 (deduzido a partir da sequência do clone Seq.ID N°1) foi predito como um forte ligante a um dos subtipos do alelo HLA-DQ (HLA-DQA10501-DQB10301), mas que também apresentou ligação a um dos subtipos do alelo HLA-DR (HLA-DRB10701). Interessantemente, nenhuma ligação aos alelos do complexo MHC classe I foi detectada. Desta forma, ligando-se a moléculas MHCII, o peptídeo Synt1 pode ser apresentado a Linfócitos T CD4⁺ e induzir uma resposta imune específica ao tumor. Os dados até aqui apresentados sugerem que sendo o peptídeo Synt1, mimético ao antiidiotipo ACA125, ele também pode induzir a produção de um

Ab3, o qual pode se ligar ao antígeno, levando a uma resposta imune contra o tumor, como é demonstrado na Figura 19.

A apresentação de fragmentos de anticorpos na superfície de fagos filamentosos, por meio de sua fusão à proteína pIII do capsídeo viral e seleção de fagos contra potenciais antígenos, tem-se mostrado uma ferramenta poderosa na obtenção de anticorpos a partir do repertório gênico das cadeias variáveis, os quais apresentam, assim, especificidade de ligação pré-definida (GRIFFITHS *et al.*, 1994). Bibliotecas de anticorpos obtidas por *Phage Display* têm sido usada para gerar anticorpos com alta afinidade contra antígenos tumorais previamente identificados, como CEA e c-erB-2 (BEGENT *et al.*, 1996; OSBOUM *et al.*, 1996; SCHIER *et al.*, 1996). Essa tecnologia tem se tornado popular ao criar sítios de ligação com aplicabilidade em diversas áreas incluindo pesquisa, medicina e indústria farmacêutica.

Nesse estudo, foi utilizada uma biblioteca Fab a partir de transcritos obtidos do sangue periférico de pool de pacientes com câncer de mama invasivo para a seleção de anticorpos específicos a câncer de ovário. No entanto, muitos trabalhos relatam a estreita relação entre carcinoma ovariano e mamário, os quais compartilham alguns aspectos moleculares e antígenos tumorais como BRCA1, BRCA2 e ErbB-2 (THALIB *et al.*, 2004; EDLICH *et al.*, 2005; HANSEN *et al.*, 2011; HEYERDAHL *et al.*, 2011).

Desta maneira, utilizando uma biblioteca de anticorpos Fab expressos na superfície de fagos buscou-se selecionar, pela técnica de *Phage Display*, fragmentos Fab tendo como alvo o peptídeo sintético Synt1. Desta maneira, os anticorpos selecionados poderiam ser avaliados quanto ao seu potencial terapêutico no câncer de ovário, sugerindo ser este clone um provável anti-antiidiotipo do CA125 (Ab3).

O sucesso na obtenção de fragmentos de anticorpos Fab a partir de leucócitos e sua reatividade e especificidade contra antígenos tumorais de ovário e pequenos peptídeos, como o Synt1 utilizado neste estudo, demonstra a importância e o poder da tecnologia de *Phage Display* e da possibilidade de expressar anticorpos com alta afinidade na superfície de fagos filamentosos, permitindo a seleção de antígenos de interesse a baixos custos e com maior

rapidez e simplicidade, sem a necessidade de utilização da tecnologia de produção de hibridomas.

A estratégia aqui utilizada apresentou resultados que confirmam nossas análises de similaridade entre os clones selecionados e o antígeno CA125. Os anticorpos Fab, ligantes específicos a antígenos tumorais, também mostraram reatividade contra o peptídeo Synt1, o que demonstra que ambos os ligantes apresentam epítomos semelhantes possibilitando a ligação com os mesmos anticorpos.

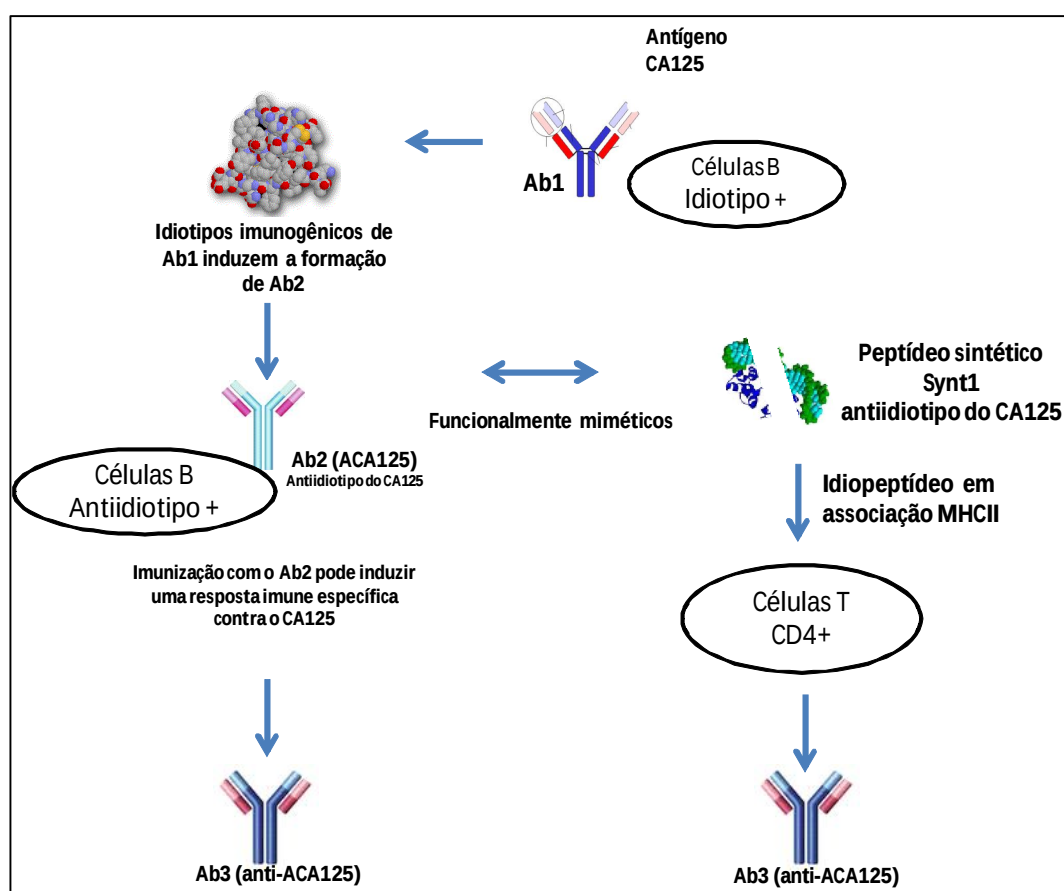


Figura 19: Esquema demonstrando a produção de anticorpos anti-antiidiotipos (Ab3) específicos ao CA125, baseado na hipótese de Nils Jerne (JERNE, 1974) e as implicações do peptídeo Synt1 na resposta imune da paciente portadora de câncer de ovário.

6 Conclusões

- O presente trabalho mostrou-se eficiente na seleção de peptídeos miméticos a proteínas tumorais ligantes a IgGs circulantes e teciduais por *Phage Display*;
- Os clones selecionados mostraram potencial diagnóstico na distinção entre tumores malignos e benignos de ovário, e entre tumores malignos e bordelines, e em combinação com o antígeno CA125, podem melhorar seu valor diagnóstico.
- A metodologia de *Phage Display* empregada neste estudo propiciou a seleção de anticorpos recombinantes Fab ligantes aos peptídeos miméticos e antígenos tumorais de ovário que podem ser utilizados tanto na imunoterapia como no diagnóstico do carcinoma ovariano.
- A estratégia de *Phage Display*, aplicada neste trabalho, propiciou a seleção de moléculas que podem apresentar potencial papel imunoterapêutico no tratamento do câncer de ovário.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AINA, O.H.; SROKA, T.C. Therapeutic cancer targeting peptides. *Biopolymers*, v.66, p. 184-99, 2002.
- ANDERSON, K.S.; WONG, J.; VITONIS, A.; CRUM, C.P.; SLUSS, P.M.; LABAER, J.; CRAMER, D. p53 autoantibodies as potential detection and prognostic biomarkers in serous ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* v. 19, n. 3, p.859-68, 2010.
- ARAÚJO, T. G. Construção de uma Biblioteca de Anticorpos Recombinantes (Fab) Anti-Carcinoma Mamário e Obtenção de Fragmentos Ligantes de Antígenos Tumoriais por *Phage Display*. 2009. 118f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 2009.
- AUERSPERG, N.; WONG, A.S.; CHOI, K.C.; KANG, S.K.; LEUNG, P.C. Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocr Rev*; v. 22, p. 255-88, 2001.
- BADGWELL, D.; BAST, R.C. Early detection of ovarian cancer. *Disease Markers*, v. 23, n. 5-6, p. 397-410, 2007.
- BARBAS, C.F.; BURTON, D.R.; SCOTT, J.K.; SILVERMAN, G.J. *Phage Display: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001.
- BHATTACHARY-CHATTERJEE, M.; BARAL, R. N.; CHATTERJEE, S. K.; DASA, R., ZEYTIN, H.; CHAKRABORTY, M.; FOON, K.A. Counterpoint. Cancer vaccines: single-epitope anti-idiotypic vaccine versus multiple-epitope antigen vaccine. *Cancer Immunol. Immunother.*, v. 49, p.133-141, 2000.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BARDIN, A.; HOFFMAN, P.; BOULLE, N.; *et al.* Involvement of estrogen receptor beta in ovarian carcinogenesis. *Cancer Res.* v. 64, n.16, p. 5861-5869, 2004.
- BAST, R.C.JR; BADGWELL, D.; LU, Z.; MARQUEZ, R.; ROSEN, D.; LIU, J.; BAGGERLY, K.A.; ATKINSON, E.N.; SKATES, S.; ZHANG, Z.; LOKSHIN, A.; MENON, U.; JACOBS, I.; LU, K. New tumor markers: CA125 and beyond. *Int J Gynecol Cancer*, v.15, n. 3, p. 274-81, 2005.

BEGENT, R.H.J.; VERHAAR, M.J.; CHESTER, K.A.; CASEY, J.L.; GREEN A.J.; NAPIER, M.P.; HOPE-STONE, L.D.; CUSHEN, N.; KEEP, P.A.; JOHNSON, C.J.; HAWKINS, R.E.; HILSON, A.J.W.; ROBSON, L. Clinical evidence of efficient tumor targeting based on single chain Fv antibody selected from a combinatorial library. *Nature Medicine*, v. 2, p. 979-984, 1996.

BORYSOWSKI, J.; GORSKI, A. Phage-display technology and its application to experimental oncological therapy. *Postepy. Hig. Méd. Dosw*, v. 58, p. 100-107, 2004.

BURGER, R.A.; DARCY, K.M.; DISAIA, P.J.; MONK, B.J.; GROSEN, E.A.; GATANAGA, T.; GRANGER, G.A.; WANG, J.; TIAN, C.; HANJANI, P.; COHN, D.E. Association between serum levels of soluble tumor necrosis factor receptors/CA 125 and disease progression in patients with epithelial ovarian malignancy: a gynecologic oncology group study. *Cancer*, v.101, p.106-115, 2004.

CARDOSO, R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; RODRIGUES, V.M.; SANTOS, W.B.; SOUZA, G.L.; PRUDENCIO, C.R.; SIQUIEROLI, A.C.; GOULART, L.R. Peptide mimicking antigenic and immunogenic epitope of neuwiedase from Bothrops neuwiedi snake venom. *Toxicon*, v. 53, n. 2, p. 254-61, 2009

CHATTERJEE, M.; MOHAPATRA, M.; IONAN, S.; BAWA, A.; ALI-FEHMI, G.; WANG, R.; NOWAK, X.; YE, J.; NAHHAS, B.; LU, F.; WITKIN, K.; FISHMAN, S.S.; MUNKARAH, D.; MORRIS, A.; LEVIN, R.; SHIRLEY, N.K.; TROMP, N.N.; ABRAMS, G.; DRAGHICI, J.; TAINSKY, S.; MICHAEL, A. Diagnostic Markers of Ovarian Cancer by High-Throughput Antigen Cloning and Detection on Arrays. *Cancer Res*, v. 66, n. 2, p. 1181-1190, 2006.

CHEN, J.J.W.; YAO, P.L.; YUAN, A.; *et al.* Upregulation of tumoral interleukin-8 expression by infiltrating macrophages: Its correlation with tumor angiogenesis and patient survival in nonsmall cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, v. 9, p.729-737, 2003.

CHO, E.Y.; CHOI, Y.; CHAE, S.W.; SOHN, J.H.; AHN, G.H. Immunohistochemical study of the expression of adhesion molecules in ovarian serous neoplasms. *Pathol. Int.*, v. 56, p. 62–70, 2006.

DE GRAEFF, P.; CRIJNS, A.P.; DE JONG, S.; BOEZEN, M.; POST, W.J.; DE VRIES, E.G.; VAN DER ZEE, A.G.; DE BOCK, G.H. Modest effect of p53, EGFR and HER-2/neu on prognosis in epithelial ovarian cancer: a meta-analysis. *Br. J. Cancer*, v.101, p.149-159, 2009.

EDLICH, R.F.; WINTERS, K.L.; LIN, K.Y. Breast cancer and ovarian cancer genetics. *J Long Term Eff Med Implants*, v.15, n. 5, p.533-45, 2005.

FALEIRO-RODRIGUES, C.; MACEDO-PINTO, I.; PEREIRA, D.; LOPES, C.S. Prognostic value of E-cadherin immunoexpression in patients with primary ovarian carcinomas. *Ann. Oncol.* v. 15, p. 1535-1542, 2004.

FOON, K.A.; CHAKRABORTY, M.; JOHN, W.; SHERATT, A.; KOHLER, H. Immune responses to the carcinoembryonic antigen in patients treated with an anti-idiotypic vaccine. *J. Clin. Invest.*, v. 96, p. 334-342, 1995.

FOON, K.A.; JOHN, W.J.; CHAKRABORTY, M.; DASA, R.; TEITELBAUM, A.; GARRISON, J.; KASHALA, O.; CHATTERJEE, S. K.; BHATTACHARJA-CHATTERJEE, M. Clinical and immune responses in resected colon cancer patients treated with anti-idiotypic monoclonal antibody vaccine that mimics the carcinoembryonic antigen. *J. Clin. Oncol.*, v.17, p. 2889-2895, 1999.

FOON, K.A.; LUTZKY, J.; BARAL, R.N.; YANNELLI, J.R.; HUTCHINS, L.; TIETELBAUM, A.; KASHALA, O.L.; DAS, R.; GARRISON, J.; REISFELD, R. A.; BHATTACHARYA-CHATTERJEE, M. Clinical and immune responses in advanced melanoma patients immunized with an anti-idiotypic antibody mimicking disialoganglioside GD2. *J. Clin. Oncol.*, v. 18, p. 376-384, 2000.

GADDUCCI, A.; COSIO, S.; TANA, R.; GENAZZANI, A.R. Serum and tissue biomarkers as predictive and prognostic variables in epithelial ovarian cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, v.69, p.12-27, 2009.

GILKS, C.B.; VANDERHYDEN, B.C.; ZHU, S.; VAN DE RIJN, M.; LONGACRE, T.A. Distinction between serous tumors of low malignant potential and serous carcinomas based on global mRNA expression profiling. *Gynecol Oncol*, v. 96, p.684-94, 2005.

GOONEWARDENE, T.I.; HALL, M.R.; RUSTIN, G.J. Management of asymptomatic patients on follow-up for ovarian cancer with rising CA-125 concentrations. *Lancet Oncol*, v. 8, n. 9, p. 813-21, 2007.

GOWTHAMAN, U.; AGREWALA, J.N. In Silico Tools for Predicting Peptides Binding to HLA-Class II Molecules: More Confusion than Conclusion. *Journal of Proteome Research*, v.7, p. 154-163, 2008.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOR, J.S.;TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, v.126, p.131,1982.

GRIFFITHS, A.D.; WILLIAMS, S.C.; HARTLEY, O.; TOMLINSON, I.M.; WATERHOUSE, P.; CROSBY, W.L.; KONTERMANN, R.E.; JONES, P.T.; LOW, N.M.; ALLISON, T.J.; PROSPERO, T.D.; HOOGENBOOM, H.R.; NISSIM, A.; COX, J.P.L.; HARRISON, J.L.; ZACCOLO, M.; GHERARDI, E.; WINTER, G. Isolation Of High Affinity Human Antibodies Directly From Large Synthetic Repertoires. *The Embo Journal*, v. 13, n. 14, p. 3245-3260, 1994.

GUPTA, D.; LIS, C.G. Role of CA125 in predicting ovarian cancer survival - a review of the epidemiological literature. *Journal of Ovarian Research*, v. 2, p.13, 2009.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. *Free radicals reactive species and toxicology*. In: Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (eds.), *Free Radic. Biol. Med.*, New York, p. 544-616, 1999.

HANSEN, T.V.; JONSON, L.; STEFFENSEN, A.Y.; ANDERSEN, M.K.; KJAERGAARD, S.; GERDES, A.M.; EJLERTSEN, B.; NIELSEN, F.C. Screening of 1331 Danish breast and/or ovarian cancer families identified 40 novel BRCA1 and BRCA2 mutations. *Fam Cancer*. Feb 12. [Epub ahead of print], 2011.

HELLSTROM, I.; HELLSTROM, K.E. SMRP and HE4 as biomarkers for ovarian carcinoma when used alone and in combination with CA125 and/or each other. *Adv Exp Med Biol*, v. 622, p.15-21, 2008.

HENNESSY, B.T.M.; CAREY, A.; GUTIN, R.; BRADDUS, R.; GONZALES-ANGULO, A.; LANCHBURY, J.; LU, K.; MILLS, G.B. Somatic BRCA status in ovarina tumors. *J. Clin. Oncol.*v. 27, n.15, p. 5528, 2009.

HEYERDAHL, H.; KROGH, C.; BORREBÆK, J.; LARSEN, A.; DAHLE, J. Treatment of HER2-expressing breast cancer and ovarian cancer cells with alpha particle-emitting 227Th-trastuzumab. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. v. 79, n. 2, p. 563-70. 2011.

HOGDALL, E. Cancer antigen 125 and prognosis. *Curr Opin Obstet Gynecol*, v. 20, p.4-8, 2008.

FIGO - INTERNATIONAL FEDERATION OF GYNECOLOGY AND OBSTETRICS. Classification and staging of malignant tumors in the female pelvis. *Acta Obstet Gynecol Scand*; v. 50, p.1-7,1971.

JACOBS, I.J.; RIVERA, H.; ORAM, D.H.; BAST, R.C.Jr. Differential diagnosis of ovarian cancer with tumour markers CA 125, CA 15-3 and TAG 72.3. *Br J Obstet Gynaecol*, v.100, p.1120-4, 1993.

JÄGER, E.; JÄGER, D.; KARBACH, J.; CHEN, Y.T.; RITTER, G.; NAGATA, Y.; GNJATIC, S.; STOCKERT, E.; ARAND, M.; OLD, L.J.; KNUTH, A. Identification of NY-ESO-1 epitopes presented by human histocompatibility antigen (HLA)- DRB4*0101-0103 and recognized by CD4(+) T lymphocytes of patients with NY-ESO-1-expressing melanoma. *J Exp Med*; v. 191, p. 625-30, 2000.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; HAO, Y.; XU, J.; THUN, M.J. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*, v.59, p. 225-49, 2009.

JERNE, N. K. Towards a network theory of the immune system. *Ann. Immunol.*, v.125, p. 373-389, 1974.

KAUFF, N.D. Is It time to stratify for BRCA mutation status in therapeutic trials in ovarian cancer? *J. Clin. Oncol.* v. 26, p. 26, 9-10, 2008.

KIRBY, T.O.; HUH, W.; ALVAREZ, R. Immunotherapy of ovarian cancer. *Exp. Opin. Biol. Ther.*, v. 2, p. 409-417, 2002.

KLIMP, A.H.; VRIES, E.G.E.; SCHERPHOF, G.L.; DAEMEN, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol., Shannon*, v. 44, n. 2, p. 143-161, 2002.

KUK, C.; GUNAWARDANA, C.G.; SOOSAIPILLAI, A.; KOBAYASHI, H.; LI, L.; ZHENG, Y.; DIAMANDIS, E.P. Nidogen-2: a new serum biomarker for ovarian cancer. *Clin Biochem.*, v. 43, n. 4-5, p. 355-61, 2010.

LANDON, L.A.; DEUTSCHER, S.L. Combinatorial discovery of tumor targeting peptides using *Phage Display*. *J Cell Biochem*, v. 90, p. 509-17, 2003.

LANDON, L.A.; ZOU, J.; DEUTSCHER, S.L. Is *Phage Display* technology on target for developing peptide-based cancer drugs? *Curr Drug Discov Technol*, v.1, p. 113–32, 2004.

LINDGREN, P.R.; CAJANDER, S.; BÄCKSTRÖM, T.; *et al.* Estrogen and progesterone receptors in ovarian epithelial tumors. *Mol Cell Endocrinol.* v. 221, n. 1-2, p. 97-104, 2004.

LIU, N.; WU, G.; LI, H.; LI, L. XING, H.; ZHANG, C.; LU, H. A novel peptide isolated from phage display peptides library recognized by an antibody against connective tissue growth factor (CTGF). *International Immunopharmacology*, v.9, p. 291-297, 2009.

MacMICKING, J.; XIE, Q.W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. *Ann. Rev. Immunol.*, v. 15, p. 323-350, 1997.

MARKMAN, M.; FEDERICO, M.; LIU, P.Y.; HANNIGAN, E.; ALBERTS, D. Significance of early changes in the serum CA-125 antigen level on overall survival in advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, v.103, p. 195-198, 2006.

MAYROSE, I.; SHLOMI, T.; RUBINSTEIN, N.D.; GERSHONI, J.M.; RUPPIN, E.; SHARAN, R.; PUPKO, T. Epitope mapping using combinatorial phage-display libraries: a graph-based algorithm. *Nucleic Acids Res.*, v. 35, p. 69-78, 2007.

MEYER, T.; RUSTIN, G.J. Role of tumour markers in monitoring epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer*, v. 82, p.1535-1538, 2000.

MITTLEMAN, A.; CHEN, Z. J.; LIU, C. C.; HIRAI, S.; FERRONE, S. Kinetics of the immune response and regression of metastatic lesions following development of humoral anti-high molecular weight melanoma-associated antigen immunity in three patients with advanced malignant melanoma immunized with mouse anti-idiotypic monoclonal antibody MK2-23. *Cancer Res.*, v. 54, p. 415-421, 1994.

NAORA, H.; YANG, Y.Q.; MONTZ, F.J.; *et al.* A serologically identified tumor antigen encoded by a homeobox gene promotes growth of ovarian epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 98, p. 4060-5, 2001.

ORRE, M.; ROGERS, P.A. Macrophages and microvessel density in tumors of the ovary. *Gynecol Oncol*, v. 73, p. 47-50, 1999.

OSBOUM, J. K.; FIELD, A.; WILTON, J.; DERBYSHIRE, E.; EAMSHAW, J. C.; JONES, P. T.; ALIEN, D.; MCCAFFERTY, J. Generation of a panel of related human scFv antibodies with high affinities for human CEA. *Immunotechnology*, v. 2, p. 181-196, 1996.

OZOLS, R.F.; BUNDY, B.N.; GREER, B.E.; *et al.*, Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *Journal of Clinical Oncology*, v. 21, n. 17, p. 3194-3200, 2003.

PAN, Z.; WANG, X.; ZHANG, X.; CHEN, X.; XIE, X. Retrospective analysis on coexisting ovarian cancer in 976 patients with clinical stage I endometrial carcinoma. *J Obstet Gynaecol Res.* 2011 Feb 11, [Epub ahead of print].

PARK, Y.; KIM, Y.; LEE, E.Y.; LEE, J.-H.; KIM, H.-S. Reference ranges for HE4 and CA125 in a large Asian population by automated assays and diagnostic performances for ovarian cancer. *International Journal of Cancer*, v. 129: n/a. doi: 10.1002/ijc.26129, 2011.

PRESS, J.Z.; DE LUCA, A.; BOYD, N.; YOUNG, S.; TROUSSARD, A.; RIDGE, Y.; KAURAH, P.; KALLOGER, S. E.; BLOOD, K.A.; SMITH, M.; SPELLMAN, P.T.; WANG, Y.; MILLER, D.M.; HORSMAN, D.; FAHAM, M.; GILKS, C.B.; GRAY, J.; HUNTSMAN, D.G. Ovarian carcinomas with genetic and epigenetic BRCA1 loss have distinct molecular abnormalities. *BMC Cancer*, v. 8, p.17, 2008.

PROWSE, A.H.; VANDERVEER, L.; MILLING, S.W.; PAN, Z.Z.; DUNBRACK, R.L.; XU, X.X.; GODWIN, A.K. OVCA2 is downregulated and degraded during retinoid-induced apoptosis. *Int J Cancer*, v. 10;99, n.2, p.185-92, 2002.

QIAN, F.; GNJATIC, S.; JÄGER, E.; SANTIAGO, D.; JUNGBLUTH, A.; GRANDE, C.; SCHNEIDER, S.; KEITZ1, B.; DRISCOLL, D.; RITTER, G.; LELE, S.; SOOD, A.; OLD, L.; ODUNSI, K. Th1/Th2 CD4+ T cell responses against NY-ESO-1 in HLA-DPB1*0401/0402 patients with epithelial ovarian cancer. *Cancer Immunity*, v. 4, p. 12, 2004.

QIAN, B.; DENG, Y.; IM, J.H.; RUTH J. MUSCHEL, R.J.; ZOU,Y., LI, J.; LANG, R.A.; POLLARD, J.W. A Distinct Macrophage Population Mediates Metastatic Breast Cancer Cell Extravasation, Establishment and Growth. *PLoS One.*, v. 4, n. 8, p. e6562, 2009.

REILLY, T.P.; BELLEVUE, F.H.; WOSTER, P.M.; SVENSSON, C.K. Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. *Biochem. Pharmacol.*, v. 55, p. 803-810, 1998.

REINARTZ, S.; HOMBACH, A.; KÖHLER, S.; SCHLEBUSCH, H.; WALLWIENER, D.; ABKEN, H.; WAGNER, U. Interleukin-6 Fused to an Anti-idiotypic Antibody in a Vaccine Increases the Specific Humoral Immune Response against CA125 (MUC-16) in Ovarian Cancer, *Cancer Research*, v. 63, p. 3234-3240, 2003.

ROSEN, D.G.; WANG L.; ATKINSON, J.N.; YU, Y.; LU, K.H.; DIAMANDIS, E.P.; HELLSTROM, I.; MOK, S.C.; LIU, J.; BAST, R.C.Jr. Potential markers that complement expression of CA125 in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, v. 99, p.267–77, 2005.

SAMOYLOVA, T.I.; MORRISON, N.E.; GLOBA, L.P.; COX, N.R. Peptide *Phage Display*: opportunities for development of personalized anti-cancer strategies. *Anticancer Agents Med Chem*, v. 6, p. 9-17, 2006.

SCANLAN, M.J.; CHEN, Y.T.; WILLIAMSON, B, *et al.* Characterization of human colon cancer antigens recognized by autologous antibodies. *Int J Cancer*; v. 76, p. 652-8, 1998.

SCANLAN, M.J.; GORDAN, J.D.; WILLIAMSON, B.; *et al.* Antigens recognized by autologous antibody in patients with renal-cell carcinoma. *Int J Cancer*, v. 83, p. 456-64, 1999.

SCHLEBUSCH, H.; WAGNER, U.; GRU"NN, U.; SCHULTES, B. A monoclonal anti-idiotypic antibody ACA125 mimicking the tumor-associated antigen CA125 for immunother- apy of ovarian cancer. *Hybridoma*, v. 14, p. 167–174, 1995.

SCOTT, J.K.; SMITH, C.P. Searching for peptide ligands with an epitope brary. *Science*, v. 249, p. 386-90, 1990.

SHIM, H.S.; YOON, B.S.; CHO, N.H. Prognostic significance of paired epithelial cell adhesion molecule and E-cadherin in ovarian serous carcinoma. *Hum. Pathol.*, v. 40, p. 693–698, 2009.

SCHIER, R.; BYE, J.; APELL, G.; MCCALL, A.; ADAMS, G. P.; MALMQVIST, M.; WEINER, L. M.; MARKS, J. D. Isolation of high-affinity monomeric human anti-cerB-2 single chain Fv using affinity-driven selection. *Journal of Molecular Biology*, v. 255, p. 28-43, 1996.

STEFATIĆ, D.; RIEDERER, M.; BALIĆ, M.; DANDACHI, N.; STANZER, S.; JANESCH, B.; RESEL, M.; LER, D.; SAMONIGG, H.; BAUERNHOFER, T. Optimization of diagnostic ELISA-based tests for the detection of auto-antibodies against tumor antigens in human serum. *Bosn J Basic Med Sci.* v. 8, n. 3, p. 245-50, 2008.

STRUSS, A.K.; ROMEIKE, B.F.; MUNNIA, A.; *et al.* PHF3-specific antibody responses in over 60% of patients with glioblastoma multiforme. *Oncogene*, v. 20, p.4107-14, 2001.

THALIB, L.; WEDRÉN, S.; GRANATH, F.; ADAMI, H.O.; RYDH, B.; MAGNUSSON, C.; HALL, P. Breast cancer prognosis in relation to family history of breast and ovarian cancer. *Br J Cancer.* v. 5;90, n. 7, p.1378-81, 2004.

THIE, H.; TOLEIKIS, L.; LI, J.; VON WASIELEWSKI, R.; BASTERT, G.; SCHIRRMANN, T.; ESTEVES, I.T.; BEHRENS, C.K.; FOURNES, B.; FOURNIER, N.; DE ROMEUF, C.; HUST, M.; DÜBEL, S. Rise and Fall of an Anti-MUC1 Specific Antibody. *PLoS One.* v. 14;6, p.e15921, 2011.

UCHIYAMA, F.; TANAKA, Y.; MINARI, Y.; TOKUI, N. Designing scaffolds of peptides for *Phage Display* libraries. *J Biosci Bioeng*, v. 99, p. 448–56, 2005.

URBAN, N.; DRESCHER, C. Potential and limitations in early diagnosis of ovarian cancer. In: *Ovarian Cancer: State of the Art and Future Directions in Translational Research*. COUKOS, G.; BERCHUCK, A.; OZOLS, R. Eds., New York: Springer., p. 3–14, 2008.

VAN ELSEN, C.H.; FRINGS, P.W.; BOT, F.J.; VAN DE VIJVER, K.K.; HULS, M.B.; MEEK, B.; HUPPERETS, P.; GERMERAAD, W.T.; BOS, G.M. Expression of aberrantly glycosylated mucin-1 in ovarian cancer. *Histopathology*, v. 57, n.4, p. 597-606, 2010.

WAGNER, U. Immuntherapie des Ovarialkarzinoms mit dem monoklonalen Antiko ACA125: Ergebnisse der Phase Ib Studie. *GebFra*, v. 58, p. 180-186, 1998.

WAGNER, U.; SCHLEBUSCH, H.; KÖHLER, S.; SCHMOLLING, J.; GRUNN, U.; KREBS, D. Immunological responses to the tumor-associated antigen CA125 in patients with advanced ovarian cancer induced by murine monoclonal anti-idiotypic vaccine ACA125. *Hybridoma*, v. 16, p. 33-40, 1997.

WAGNER, U.; KO H.; BIRSACK, H. J.; MO"NN, U.; FISCHER, H. P.; SCHLEBUSCH, H.; "RPER"HLER, S.; REINARTZ, S.; GIFFELS, P.; HUOBER, J.; RENKE, K.; SCHLEBUSCH, "BUS, V.; KREIENBERG, R.; BAUKNECHT, T.; KREBS, D.; WALLWIENER, D. Immunological consolidation of ovarian carcinoma recurrences with monoclonal anti-idiotypic antibody ACA125: immune responses and survival in palliative treatment. *Clin. Cancer Res.*, v. 7, p. 1154-1162, 2001.

WANG, L.; CHEN, H.; LIU, F.; MADIGAN, M.C.; POWER, C.A.; HAO, J.; PATTERSON, K.I.; POURGHOLAMI, M.H.; O'BRIEN, P.M.; PERKINS, A.C.; LI, Y. Monoclonal antibody targeting MUC1 and increasing sensitivity to docetaxel as a novel strategy in treating human epithelial ovarian cancer. *Cancer Lett.*, v. 28;300, n. 2, p. 122-33, 2011.

WHITE, E.S.; STROM, S.R.B.; WYS, N.L.; *et al.* Nonsmall cell lung cancer cells induce monocytes to increase expression of angiogenic activity. *J Immunol*, v.166, p. 7549-7555, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *WHO Drug Information*, v. 21, n.1, p. 56, 2007.

YI, Y.C.; WANG, S.C.; CHAO, C.C.; SU, C.L.; LEE, Y.L.; CHEN, L.Y. Evaluation of serum autoantibody levels in the diagnosis of ovarian endometrioma. *J Clin Lab Anal.*, v. 24, n. 5, p. 357-62, 2010.

YIP, Y.L.; WARD, R.L. Epitope discovery using monoclonal antibodies and phage peptide libraries. *Comb Chem High Throughput Screen*, v. 2, p.125-38, 1999.

YIN, B.W.; LLOYD, K.O. Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen: identification as a new mucin, MUC16. *J Biol Chem*, v. 276, p. 27371-27375, 2001.

ZAROOR, H.M.; STORKUS, W.J.; BRUSIC, V.; WILLIAMS, E.; KIRKWOOD, J.M. NY-ESO-1 encodes DRB1*0401-restricted epitopes recognized by melanoma-reactive CD4+ T cells. *Cancer Res*, v. 60, p. 4946-52, 2000.

ZAROOR, H.M.; MAILLIERE, B.; BRUSIC, V.; COVAL, K.; WILLIAMS, E.; POUVELLE- MORATILLE, S.; CASTELLI, F.; LAND, S.; BENNOUNA, J.; LOGAN, T.; KIRKWOOD, J.M. NY-ESO-1 119-143 is a promiscuous major histocompatibility complex class II T-helper epitope recognized by Th1- and Th2-type tumor-reactive CD4+ T cells. *Cancer Res*; v. 62, p. 213-8, 2002.

ZENG, G.; TOULOUKIAN, C.E.; WANG, X.; RESTIFO, N.P.; ROSENBERG, S.A.; WANG, R.F. Identification of CD4+ T cell epitopes from NY-ESO-1 presented by HLA-DR molecules. *J Immunol*; v.165, p. 1153-9, 2000.

ZENG, G.; WANG, X.; ROBBINS, P.F.; ROSENBERG, S.A.; WANG, R.F. CD4(+) T cell recognition of MHC class II-restricted epitopes from NY-ESO-1 presented by a prevalent HLA DP4 allele: association with NY-ESO-1 antibody production. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 98, p. 3964-9, 2001.