

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Seleção e Identificação de Peptídeos Recombinantes por
Phage Display em Câncer de Próstata**

Luciana Bueno Ferreira

Monografia apresentada à coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia, para a
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Uberlândia – MG

Julho – 2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Seleção e Identificação de Peptídeos Recombinantes por
Phage Display em Câncer de Próstata**

Luciana Bueno Ferreira

Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Monografia apresentada à coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia, para a
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Uberlândia – MG

Julho – 2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Seleção e Identificação de Peptídeos Recombinantes por
Phage Display em Câncer de Próstata**

Luciana Bueno Ferreira

Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho
Instituto de Genética e Bioquímica

Homologado pela coordenação do curso de
Ciências Biológicas em ___/___/___.

Vera Lúcia de Campos Brites

Uberlândia – MG

Julho – 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Seleção e Identificação de Peptídeos Recombinantes por
Phage Display em Câncer de Próstata**

Luciana Bueno Ferreira

Aprovada pela banca examinadora em ___/___/___ Nota _____



Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Dra. Ana Paula Peres Freschi

Msc. Fabiana de Almeida Araújo Santos

Uberlândia-MG

Julho – 2007

AGRADECIMENTOS

A Deus, a oportunidade de realização deste trabalho;

A meus pais, o apoio irrestrito a meu crescimento intelectual e a todas as minhas decisões;

A meu orientador Prof. Dr. Luiz Ricardo, a orientação competente, a confiança que depositou em mim, as brilhantes sugestões e otimismo;

A minha amiga Patrícia Tieme, as demonstrações de amizade, confiança, companheirismo e por me amparar nos momentos mais difíceis;

A Ana Paula, em especial, sempre presente, a dedicação, a confiança e os vários momentos de descontração;

A meu colega Washington, que se tornou amigo, o apoio a todos os momentos conturbados de final de curso;

Aos amigos Fausto Capparelli e Juliana Franco, o apoio, comprometimento e exemplos a serem seguidos;

A todos os amigos do laboratório que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho;

Aos pacientes, sem os quais seria impossível a realização deste trabalho;

O meu sincero muito obrigada.

RESUMO

O câncer de próstata (CaP) é a segunda causa de óbitos por câncer em homens, mas pode ser facilmente tratado se detectado em fases iniciais, contudo não existem marcadores específicos fazendo-se necessário o desenvolvimento de novas metodologias para o seu diagnóstico precoce. A tecnologia *Phage Display* é capaz de selecionar peptídeos com diversas finalidades, como mapeamento de antígenos reconhecidos por anticorpos, com possível utilização como marcadores tumorais. Objetivando identificar novos alvos biológicos, utilizou-se a metodologia *Phage Display* contra imunoglobulinas purificadas de extrato protéico de tecidos tumorais de próstata para a seleção de peptídeos miméticos de proteínas prostáticas tumorais. Após 3 ciclos de seleção, foram sequenciados 200 clones que geraram 12 seqüências distintas que foram analisadas por bioinformática. Para análise de especificidade dos clones foram realizados ensaios ELISA com os peptídeos e soros de pacientes com CaP, HPB e controles, os quais demonstraram que 6 peptídeos apresentaram alta reatividade, especificidade e acurácia sozinhos ou em combinação. Esses resultados sugerem que tais peptídeos têm grande potencial como marcadores tumorais no diagnóstico de CaP.

PALAVRAS-CHAVE: Câncer de Próstata, *Phage Display*, marcadores tumorais.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A Glândula Prostática.....	2
1.2 Doenças da Próstata.....	3
1.3 Imunologia do Tumor.....	3
1.4 Epidemiologia do Câncer de Próstata.....	4
1.5 Microesferas Magnéticas.....	4
1.6 <i>Phage Display</i>	5
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
2.1 Material Biológico.....	9
2.2 Extração de Proteínas Totais.....	11
2.3 Eletroforese em SDS-PAGE.....	12
2.4 Coloração de gel com <i>coomassie-blue</i>	12
2.5 Coloração de gel com nitrato de prata.....	12
2.6 Purificação de Imunoglobulinas de Extrato Protéico.....	13
2.7 Ensaio <i>Dot Blot</i> com as IgG Purificadas.....	13
2.8 Seleção de Peptídeos <i>Recombinantes</i>	14
2.8.1 <i>Biopanning</i> (seleção de fagos).....	14
2.8.2 Titulações.....	15
2.8.3 Extração de DNA de fagos.....	15
2.8.4 Sequenciamento.....	16
2.8.5 Análise por Bioinformática.....	17

2.9 ELISA (Imunoensaio Enzimático).....	17
3. RESULTADOS.....	19
4. DISCUSSÃO.....	32
5. CONCLUSÃO.....	36
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Localização da glândula prostática.....	1
Figura 2: Esquema ilustrativo da utilização de microesferas ativadas com proteína G para purificação de IgG e imunoprecipitação de proteínas específicas.....	5
Figura 3. Estrutura do fago. PIII, PVI, PVII, PVIII e PIX representam as proteínas do fago. Peptídeos exógenos são expressos usualmente na PIII ou PVIII.....	6
Figura 4: Esquema representativo do procedimento de <i>biopanning</i> . Imobilização do alvo e incubação da biblioteca de fagos, retirada dos fagos não ligantes por lavagens sucessivas, eluição dos fagos ligados e infecção de <i>Escherichia coli</i> e amplificação dos fagos eluídos.....	7
Figura 5: Eletroforese SDS-PAGE (16%) proteínas totais extraídas de amostras de tecido de próstata de pacientes com CaP e HPB observadas em gel de acrilamida corado com nitrato de prata, M - marcador de peso molecular.....	19
Figura 6: Eletroforese em SDS-PAGE (Gel 16%) corado com <i>coomassie blue</i> . Preparações de IgG obtidas por imunoprecipitação com microesferas magnéticas. M - marcador de peso molecular e CaP - câncer de próstata.....	20
Figura 7: Membrana de <i>Dot Blot</i> das amostras de IgG purificada (IgG P.), proteínas remanescentes (R) e de extrato de proteína total (Ptn. T.) de amostras de CaP.....	20
Figura 8: Enriquecimento de partículas de fagos nos três ciclos de seleção (rounds) do <i>biopanning</i>	22
Figura 9: Eletroforese em gel de agarose 1% de 12 amostras de DNA extraído de fagos (1-12) aleatoriamente escolhidos e de 300ng de DNA controle (C) com 7249 pb.....	22

Figura 10. Gráfico construído pelo programa DIVAA que ilustra a diversidade de sucessão dos aminoácidos em cada posição nos peptídeos.....	25
Figura 11: Painel de reatividade dos clones selecionados (1-12) apresentando IEs maiores do que 1 considerados positivos para soros dos pacientes com CaP, HPB e controles sadios.....	29
Tabela I: Parâmetros clínicos e laboratoriais dos pacientes utilizados para a extração de proteínas totais. ND: não detectado; RAD/CAP: prostatectomia radical.....	9
Tabela II: Parâmetros clínicos e laboratoriais dos pacientes utilizados para a purificação de IgG. ND: não detectado; RTU/CAP: ressecção transuretral; RAD/CAP: prostatectomia radical.....	10
Tabela III: Parâmetros clínicos e laboratoriais dos pacientes com CaP utilizados para os ELISAS. ND: Não detectado; RAD/CAP: prostatectomia radical; RTU: ressecção transuretral.....	10
Tabela IV: Parâmetros clínicos e laboratoriais dos pacientes com HPB utilizados para extração de proteínas totais. ND: Não detectado; RTU/HPB: ressecção transuretral; RAD/HPB: prostatectomia radical.....	10
Tabela V: Parâmetros clínicos e laboratoriais dos pacientes com HPB e controles (C) utilizados para os ELISAS. ND: Não detectado; RAD/HPB: prostatectomia radical; RTU/HPB: ressecção transuretral.....	11
Tabela VI: Relações entre pacientes doentes e não doentes e respectivas reatividades em testes diagnósticos.....	18
Tabela VII: Seleção dos fagos com peptídeos ligantes a anticorpos policlonais anti-CaP. Título obtido (pfu) no processo de seleção dos fagos por imunoafinidade.....	21

Tabela VIII: Freqüência dos clones de fagos selecionados.....	23
--	----

Tabela XIX: Freqüência dos aminoácidos individuais dos peptídeos expressos nos fagos selecionados pelas IgG e a freqüência esperada dos aminoácidos na construção da biblioteca realizado pelo AADIV.....	24
--	----

Tabela X: Alinhamento das seqüências protéicas dos peptídeos selecionados mostrando as homologias encontradas com as proteínas anotadas no banco de dados do <i>GeneBank</i> pelo BLAST, com os números de acesso no Swissprot.....	26
--	----

Tabela XI: Sensibilidade, Especificidade e Acurácia dos testes ELISA para os soros dos pacientes com CaP, HPB e controles em relação aos clones selecionados (Clones 1 a 12).....	30
--	----

Tabela XII: Sensibilidade, Especificidade e Acurácia dos testes ELISA para os soros dos pacientes com CaP, HPB e controles em relação às combinações dos clones (1 + 4, 1 + 6, 1 + 8 e 8 + 10)......	31
--	----

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Glândula Prostática

A próstata é um órgão fibromuscular e glandular masculino localizado abaixo da bexiga urinária (Figura 1), pesa aproximadamente 20g no indivíduo adulto, sua função é produzir uma substância que, juntamente com a secreção da vesícula seminal e os espermatozoides produzidos nos testículos, formam o sêmen ou esperma (SMITH, 1979; GOSLING *et al.*, 1992). É composta por ácinos e um complexo sistema de ductos ramificados, cujos produtos de excreção são lançados dentro da uretra prostática (ROHR; BARTHSCH, 1980). É regulada, principalmente, por hormônios sexuais denominados androgênios, sendo a testosterona o mais importante deles (ERHAT, 1992).

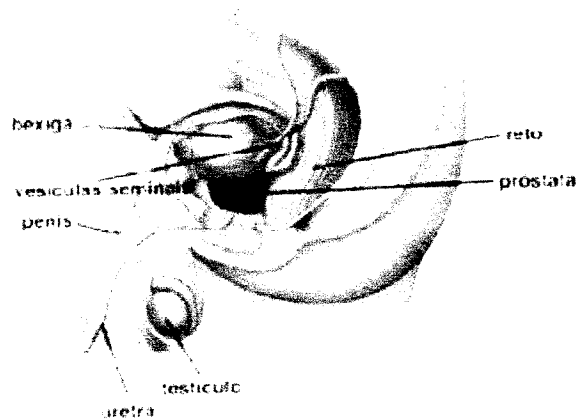


Figura 1: Localização da glândula prostática. Fonte: <http://www.centrodeterapias.com.br>

Estruturalmente, a próstata é envolta por uma cápsula de tecido conjuntivo e fibras musculares lisas da qual partem finas trabéculas que se dirigem ao parênquima, que é ocupado por células glandulares distribuídas em tubos ramificados. Anatomicamente, é dividida em cinco zonas: a anterior, a periférica, a central, o tecido pré-prostático e a transicional (local exclusivo da hiperplasia prostática benigna). Na zona periférica encontra-se a maioria dos casos de câncer de próstata (CaP) e corresponde à região mais pesquisada na biópsia da próstata (COFFEY, 1993, WALSH; WORTHINGTON, 1998).

1.2 Doenças da Próstata

Anormalidades no crescimento e infecções na próstata são algumas das doenças mais comuns em homens com idade superior a 50 anos. Várias disfunções têm sido associadas à glândula prostática, dentre elas incluem-se as prostatites, a hiperplasia prostática benigna (HPB) e o câncer de próstata (SROUGI; CURY, 1998).

As prostatites ocorrem em diversas formas distintas, sendo as formas mais comuns as prostatites aguda bacteriana e não inflamatória ou crônica, prostatites não bacterianas (MEARES-JUNIOR, 1992).

A prostatite bacteriana aguda caracteriza-se pela presença de processo infeccioso no tecido prostático, podendo ser localizado ou difuso. Comumente é causada por bactérias como a *Escherichia coli*, bacilos gram negativos, enterococos e estafilococos, germes comuns à infecções do trato urinário inferior. Clinicamente apresenta febre com calafrios e disúria (COTRAN *et al.*, 1994).

A hiperplasia prostática benigna (HPB) é um aumento do tamanho das células da próstata, resultante de novo crescimento das glândulas periuretrais e não de uma simples hipertrofia. Ocorre em quase 80% dos homens por volta dos 80 anos, sendo responsável por infecções urinárias a partir dos 50 anos de idade (WALSH; WORTHINGTON, 1998).

Uma alteração no balanço entre a proliferação e a morte celular compreende ao câncer de próstata. Durante os estágios iniciais do crescimento do câncer, as taxas de proliferação celular são maiores que as de morte celular, porém as células irão responder aos mesmos fatores regulatórios (hormônio-dependente) (GRIFFITHS; MORTON, 1999).

Os tumores da próstata são heterogêneos, com áreas de maior ou menor diferenciação celular, dessa forma a graduação histológica dos adenocarcinomas constitui um importante fator no prognóstico. Outros parâmetros também são importantes, como o estágio inicial do tumor, o volume da neoplasia, o conteúdo de DNA do tumor e as medidas de PSA (SROUGI, 1998).

Aproximadamente 70% dos cânceres desenvolvem-se multifocalmente na zona periférica, menos de 5% na zona central e acima de 25% originam-se na zona de transição, tumores denominados incidentais, quando removidos por RTU - ressecção transuretral da próstata (STAMEY; MCNEAL 1992, SROUGI 1998, BOSTWICK 1999, JARMULOWICZ 1999).

O câncer de próstata e a hiperplasia prostática benigna conferem risco e prognóstico bastante diferentes aos pacientes. Contudo incidem sobre a mesma faixa etária. A neoplasia prostática, em estágios iniciais apresenta alterações clínicas e laboratoriais semelhantes à

hiperplasia benigna. Além do fato de ambas poderem co-existir, complicando ainda mais o diagnóstico preciso. Esses fatos dificultam sensivelmente a diferenciação dessas patologias (KRUMHOLTZ *et al.*, 2002; CATALONA, 2004).

O rastreamento de anomalias prostáticas é realizado principalmente por quatro etapas: o exame físico da próstata (toque retal), dosagem do antígeno prostático específico (PSA), ultrasonografia transretal (USTR) e biópsias. O toque digital tem a sensibilidade que varia de 40 a 80% e as dosagens de PSA de 70 a 90%. A USTR é indicada quando os resultados do toque digital ou as dosagens de PSA são incoerentes ou duvidosos (STAMEY ; MCNEAL, 1992).

A análise histopatológica do tecido prostático é baseada no Sistema Gleason (1977) (*apud* STAMEY; MCNEAL 1992, ISAACS 1997, SROUGI 1998) (ANEXO II), que consiste num sistema que valoriza o padrão glandular e a relação entre as glândulas e o estroma prostático classificando os tumores em cinco graus, sendo grau um, as lesões mais diferenciadas e as de grau cinco as mais indiferenciadas (STAMEY; MCNEAL, 1992; ISAACS, 1997; SROUGI, 1998).

O estadiamento dos adenocarcinomas da próstata também são classificados segundo WHITMORE-JEWETT e TNM 1992 (*apud* STAMEY; MCNEAL 1992; SROUGI, 1998) (ANEXO III).

1.3 Imunologia do Tumor

A autoimunidade humoral apresenta como característica o desenvolvimento de autoanticorpos endereçados contra proteínas celulares próprias do indivíduo e ácidos nucléicos (TAM, 1989). Evidências consideráveis têm mostrado que autoanticorpos são uma forma de resposta imune do tumor a vários antígenos tumorais desenvolvida por muitos pacientes (BRADFORD; WANG; CHINNAIYAN, 2006).

Mudanças na estrutura ou expressão de proteínas próprias, ocorridas durante a tumorigênese, sugerem mecanismos pelos quais o sistema imune pode iniciar ou permitir o reconhecimento de epítomos associados a tumores como estranhos (TAM, 2001).

A descoberta da resposta imune humoral de antígenos associados a tumores que são reconhecidos como “estranhos” pelo sistema imune pode fornecer ambos, diagnóstico e informação de prognóstico (MINTZ *et al.* 2003).

1.4 Epidemiologia do Câncer de Próstata

O câncer da próstata (CaP) é o tumor mais diagnosticado nos homens, representando a segunda causa de morte por tumor maligno nos Estados Unidos, tendo ultrapassado em frequência os tumores do pulmão e do cólon (BRUNINI *et al.* 1992; BOYLE; SEVERI; GILLES, 2003). Atualmente, o câncer de próstata é a segunda causa de morte masculina no Brasil (INCA, 2007), causada principalmente pelo retardo no diagnóstico, favorecendo tumores com alta capacidade de invasão local e disseminação (WALSH; WORTHINGTON, 1998).

A idade é um fator de risco importante, uma vez que tanto a incidência como a mortalidade aumentam exponencialmente após a idade de 50 anos. História familiar de pai ou irmão com câncer da próstata antes dos 60 anos de idade pode aumentar o risco de câncer em 3 a 10 vezes em relação à população em geral, podendo refletir tanto fatores hereditários quanto hábitos alimentares ou estilo de vida de risco de algumas famílias (COFFEY 1993, ISAACS 1997, INCA 2007).

A etnia é um dos poucos fatores de risco bem estabelecido para a incidência e mortalidade por câncer de próstata (CUSSENOT; VALERI, 2001). Nos Estados Unidos a taxa de mortalidade é duas a três vezes maior entre afro-americanos do que entre brancos, mesmo quando os fatores sócio-econômicos são ajustados. Os japoneses e chineses apresentam índices ainda menores, embora essa taxa pareça aumentar quando esses homens residem em países de alto risco (RUIJTER *et al.*, 1999).

A cura do câncer de próstata é limitada àqueles pacientes com a doença confinada ao órgão, ainda em estágio inicial. Assim, é de grande importância o diagnóstico do câncer em estágios precoces, quando há enormes chances de cura, o que não acontece quando a doença não está mais confinada ao órgão e apresenta metástase. Portanto estudos e avanços na área molecular são de grande importância para um diagnóstico precoce (WALSH; WORTHINGTON, 1998).

1.5 Microesferas Magnéticas

Muitos testes e ensaios utilizam partículas de tamanho submicron ou microesferas como substrato ou suporte para reações imunológicas e separação de micromoléculas e partículas subcelulares. Microesferas são partículas de polímeros esféricos de diferentes tamanhos e

compostas por diversos materiais, dependendo da utilização, tais como poliestireno, sílica e magnéticas.

Microesferas magnéticas são utilizadas para a detecção e purificação de proteínas e anticorpos, sendo comumente utilizadas também para purificação de ácidos nucleicos. Partículas magnéticas têm sido amplamente utilizadas em diagnósticos e pesquisa básica para captura de biomoléculas e células. Diversos agentes biológicos podem ser utilizados, principalmente imunoglobulinas, proteínas A e G e estreptavidina, utilizados em imunoprecipitações (FRESCHI, 2007).

O processo de purificação/captura de biomoléculas via partículas magnéticas é simples, rápido e extremamente fácil, consiste em incubar as moléculas de interesse com as microesferas magnéticas e então submetê-las a um separador magnético com a presença de um ímã que gera um campo magnético e captura as microesferas ativadas. Após a captura as moléculas de interesse são eluídas por desestabilização nas interações químicas por queda no pH. Um esquema ilustrativo demonstrando o processo de purificação de IgG e imunoprecipitação de proteínas com microesferas ativadas com proteína G está esquematizado na Figura 2.

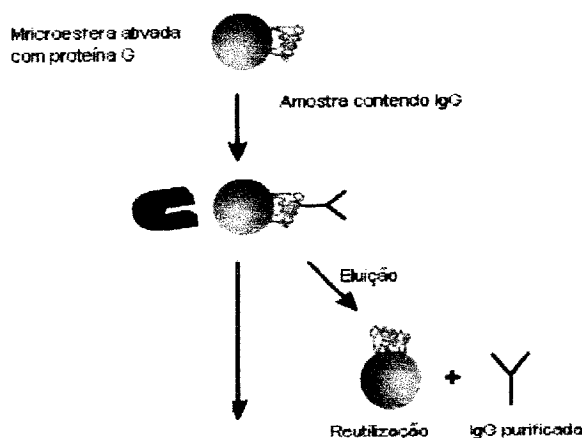


Figura 2. Esquema ilustrativo da utilização de microesferas ativadas com proteína G para purificação de IgG e imunoprecipitação de proteínas específicas. (Fonte: [http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/100.03D04D_Dynabeads_Protein_G_\(rev004\).pdf](http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/100.03D04D_Dynabeads_Protein_G_(rev004).pdf)).

1.6 Phage Display

A identificação de novos antígenos ou genes específicos do câncer de próstata pode prover novos biomarcadores e também fornecer instrumentos para o desenvolvimento de

novas modalidades de tratamento (BUSSEMARKERS *et al.*, 1999). Peptídeos detectados por *Phage Display* têm grande potencial para serem utilizados como marcadores de tumores prostáticos e em diagnóstico do câncer de próstata (LEINONEN *et al.*, 2000).

Phage Display é uma tecnologia eficiente para identificar peptídeos ou proteínas que se ligam a outras moléculas. Uma região de DNA codificante é inserida no genoma de um bacteriófago de modo que o peptídeo ou proteína expresso está exposto na superfície da partícula do fago fundido a uma proteína endógena representado pela Figura 3.

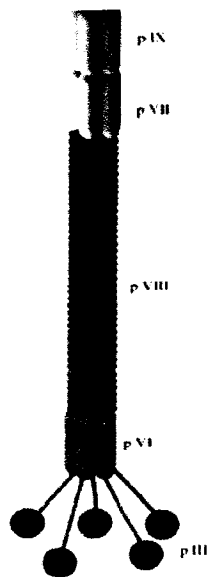


Figura 3. Estrutura do fago. PIII, PVI, PVII, PVIII e PIX representam as proteínas do fago. Peptídeos exógenos são expressos usualmente na PIII ou PVIII.

Bacteriófagos, ou simplesmente fagos, são vírus que infectam uma variedade de bactérias Gram-negativas usando *pili* como receptores. Uma das vantagens do uso do bacteriófago é que fagos filamentosos não geram uma infecção lítica em *Escherichia coli*, mas preferencialmente induz um estado na qual a bactéria infectada produz e secreta partículas de fago sem sofrer lise.

A classe Ff de bacteriófagos filamentosos (f1, fd, e M13) tem sido amplamente estudada. Esses fagos são formados por uma fita simples de DNA envolta por uma capa protéica constituída por cinco proteínas (pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX) (Figura 3). Das cinco proteínas presentes no capsídeo viral existem aproximadamente 2800 cópias de 50 aminoácidos da pVIII. Os monômeros da proteína pVIII estão presentes na partícula como uma α -hélice,

exceto 5 resíduos da extremidade amino-terminal que são apresentadas fora da partícula. De 10-13 resíduos da extremidade carboxi-terminal formam a parede interna do cilindro. Esta região contém 3 resíduos de lisina carregadas positivamente que se localizam em uma face de uma hélice anfifílica. As extremidades carboxi e amino terminal de uma molécula de pVIII têm seus resíduos conectados com a mesma região de outra molécula de pVIII estabilizando o cilindro protéico (BARBAS *et al.* 2001).

A seleção de seqüências é baseada na afinidade de ligação do fago a uma molécula alvo em um processo de seleção *in vitro* denominado *biopanning* (SMITH, 1988). A seleção ou *biopanning* é realizada pela incubação da biblioteca de peptídeos expostos em fagos contra o alvo. O alvo é imobilizado em um suporte sólido tais como placas de microtitulação, microesferas magnéticas ou de afinidade, resinas e membranas. Os fagos não ligantes ao alvo são eliminados por lavagens sucessivas e os fagos específicos permanecem ligados para posterior eluição. O *pool* de fagos específicos é amplificado para os ciclos posteriores de seleção (ciclos de ligação, eluição e amplificação) para o enriquecimento do conjunto de fagos com seqüências específicas contra o alvo. Após três ou quatro passagens os clones individuais são caracterizados por seqüenciamento de DNA, *western blotting* ou ELISA (SMITH, 1985). Para melhor entender o processo de seleção é apresentado na Figura 4 um esquema ilustrativo do processo de *biopanning*.

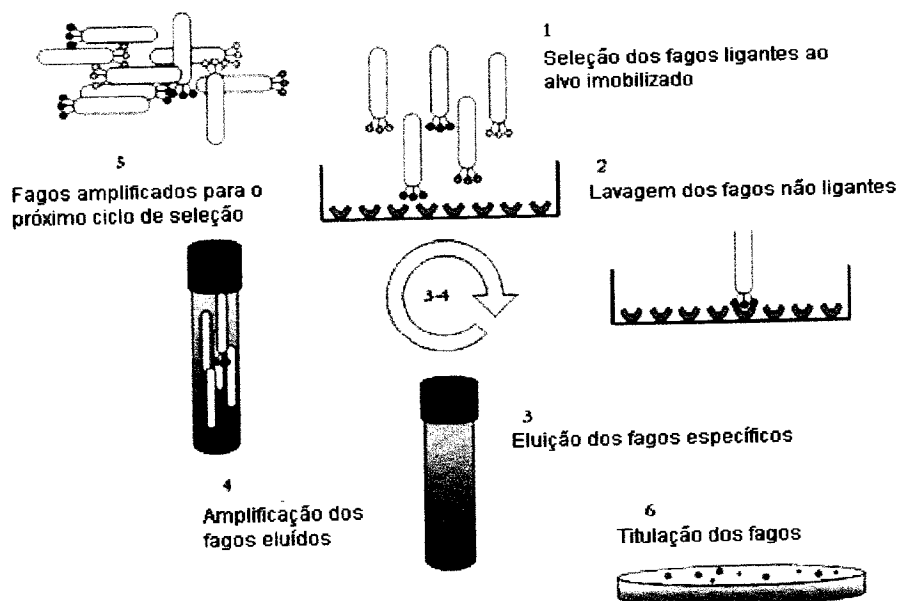


Figura 4. Esquema representativo do procedimento de *biopanning*. Imobilização do alvo e incubação da biblioteca de fagos, retirada dos fagos não ligantes por lavagens sucessivas, eluição dos fagos ligados e infecção de *Escherichia coli* e amplificação dos fagos eluídos. (Fonte: <<http://www.sut.ac.th/iat/biotech/PhDworkshop/Background.htm>>).

Peptídeos randômicos expressos na superfície de fagos filamentosos, tanto na proteína pIII como na pVIII, podem servir como: sítios enzimáticos, agonista e antagonista de biomoléculas, identificação de mimetopos, peptídeos ligantes a ácidos nucléicos e proteínas (antígenos) com potencial para vacinação, diagnóstico e produção de anticorpos monoclonais. Esta característica é de grande importância na purificação das partículas virais para posterior utilização, pois diminui a contaminação com biomoléculas indesejáveis.

Com a metodologia de *Phage Display* (BARBAS *et al.*, 2001) é possível a identificação de proteínas, que podem funcionar como marcadores capazes de detectar o câncer de próstata em estadios mais iniciais que os métodos tradicionais, predizer o atual estadio do tumor, além de possibilitar o desenvolvimento de novos tratamentos.

Este trabalho teve como objetivo selecionar e identificar alvos biológicos por *Phage Display* através do isolamento de imunoglobulinas tipo G provenientes de tecido tumoral prostático para o diagnóstico do câncer de próstata, e identificar, por bioinformática, domínios protéicos importantes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Biológico

Neste estudo foram utilizados fragmentos macrodissecados manualmente provenientes de prostatectomia radical (RAD/CAP) e punção de 30 pacientes com adenocarcinoma de próstata em diversos estádios sendo 10 pacientes utilizados para extração de proteínas totais (Tabela I), 10 pacientes utilizados para purificação de imunoglobulinas tipo G (Tabela II) e 10 pacientes para ensaios ELISA (Tabela III). Foram utilizados também 20 pacientes com HPB, sendo 10 para extração de proteínas totais (Tabela IV) e 10 para ensaios ELISA demonstrados junto com 10 pacientes utilizados como controle (indivíduos jovens) para os ELISA na Tabela V. O sistema de gradação histológico Gleason e estadiamento dos adenocarcinomas da próstata, classificação de WHITMORE-JEWETT e TNM se encontram nos Anexos II e III, respectivamente.

Tabela I Parâmetros clínicos e laboratoriais dos pacientes utilizados para a extração de proteínas totais.
ND: não detectado; RAD/CAP: prostatectomia radical.

<i>Paciente</i>	<i>Idade</i>	<i>PSA pré-cirúrgico</i>	<i>Gleason</i>	<i>TNM</i>	<i>Origem da amostra</i>
CaP 1	67	ND	8	ND	Punção
CaP 2	50	17,9	6	T2aN0MX	Punção
CaP 3	62	14,3	6	ND	Punção
CaP 4	75	11,7	6	ND	Punção
CaP 5	66	12,47	6	ND	Punção
CaP 6	71	7,4	6	ND	Punção
CaP 7	53	7,1	6	ND	Punção
CaP 8	63	26	6	ND	Punção
CaP 9	74	5,9	7	T3bN0MX	RAD/CAP
CaP 10	58	12,2	6	T2cN0MX	RAD/CAP

Tabela II. Parâmetros clínicos e laboratoriais dos pacientes utilizados para a purificação de IgG. ND: não detectado; RTU/CAP: ressecção transuretral; RAD/CAP: prostatectomia radical.

<i>Paciente</i>	<i>Idade</i>	<i>PSA pré-cirúrgico</i>	<i>Gleason</i>	<i>TNM</i>	<i>Origem da amostra</i>
CaP 11	70	202.2	10	ND	RTU/CAP
CaP 12	57	6.2	6	T2cN0Mx	RAD/CAP
CaP 13	58	12.2	6	T2cN0Mx	RAD/CAP
CaP 14	64	5.52	6	ND	RAD/CAP
CaP 15	68	8.06	7	pT2c, pN0, pM0	RAD/CAP
CaP 16	71	82.49	8	ND	RTU/CAP
CaP 17	67	21.5	7	pT2a, pNx, pMx	RAD/CAP
CaP 18	62	ND	7	pT3c, pN1, pMx	RAD/CAP
CaP 19	80	13.7	7	pT3cNoMx	RAD/CAP
CaP 20	67	8.8	6	ND	RAD/CAP

Tabela III. Parâmetros clínicos e laboratoriais dos pacientes com CaP utilizados para os ELISAS. ND: Não detectado; RAD/CAP: prostatectomia radical; RTU: ressecção transuretral.

<i>Paciente</i>	<i>Idade</i>	<i>PSA pré-cirúrgico</i>	<i>Gleason</i>	<i>TNM</i>	<i>Origem da amostra</i>
CaP 21	57	7.25	6	T2CN0MX	RAD/CAP
CaP 22	57	6.2	6	T2CN0MX	RAD/CAP
CaP 23	68	11.1	6	T2aN0MX	RAD/CAP
CaP 24	74	5.9	7	T3bN0MX	RAD/CAP
CaP 25	74	9.2	6	pT2c	RAD/CAP
CaP 26	77	79.2	7	ND	RTU/CAP
CaP 27	63	6.68	6	T2CN0MX	RAD/CAP
CaP 28	75	10	6	T2bN0MX	RAD/CAP
CaP 29	67	ND	8	ND	Punção
CaP 30	50	17.9	6	T2aN0MX	Punção

Tabela IV. Parâmetros clínicos e laboratoriais dos pacientes com HPB utilizados para extração de proteínas totais. RTU/HPB: ressecção transuretral; RAD/HPB: prostatectomia radical.

<i>Paciente</i>	<i>Idade</i>	<i>PSA pré-cirúrgico</i>	<i>Origem da amostra</i>
HPB 1	61	15.2	RTU/HPB
HPB 2	61	2.99	RTU/HPB
HPB 3	78	5	RTU/HPB
HPB 4	79	3.55	RAD/HPB
HPB 5	79	5.8	RTU/HPB
HPB 6	67	6	RTU/HPB
HPB 7	73	8.7	RUT/HPB
HPB 8	54	12.33	RTU/HPB
HPB 9	58	0.9	RTU/HPB
HPB 10	61	4.3	RTU/HPB

Tabela V. Parâmetros clínicos e laboratoriais dos pacientes com HPB e controles (C.) utilizados para os ELISAS. ND: Não detectado; RAD/HPB: prostatectomia radical; RTU/HPB: ressecção transuretral.

<i>Paciente com HPB</i>	<i>Idade</i>	<i>Origem da amostra</i>	<i>PSA pré-cirúrgico</i>	<i>Paciente jovem (controle)</i>	<i>Idade</i>
HPB 11	87	RAD/HPB	24.28	C. 1	21
HPB 12	82	RTU/HPB	3.4	C. 2	21
HPB 13	69	RTU/HPB	10.1	C. 3	19
HPB 14	51	Punção	8.7	C. 4	25
HPB 15	68	Punção	8.2	C. 5	16
HPB 16	72	RTU/HPB	ND	C. 6	23
HPB 17	70	Punção	12	C. 7	19
HPB 18	69	RTU/HPB	ND	C. 8	22
HPB 19	75	RTU/HPB	7.1	C. 9	22
HPB 20	75	RTU/HPB	7.1	C. 10	27

As amostras foram coletadas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia pela equipe médica e ambulatorial do setor de Urologia e mediante autorização dos pacientes, os quais assinaram um termo de consentimento (Anexo I). O procedimento de coleta foi realizado dentro da rotina do setor cirúrgico, sem causar desconforto adicional aos pacientes.

Após a coleta o material foi levado ao laboratório de Genética Molecular da UFU e armazenado a -80°C para posterior processamento.

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa da UFU nº. 005/2001. Todas as técnicas de manipulação dos materiais biológicos seguiram normas do Código de Ética em Pesquisa com Humanos (Resolução CNS Nº 196/96). Os pacientes foram identificados por seus números de prontuários.

2.2 Extração de Proteínas Totais

Amostras com aproximadamente 20mg de próstatas de cada paciente foram trituradas com um homogenizador elétrico em tampão (400mM NaCl; 25mM EDTA pH 8,0; 50mM Tris pH 7,5; 2% SDS), e para preservação da integridade das proteínas foram adicionados os inibidores de protease benzamidina (10 μL a 100mM) e PMSF (3 μL a 150 mM). As amostras foram então incubadas a 37°C por 15 minutos e em seguida adicionou-se 300 μL de solução saturada de NaCl, e novamente incubou-se por 15 minutos agora a -20°C . Após o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas a 15000 rpm 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 dos 20 pacientes com CaP e com HPB individualmente foram reunidas em quantidades iguais, quantificadas e qualificadas em gel SDS-PAGE para verificação de sua qualidade.

2.3 Eletroforese em SDS-PAGE

A eletroforese foi realizada segundo Barbas *et al.* (2001), a concentração do gel foi de 16% (p/v). As amostras foram diluídas em 10 μ L de tampão de amostra (12mL de SDS a 10%, 6 mL de Glicerol 1mL de Tris-HCl 1M pH 6,8), desnaturadas a 100°C por dois minutos e aplicadas em cada poço do gel. Foi utilizado um marcador de peso molecular (*SIGMAMARKERTM, Wide Molecular Weight Range*) para determinar o tamanho das proteínas no gel. Foram utilizados dois tampões de corrida: ânodo (Tris-HCl 0,2M pH 8,9) e cátodo (Glicina 0,1M; Tris 0,1M; 0,1% de SDS). A corrente foi fixada em 120V e a corrida realizou-se por 4 horas.

Para a visualização e análise das proteínas resolvidas nos géis foram utilizados dois procedimentos de coloração: *coomassie-blue* e nitrato de prata.

2.4 Coloração de gel com *Coomassie-blue*

Após a eletroforese, o gel foi retirado do aparato e imerso em solução corante (0,2% de *Coomassie-blue* R-250, 50% de metanol, 10% de ácido acético e 40% de H₂O) por cerca de 10 minutos e lavado uma vez. Em seguida, para visualização das proteínas, adicionou-se solução descorante de gel (30% de etanol, 10% de ácido acético e 60% de H₂O), que foi trocada diversas vezes, até que o gel adquirisse contraste suficiente para visualização das bandas equivalentes às proteínas resolvidas.

2.5 Coloração de gel com nitrato de prata

Após a corrida, o gel foi corado com prata (SAMBROOK *et al.* 1989). Inicialmente incubou-se o gel durante 12 horas com solução de etanol: ácido acético glacial: água (30:10:60) para fixar as proteínas no gel. A solução fixadora foi então descartada e o gel incubado por 30 minutos, a temperatura ambiente, sob leve agitação com uma solução de etanol 30%. Este passo foi repetido, a solução de etanol foi descartada e o gel incubado duas vezes com água deionizada, durante 10 minutos, à temperatura ambiente e sob leve agitação.

A água foi removida e uma solução de AgNO_3 0,1% adicionada e descartada após 30 minutos. Após este processo os dois lados do gel foram lavados com água deionizada. Em seguida, uma solução aquosa de Carbonato de Sódio 2,5% e Formaldeído 0,02% foi acrescentada ao gel e mantida a temperatura ambiente, sob suave agitação. Com o surgimento das bandas a reação foi interrompida por Ácido Acético 1% e o gel foi lavado 3 vezes com Água Deionizada.

2.6 Purificação de Imunoglobulinas de Extrato Protéico

Amostras de extrato protéico de 10 pacientes com câncer de próstata (Tabela I) e 10 pacientes com HPB (Tabela IV) devidamente identificados e caracterizados por urologistas do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia foram submetidas a imunoprecipitação com microesferas magnéticas para isolamento de IgG segundo protocolo otimizado no Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia como a seguir: 2×10^9 microesferas foram lavadas três vezes com 500 μL de tampão MES (1M, pH 5,0), em seguida incubou-se 100 μL de amostras de extrato protéico de CaP e HPB por 40 minutos sob agitação. Após a 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).

A eluição das imunoglobulinas foi feita com tampão citrato de Na (1M pH 2,0) por duas vezes. O eluato coletado foi armazenado em tubo eppendorf contendo 20 μL de solução Tris (1M pH 9,0) para a neutralização do pH.

2.7 Ensaio *Dot Blot* com as IgG purificadas

Para averiguar o isolamento das IgG, elas foram blotadas em membrana porosa de nitrocelulose juntamente com amostras de proteínas de CaP remanescentes da purificação e de extrato protéico total de CaP. A sensibilização da membrana foi feita utilizando 5 μL das amostras. Em seguida a mesma foi bloqueada por 40 minutos com tampão TBST (Tween 20 %) acrescido de leite desnatado (2,5 %). Após o bloqueio a membrana foi lavada por três vezes com solução tampão TBST.

Incubou-se anti-IgG conjugada com fosfatase alcalina na concentração de 1:5000 por 1 hora. Em seguida a membrana foi lavada por três vezes com tampão TBST, e revelada com o substrato NBT/BCIP. A reação foi interrompida com água corrente.

2.8 Seleção de Peptídeos Recombinantes

2.8.1 Biopanning (seleção de fagos)

Foi utilizado 10 μL (2×10^{11} partículas virais) da biblioteca de peptídeos randômicos fusionados em fagos (Ph.D.-12 da *NEW ENGLAND BioLabs[®] Inc.*) para a seleção dos fagos ligantes às IgG presentes em tecidos. A biblioteca é composta de 12 aminoácidos randômicos que se encontram entre duas curtas seqüências espaçadoras Gly-Gly-Gly fusionada à região N-terminal da Proteína III de bacteriófagos filamentosos M13. Todas as cinco cópias da Proteína III dos fagos contém peptídeos amino-terminais.

Utilizando-se de uma placa de microtitulação (*Corning Incorporated Costar[®] 3591*), foram realizados 3 ciclos de seleção, em cada um deles um poço da placa foi adsorvido com 150 μL de IgG purificada (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em 0,1 M NaHCO_3 , pH 8,6) por 12-16 horas (overnight) a 4°C mantida sob baixa agitação, bloqueada com 250 μL de um tampão de bloqueio (0,1M NaHCO_3 , pH 8,6, 5 mg/mL BSA) por uma hora, a 4°C; e lavada seis vezes com TBST (TBS contendo 0,1% Tween-20).

Acrescentou-se no mesmo orifício da placa 10 μL da biblioteca diluída em 100 μL de TBST agitando-se por uma hora à temperatura ambiente. Fagos não ligantes foram removidos por dez lavagens com TBST (0,1% Tween-20) nos três ciclos seleção. Para eluição negativa, os fagos específicos às proteínas totais de HPB e proteínas normais foram eluídos por afinidade com 10 μg de proteínas totais de HPB diluídas em 90 μL de TBS por 60 minutos sob agitação, à temperatura ambiente. Em seguida foi feita a lavagem com TBST por seis vezes. Para eluição positiva, os fagos ligantes foram eluídos por afinidade com 10 μg das proteínas totais de CaP (sobrenadante coletado após purificação das IgG), e o eluato de fagos foi recolhido e utilizado para a titulação.

O eluato remanescente foi amplificado retirando-se uma colônia (isolada) de *Escherichia coli* linhagem ER2738 previamente crescida em meio LB (0,2g LB + 20mL de água destilada e posterior esterilização) com tetraciclina, sob agitação a 37°C até a fase *early-log* ($\text{OD}_{600} \sim 0,3$) e incubou-se a 37°C por 4-5 horas sob forte agitação. A cultura foi submetida à centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C e recentrifugada para total separação das bactérias. Logo após, 80% do sobrenadante foi transferido para um tubo esterilizado e adicionou-se 1/6 do volume de PEG/NaCl (20% de Polietilenoglicol 8000 e 2,5 M de NaCl – solução estéril) incubando-se por 12-16 horas a 4°C. Decorrida a precipitação, centrifugou-se a solução a 10000 rpm por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e centrifugou-se,

brevemente, outra vez para remoção de sobrenadante residual. O precipitado foi suspenso em 1mL de TBS e precipitou-se novamente com 1/6 do volume de PEG/NaCl incubado em gelo por 1 hora. Centrifugou-se a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C descartando o sobrenadante e repetiu-se a centrifugação brevemente para remoção de sobrenadante residual. O precipitado foi ressuspenso em 200µL TBS, 0.02% NaN₃, obtendo-se então o eluato amplificado, que foi posteriormente titulado e armazenado a 4°C.

2.8.2 Titulações

O número de entrada e saída das partículas virais durante os ciclos do *biopanning* é determinado pela titulação.

A solução de fagos a ser titulada foi submetida a diluições seriadas de 10 vezes em meio LB. Para eluatos não amplificados foram utilizadas as diluições de 10⁻¹ até 10⁻⁴; no caso de soluções com fagos amplificados a faixa de diluição utilizada foi de 10⁻⁸ a 10⁻¹¹. Cada diluição foi acrescida de 200µL da cultura de *Escherichia coli* ER2738 na fase *mid-log* (OD₆₀₀ ~0,5). Esta mistura foi agitada brevemente e incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. As bactérias, agora infectadas, foram transferidas para tubos de cultura contendo 3mL de agarose top (0,06g LB; 0,003g MgCl₂ · 6H₂O; 0,021g Agarose) a 55°C e espalhadas sobre uma placa de Petri contendo meio LB sólido, com IPTG/Xgal e tetracilina. Para cada diluição foi confeccionada uma placa.

As placas foram incubadas a 37°C, durante 16 horas. Após este período, as colônias das placas que apresentavam aproximadamente 100 colônias foram contadas. Cada número foi multiplicado pelo fator de diluição de cada placa para se obter o título dos fagos.

2.8.3 Extração de DNA de fagos

Colônias isoladas dos fagos foram coletadas de uma placa de titulação provenientes do 3º ciclo de seleção do *biopanning* e amplificadas em meio de cultura LB em placas *deepwell* contendo 1mL de cultura de ER2738 em fase *early-log* (OD₆₀₀ ~ 0,3), sendo que em cada poço foi adicionado somente uma colônia contendo o fago. A placa foi vedada e incubada a 37°C por um período de 24 horas. Após a incubação, a placa foi submetida a uma centrifugação de 10 minutos, 20°C a 3.700 RPM para precipitação das bactérias e isolamento dos fagos, e então foi coletado 800 µL do sobrenadante com pipeta e armazenado em nova placa *deepwell*. Acrescentou-se aos poços da nova placa 350 µL de PEG/NaCl e incubou-se

por 10 minutos à temperatura ambiente. Após o período de incubação, os tubos foram centrifugados a 3700 rpm, 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) foi adicionado ao precipitado de fagos para ressuspensão.

A placa sofreu forte agitação, e foi adicionado aos poços 250 µL de etanol para incubação de 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida a placa foi centrifugada por 40 minutos a 20°C a 3700 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 150 µL de etanol 70% e recentrifugado. O DNA do fago foi então ressuspedido em 20 µL de água Milli-Q, e pôde ser verificada a sua qualidade por corrida eletroferética em gel de agarose 0,8% corado com solução de brometo de etídeo.

2.8.4 Sequenciamento

Foram utilizados para reação de sequenciamento 500 ng de DNA molde de 5pmol 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). Para a realização de reação de 35 ciclos foi utilizado um termociclador de placas (MasterCycler – Eppendorf) nas seguintes condições: desnaturação (a 95°C por 20 segundos); anelamento do *primer* (a 58°C por 15 segundos) e extensão (a 60°C por um minuto). O DNA seqüenciado foi precipitado com 1µL de acetato de amônio e etanol, homogeneizando a placa com leves batimentos. Então foram acrescentados 27,5µL de etanol absoluto, em seguida, a placa foi centrifugada por 45 minutos, a 4000 rpm e o sobrenadante descartado. Adicionou-se 150µL de Etanol 70% ao DNA precipitado e centrifugou-se por 10 minutos, a 4000 rpm. A solução de Etanol foi descartada, a placa permaneceu invertida sobre um papel toalha e nesta posição foi pulsada a 800 rpm, durante um segundo. A placa foi coberta por um papel alumínio e assim ficou durante cinco minutos para evaporar o etanol remanescente. Os precipitados resultantes foram ressuspendidos no tampão de diluição (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit. – Amersham Biosciences).

A leitura do seqüenciamento foi realizada em um seqüenciador automático MegaBace 1000 (Amersham Biosciences) no laboratório de Genética Molecular (UFU) .

2.8.5 Análise por Bioinformática

As seqüências de DNA foram traduzidas após o sequenciamento, pelo programa DNA2PRO12. Este programa é designado para tradução de seqüências de insertos tanto de bibliotecas da *New England Biolabs (Ph.D.-12TM or Ph.D.-C7CTM)* quanto de outras bibliotecas de interesse que contiverem as seqüências 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 na seqüência, tais como códons inesperados ou erros na seqüência próxima (<http://relic.bio.anl.gov/dna2pro12.aspx>).

Para o cálculo da freqüência de cada aminoácido presente nos peptídeos seqüenciados e a diversidade dos mesmos, foi utilizado o programa AADIV (<http://relic.bio.anl.gov/aafreqs3.aspx>), e para calcular a diversidade e a derivação padrão dos aminoácidos em cada posição nos peptídeos utilizou-se o programa DIVAA (<http://relic.bio.anl.gov/divaa.aspx>).

As seqüências traduzidas foram submetidas às análises de homologia com proteínas depositadas em banco de dados utilizando a ferramenta BLASTp (*Basic Local Alignment Search Tool*) com o banco de dados do *Swissprot* que tem por finalidade encontrar similaridades e alinhar as seqüências de interesse. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).Com).

2.9 ELISA (Imunoensaio Enzimático)

Foram realizados ensaios imunoenzimáticos (ELISA) com soros de 10 pacientes com CaP (Tabela III), 10 com HPB e 10 indivíduos jovens (controles) demonstrados na Tabela V para verificação da reatividade dos clones selecionados às IgG dos pacientes.

As placas de microtitulação de alta afinidade foram sensibilizadas em duplicata para todas as amostras, com 0,5µg de anticorpo anti-M13 por 16 horas a 4°C. Decorrido o tempo de incubação as placas foram bloqueadas com TBS Caseína 2,0% por 1 hora à temperatura ambiente sob leve agitação. Em seguida as placas foram lavadas três vezes com TBST (0,05% de Tween 20). O sobrenadante dos clones amplificados (contendo fago e meio de cultura LB) foi incubado nas placas durante 90 minutos a 37°C. As placas foram então novamente lavadas por 3 vezes com TBST (0,05% de Tween 20) e incubadas com os soros dos pacientes na concentração de 1:750 diluídos em caseína 2,0% TBST (0,01% Tween 20) por 1 hora a 37°C. Após esse período de incubação foram lavadas com TBST (0,01% Tween 20) e incubadas

com anti-IgG conjugada com peroxidase diluídas 1:5000 em caseína 2,0% TBST (0,01% T) por 1 hora a 37°C, lavadas novamente e a ligação antígeno/anticorpo foi revelada com substrato de tetrametilbenzidina (TMB). Após 15 minutos a reação foi interrompida com ácido sulfúrico e efetuada a leitura a 450 nm em leitor de microplacas.

O índice ELISA (IE) para os soros testados foi calculado realizando a divisão da média das densidades óticas (DO) das duplicatas pelo valor de *cut off*. O *cut off* foi calculado somando-se a média dos controles negativos (fago selvagem) com 2 desvios padrão.

Os IEs maiores que 1 foram considerados positivos e os IEs menores que 1 foram considerados negativos.

Para determinação dos parâmetros de validação diagnóstica foram calculados a sensibilidade, a especificidade e a acurácia da reatividade dos clones em relação aos soros dos pacientes com CaP, HPB e controles.

A sensibilidade diagnóstica corresponde à medida da capacidade do teste em detectar todos os indivíduos com determinada doença, apresentando a porcentagem de todos os pacientes positivos. A especificidade se refere à capacidade do teste em ser negativo quando o indivíduo não possui a doença, podendo ser calculado como a porcentagem de resultados negativos em pacientes sem a doença. E a acurácia é a eficiência dos testes, a concordância global dos resultados verdadeiros positivos e negativos em indivíduos com e sem a afecção (Tabela VI).

O cálculo para sensibilidade, especificidade e acurácia são realizados pelas seguintes fórmulas:

Tabela VI. Relações entre pacientes doentes e não doentes e respectivas reatividades em testes diagnósticos.

<i>Pacientes</i>	+	-
<i>Doentes</i>	a	b
<i>Não Doentes</i>	c	d

Sensibilidade: $a / (a + b)$

Especificidade: $d / (c + d)$

Acurácia: $a + d / (a + b + c + d)$

3. RESULTADOS

3.1 Extração de Proteínas

A qualidade das proteínas extraídas dos tecidos prostáticos pode ser verificada pela resolução em gel de acrilamida SDS-PAGE o qual demonstra a boa qualidade das mesmas (Figura 5).

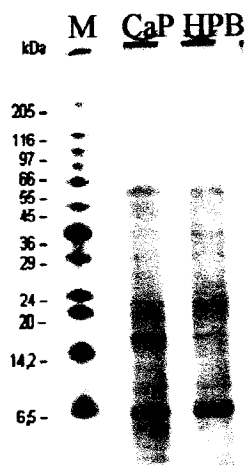


Figura 5. Eletroforese SDS-PAGE (16%) proteínas totais extraídas de amostras de tecido de próstata de pacientes com CaP e HPB observadas em gel de acrilamida corado com nitrato de prata, M - marcador de peso molecular.

3.2 Purificação de Imunoglobulinas de Extrato Protéico

Extratos protéicos de 10 pacientes com câncer de próstata (Tabela II) devidamente identificados e caracterizados por urologistas, foram purificados por imunoprecipitação com microesferas magnéticas ativadas com proteína G para obtenção de IgG para seleção dos peptídeos recombinantes.

A utilização de microesferas magnéticas foi importante, pois é uma metodologia rápida e eficaz na obtenção de IgG de boa qualidade utilizando-se pequena quantidade de amostra. A Figura 6 apresenta um gel SDS-PAGE das imunoglobulinas tipo G purificadas com microesferas magnéticas.

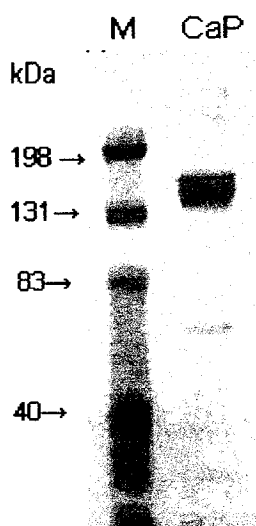


Figura 6. Eletroforese em SDS-PAGE (Gel 16%) corado com *coomassie blue*. Enriquecimento de IgG obtidas por imunoprecipitação com microesferas magnéticas. M - marcador de peso molecular e CaP - câncer de próstata.

3.3 Ensaio *Dot Blot* com as IgG purificadas

O ensaio *dot blot* permitiu a confirmação da presença de anticorpos nas amostras de extrato protéico total de CaP, bem como na amostra purificada pelas microesferas magnéticas. A membrana de nitrocelulose (Figura 7) apresenta as diferentes marcações entre as IgGs isoladas das amostras de CaP, as proteínas remanescentes (solução da qual foram capturadas as imunoglobulinas) e das amostras de extrato de proteína total, comprovando a eficiência da metodologia utilizada para o isolamento das IgG de tecidos prostáticos.

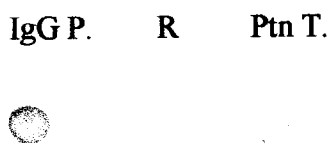


Figura 7. Membrana de *Dot Blot* das amostras de IgG purificada (IgG P.), proteínas remanescentes (R) e de extrato de proteína total (Ptn. T.) de amostras de CaP.

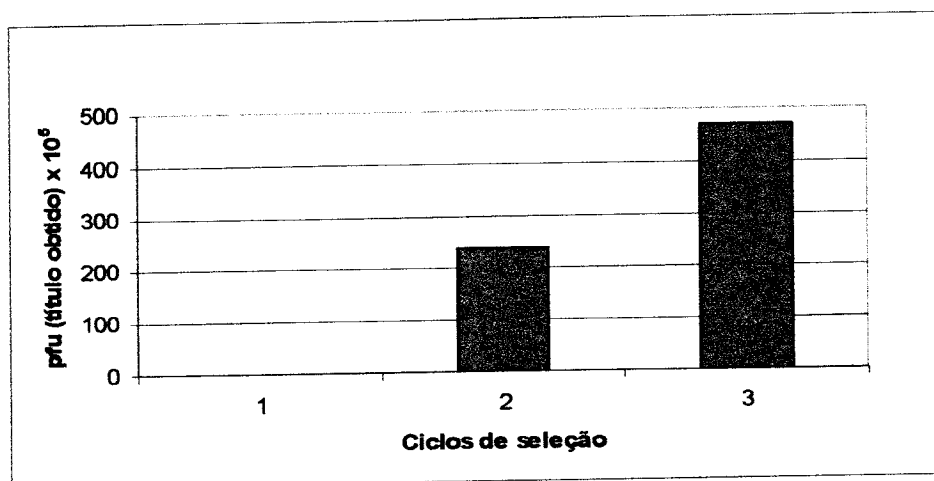


Figura 8. Enriquecimento de partículas de fagos nos três ciclos de seleção do *biopanning*.

3.4.2 Extração de DNA dos fagos e Sequenciamento

Após crescimento em meio de cultura de 200 colônias individuais, isoladas da placa de titulação provenientes do 3º ciclo de seleção do *biopanning*, os fagos tiveram seu DNA extraído.

O DNA dos clones foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8%, para verificação de sua qualidade e quantidade, através da comparação com a banda da amostra de DNA padrão (Figura 9). Em seguida o DNA foi seqüenciado e analisado.

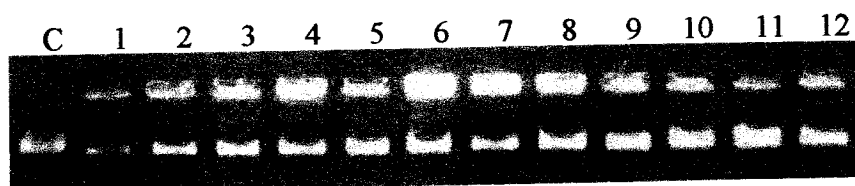


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 0,8% de 12 amostras de DNA extraído de fagos (1-12) aleatoriamente escolhidos e de 300ng de DNA controle (C) com 7249 pb.

Dos 200 clones seqüenciados, apenas 165 apresentaram seqüências válidas (sem erros de seqüenciamento), onde foram identificadas 12 seqüências diferentes e as demais ocorrendo repetidas vezes. A Tabela VIII mostra a freqüência de cada clone.

Tabela VIII. Frequência dos clones de fagos selecionados.

<i>Clone</i>	<i>Frequência</i>	
<i>Clone 1</i>	139/165	84,24%
<i>Clone 2</i>	10/165	6,06%
<i>Clone 3</i>	1/165	0,60%
<i>Clone 4</i>	1/165	0,60%
<i>Clone 5</i>	1/165	0,60%
<i>Clone 6</i>	2/165	1,21%
<i>Clone 7</i>	6/165	3,63%
<i>Clone 8</i>	1/165	0,60%
<i>Clone 9</i>	1/165	0,60%
<i>Clone 10</i>	1/165	0,60%
<i>Clone 11</i>	1/165	0,60%
<i>Clone 12</i>	1/165	0,60%

3.4.3 Análise por Bioinformática

A tradução das seqüências de DNA foi realizada pelo programa DNA2PRO12, e o cálculo da frequência de cada aminoácido nos peptídeos seqüenciados pelo programa AADIV. A Tabela VIX apresenta a comparação entre a frequência dos vinte aminoácidos presentes nos peptídeos ligantes e a frequência esperada dos aminoácidos na biblioteca original.

Mais uma vez observa-se que a seleção foi eficiente pelo fato de os aminoácidos Cisteína, Glutamina e Valina terem sido selecionados negativamente apresentando frequência bem abaixo do esperado, e pela seleção positiva dos aminoácidos Metionina, Asparagina e Prolina que apresentaram frequência bem acima da frequência esperada.

Tabela XIX. Frequência dos aminoácidos individuais dos peptídeos expressos nos fagos selecionados pelas IgG e a frequência esperada dos aminoácidos na construção da biblioteca realizado pelo AADIV.

<i>Aminoácidos</i>		<i>Frequência</i>	
		<i>Esperada</i>	<i>Observada</i>
<i>a (Alanina)</i>	<i>Ala</i>	6,2%	6,94%
<i>c (Cisteína)</i>	<i>Cis</i>	3,1%	0%
<i>d (Aspartato)</i>	<i>Asp</i>	3,1%	2,08%
<i>e (Glutamato)</i>	<i>Glu</i>	3,1%	2,08%
<i>f (Fenilalanina)</i>	<i>Fen</i>	3,1%	5,56%
<i>g (Glicina)</i>	<i>Gly</i>	6,2%	3,47%
<i>h (Histidina)</i>	<i>His</i>	3,1%	5,56%
<i>i (Isoleucina)</i>	<i>Ile</i>	3,1%	2,78%
<i>K (Lisina)</i>	<i>Lys</i>	3,1%	4,17%
<i>l (Leucina)</i>	<i>Leu</i>	9,4%	11,81%
<i>m (Metionina)</i>	<i>Met</i>	3,1%	6,25%
<i>n (Asparagina)</i>	<i>Asn</i>	3,1%	6,25%
<i>p (Prolina)</i>	<i>Pro</i>	6,2%	11,81%
<i>q (Glutamina)</i>	<i>Gln</i>	6,2%	1,39%
<i>r (Arginina)</i>	<i>Arg</i>	9,4%	5,56%
<i>s (Serina)</i>	<i>Ser</i>	9,4%	9,03%
<i>t (Treonina)</i>	<i>Thr</i>	6,2%	7,64%
<i>v (Valina)</i>	<i>Val</i>	6,2%	2,78%
<i>w (Tryptofano)</i>	<i>Trp</i>	3,1%	2,08%
<i>y (Tirosina)</i>	<i>Tyr</i>	3,1%	2,78%

DIVAA é uma medida quantitativa de diversidade de sucessão dos aminoácidos, e gera hipóteses relativas à contribuição de resíduos individuais para as relações funcionais e evolutivas entre proteínas. A Figura 10 apresenta um gráfico realizado pelo programa DIVAA que calcula a diversidade de aminoácidos em cada uma das 12 posições nos peptídeos, mostrando as posições onde ocorreu a maior diversidade de aminoácidos, o gráfico mostra que nas posições 5 e 12 houve a maior diversidade de aminoácidos enquanto que as diversidade nas posições 4 e 8 a diversidade foi reduzida.

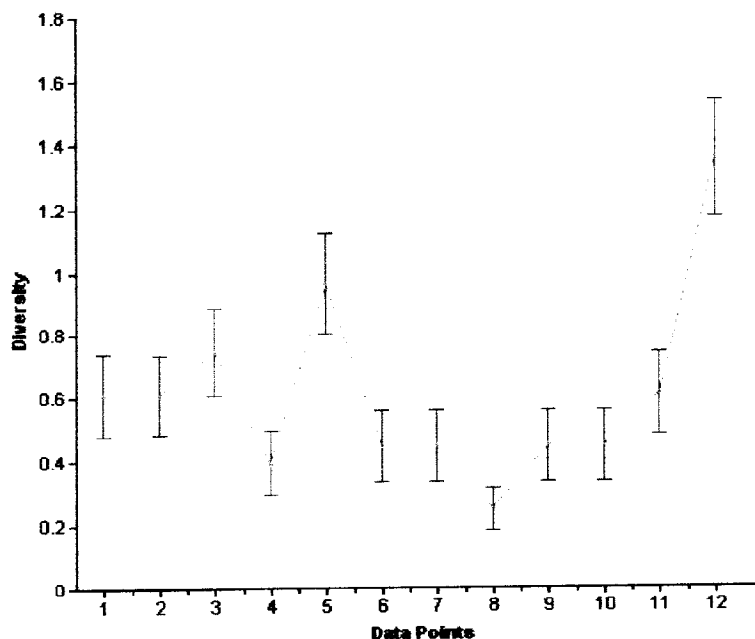


Figura 10. Gráfico construído pelo programa DIVAA que ilustra a diversidade de sucessão dos aminoácidos em cada posição nos peptídeos.

Não foram encontradas homologias completas nas investigações realizadas nas seqüências de proteínas humanas do *GeneBank* pelo BLASTp com o banco de dados do *Swissprot* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Os alinhamentos revelaram similaridades entre os peptídeos selecionados e proteínas relacionadas a receptores de membranas, reguladores transcricionais associados ao câncer, componentes do sistema imune, supressor de tumor, entre outros (Tabela X). Devido a alguns peptídeos possuírem alinhamentos relevantes a mais de uma proteína, alguns dos clones apresentam na Tabela X dois dos mais relevantes alinhamentos obtidos pelo banco de dados do Swissprot.

Tabela 2 Alinhamento das seqüências protéicas dos peptídeos selecionados mostrando as homologies encontradas com as proteínas anotadas no banco de dados do GeneBank pelo BLAST, com os números de acesso no Swissprot.

<i>Peptideo</i>	<i>Swissprot</i>	<i>Potenciais antígenos</i>
<i>Cone 1</i>	O14686	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 2 Pode estar envolvida na regulação transcricional. Este gene foi mapeado de uma região cromossômica envolvida em duplicações e translocações associadas com câncer. Localização subcelular: Núcleo
<i>Cone 2</i>	P5840	Glicogênio sintase 2 Transfere um resíduo glicosil de UDP-Glc para a extremidade final não redundante alfa-1,4-glucan.
<i>Cone 3</i>	Q8NHP6 →	Motile sperm domain-containing protein 2. Função: estrutural molecular
<i>Cone 4</i>	Q8WU17 → Q92545	Proteína RING finger 139 (Translocation in renal carcinoma on chromosome 8) Proteína Transmembrana 131
<i>Cone 5</i>	O14686	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 2 Pode estar envolvida na regulação transcricional. Este gene foi mapeado de uma região cromossômica envolvida em duplicações e translocações associadas com câncer. Localização subcelular: Núcleo
<i>Cone 6</i>	P56278 →	Proteína FAM65B Chromosome 6 open reading frame 32 Proteína pode estar envolvida estimulando a formação do sincício não mitótico do citotrofoblasto proliferativo durante a diferenciação do trofoblasto.
<i>Cone 7</i>	Q9Y4F9 → Q05952 →	Proteína MTCP-1 13 (Mature T-cell proliferation-1 type B1) Proteína que pode estar envolvida em translocações associadas com proliferação de células T. Proteína de transição 2 TNP2
<i>Cone 8</i>	- Q8TDC0 → Q96ID5 →	Similar to Glioma tumor suppressor candidate region gene 1 protein Miosina 3 (Calsarcina 3) Novo membro músculo-esquelético da família da calsarcina. Superfamília de imunoglobulina, membro 21

Clone 9	P53539	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B Gene que codifica proteínas que podem estar relacionadas como reguladoras da proliferação, da diferenciação e da transformação da célula.
Clone 10	Q99932	Antígeno associado ao esperma Esta proteína é localizada em células germinativas dos testículos em todos os estágios da espermatogênese e localizada na região acrossomal de espermatozoides maduros.
Clone 11	Q5JUW0	Proteína Zinc Finger 673 Proteína que pode estar envolvida na regulação da transcrição.
Clone 12	Q9H813	Chromosome 1 open reading frame 75 Codifica proteína transmembrana.

3.5 ELISA (Imunoensaio Enzimático)

A Figura 11 apresenta um painel de reatividade dos 12 clones selecionados em relação aos soros de pacientes com CaP, HPB e controles (pacientes jovens) demonstrados com marcações a partir dos resultados considerados positivos para IEs maiores que 1. IEs menores que 1 foram considerados negativos não apresentando marcações.

A Figura 10 demonstra que os 12 clones selecionados são reativos contra os soros de pacientes com CaP testados, sendo os clones 1 e 4 os mais sensíveis, seguidos dos clones 2, 8, 3, 6, 7, 9, 10 e 12. Os clones 11 e 5 apresentam baixa sensibilidade em relação aos soros de CaP.

Todos os clones apresentaram reatividade para os soros de pacientes com HPB, sendo 60% somente em um dos soros testados.

Os clones 1, 6, 7, 8 e 12 não apresentaram reatividade em relação aos soros de pacientes controles (jovens).

Grupos de Pacientes	Clones											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CaP 21	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
CaP 22	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
CaP 23	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
CaP 24	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
CaP 25	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
CaP 26	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
CaP 27	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
CaP 28	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
CaP 29	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
CaP 30	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
HPB 1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
HPB 2	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
HPB 3	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
HPB 4	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
HPB 5	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
HPB 6	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
HPB 7	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
HPB 8	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
HPB 9	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
HPB 10	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
C. 1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
C. 2	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
C. 3	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
C. 4	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
C. 5	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
C. 6	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
C. 7	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
C. 8	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
C. 9	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
C. 10	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Figura 11. Painel de reatividade dos clones selecionados (1-12) apresentando marcações em cinza para IEs maiores do que 1 considerados positivos para soros dos pacientes com CaP, HPB e controles sadios (C).

A sensibilidade, a especificidade e a acurácia da reatividade dos clones em relação aos pacientes com CaP, HPB e controles foram calculados e demonstrados na Tabela XI como determinação dos parâmetros de validação diagnóstica.

Os clones 1 e 4 apresentaram alta sensibilidade, especificidade e acurácia, porém os clones 6, 7, 8 e 12 apesar de terem apresentado menor sensibilidade, demonstraram possuir alta especificidade para os testes diagnósticos realizados.

Em relação aos soros dos pacientes com HPB, os clones 5, 6, 7, 8, 9 e 12 apresentam especificidade de 90%, seguidos dos clones 1, 3, 4 e 11 com 80% e os clones 2 e 10 com 70% e 60%, respectivamente.

Para os soros controles (pacientes jovens), 50% dos clones (1, 6, 7, 8 e 12) são 100% específicos, os demais clones apresentam especificidade entre 80% e 90%.

A acurácia se refere à eficiência dos testes, demonstrando que os clones com maiores valores de sensibilidade e especificidade possuem igualmente maior acurácia, como os clones 1 e 4. Clones como 6, 7 e 8 que possuem alta especificidade porém menores valores de sensibilidade decrescem nos valores de acurácia.

Tabela XI. Sensibilidade, Especificidade e Acurácia dos testes ELISA para os soros dos pacientes com CaP, HPB e controles em relação aos clones selecionados (Clones 1 a 12).

	<i>Sensibilidade (CaP)</i>	<i>Especificidade (HPB/C)</i>	<i>Acurácia (HPB/C)</i>
<i>Clone 1</i>	70%	80%/100%	75%/85%
<i>Clone 2</i>	60%	70%/80%	65%/70%
<i>Clone 3</i>	50%	80%/80%	65%/65%
<i>Clone 4</i>	80%	80%/90%	80%/85%
<i>Clone 5</i>	30%	90%/90%	60%/60%
<i>Clone 6</i>	50%	90%/100%	70%/75%
<i>Clone 7</i>	50%	90%/100%	70%/75%
<i>Clone 8</i>	60%	90%/100%	75%/80%
<i>Clone 9</i>	50%	90%/80%	70%/65%
<i>Clone 10</i>	50%	60%/80%	55%/65%
<i>Clone 11</i>	20%	80%/90%	50%/55%
<i>Clone 12</i>	40%	90%/100%	65%/70%

No intuito de se obter uma maior eficiência em testes diagnósticos quando utilizados os mesmos parâmetros de validação, foram realizadas combinações entre os clones selecionados.

As combinações entre os clones 1 + 4, 1 + 6, 1 + 8 e 8 + 10, apresentam melhores resultados para diagnóstico como mostra a Tabela XII.

A combinação entre os clones 1 + 4 apresenta uma sensibilidade no teste de 100% e especificidade de 70% para pacientes com HPB e 90% para pacientes controles. Os clones combinados 1 + 6 e 1 + 8 demonstram um maior equilíbrio entre os valores de sensibilidade e especificidade, pois a sensibilidade para os dois é de 90%, e a especificidade é de 80% para os pacientes com HPB e 100% para os pacientes controles.

A acurácia prevalece com 85% para pacientes com HPB e 95% para pacientes controles em 75% das combinações dos clones.

Tabela XII. Sensibilidade, Especificidade e Acurácia dos testes ELISA para os soros dos pacientes com CaP, HPB e controles em relação às combinações dos clones (1 + 4, 1 + 6, 1 + 8 e 8 + 10).

	<i>Sensibilidade (CaP)</i>	<i>Especificidade (HPB/C)</i>	<i>Acurácia (HPB/C)</i>
<i>Clone 1 + Clone 4</i>	100%	70%/90%	85%/95%
<i>Clone 1 + Clone 6</i>	90%	80%/100%	85%/95%
<i>Clone 1 + Clone 8</i>	90%	80%/100%	85%/95%
<i>Clone 8 + Clone 10</i>	90%	50%/80%	70%/70%

4. DISCUSSÃO

No presente estudo, peptídeos miméticos de proteínas tumorais foram selecionados por *Phage Display* através do isolamento de imunoglobulinas tipo G provenientes de tecido tumoral prostático para a identificação de marcadores para o câncer de próstata.

Os anticorpos utilizados como alvos para a seleção dos peptídeos sintéticos foram purificados com microesferas magnéticas ativadas com proteínas G. A utilização de partículas submícron com separação magnética têm sido amplamente aplicada para diversas finalidades, como imobilização e separação de células bacterianas para possíveis aplicações em diagnósticos microbiológicos (KRETZER *et al.*, 2007), seleção de peptídeos contra hormônio liberador de gonadotrofina conjugado com os beads, neste caso os autores promoveram o *biopanning* com o antígeno acoplado às microesferas (XIAO *et al.*, 2007), e captura de linfomas de células B para seleção de peptídeos com a finalidade de encontrar novos marcadores para o diagnóstico do câncer (MCGUIRE *et al.*, 2006).

A seleção dos peptídeos a partir de prováveis autoanticorpos presentes nos tecidos prostáticos aumenta a probabilidade de uma seleção mais específica aos antígenos tumorais. Estudos para identificar autoanticorpos contra antígenos tumorais nos pacientes com câncer de próstata sugerem que tais autoanticorpos podem ter valor diagnóstico e prognóstico (WANG *et al.*, 2005).

Repertórios imunológicos que reconhecem células tumorais são dados pelo sistema imune. Eles contêm elevada frequência de anticorpos com afinidade para o antígeno de interesse, aumentando assim as possibilidades de isolar aqueles com a especificidade desejada (POPKOV *et al.*, 2004).

Vários estudos têm sido reportados com autoanticorpos contra diferentes proteínas tumorais em diversos tipos de cânceres: p53 (CRAWFORD; PIM; BULBROOK, 1982; COOMBER; WARD, 2001), fator de crescimento de fibroblasto (ZIMERING; THAKKERVARIA, 2002), proteínas ribossomais (SCHEURLE *et al.*, 2000), entre outros.

Seqüências peptídicas que reconhecem altas quantidades de ligantes tais como anticorpos monoclonais, receptores e carboidratos têm sido identificadas com sucesso após seleção por *Phage Display* (KIM *et al.*, 2005).

Além de os anticorpos terem sido purificados diretamente dos tecidos prostáticos, para que a especificidade dos peptídeos fosse assegurada foram realizadas eluições negativas durante os ciclos do *biopanning*, com o intuito de “subtrair” fagos ligantes a proteínas

expressas em tecidos com HPB e normais, utilizando-se extratos de proteínas totais dos mesmos. Mikhail Popkov *et al.* (2004) utilizaram passos de seleção negativa para remover reações cruzadas dos clones com antígenos comuns em *Phage Display*, assim como Hou T. S. *et al.* (2004) que utilizaram essa metodologia para identificar peptídeos ligantes específicos aos neurônios de camundongo e Jia W. D. *et al.* (2006) para identificar peptídeos com capacidade de promover a invasão metastática em carcinoma hepatocelular.

O enriquecimento do número de fagos durante os três ciclos de seleção já é esperado pelo fato de que, a cada ciclo, clones/fagos com determinadas seqüências foram sendo retidos para subsequente eluição e amplificação no ciclo seguinte. Os títulos dos fagos na entrada do *biopanning* são sempre maiores que os títulos de saída, pois os fagos com maior afinidade aos anticorpos imobilizados na placa ficam ligados a estes pela interação com o parátipo, e o restante dos fagos com baixa ou sem afinidade aos anticorpos são removidos pelas lavagens. Fagos com baixa afinidade pelos anticorpos podem ficar aderidos diretamente à placa, não interagindo com os anticorpos, ou ainda permanecendo suspensos na solução (não ligados), assim após as sucessivas lavagens muitos destes fagos não específicos são excluídos levando à redução nos títulos após as etapas de *biopanning*.

Durante as três etapas de seleção dos fagos a concentração de Tween 20 foi mantida constante em 0,1% devido ao fato de a seleção já possuir alta estringência, pois foram realizadas eluições negativas durante a seleção. A Tabela VII demonstra o aumento crescente no número de partículas virais selecionadas nos três ciclos ($6,0 \times 10^4$ pfu - $2,4 \times 10^6$ pfu - $4,7 \times 10^6$), confirmando a seleção de fagos específicos a cada ciclo de seleção.

A Tabela VIII mostra o total dos clones seqüenciados e a freqüência das seqüências válidas. De 200 clones seqüenciados, foram obtidas 165 seqüências válidas num total de 12 fagos diferentes, sendo que o fago 1-T possui freqüência de 84,24% se mostrando como clone imunodominante.

As freqüências dos aminoácidos individuais dos peptídeos expressos nos fagos selecionados foram realizadas pelo programa AADIV. A comparação confirma a eficiência da seleção dos peptídeos, pois os aminoácidos Cisteína, Glutamina e Valina que foram selecionados negativamente apresentaram freqüência bem abaixo do esperado, enquanto que os aminoácidos Prolina, Metionina e Asparagina foram selecionados positivamente apresentam freqüência acima do esperado, sugerindo a interação peptídeo-proteína para a maioria desses aminoácidos.

Não foram encontradas homologias completas nas investigações realizadas nas seqüências de proteínas humanas do *GeneBank* pelo BLASTp. Vários autores relatam a falta de

homologias perfeitas dos peptídeos selecionados com as proteínas anotadas (SANTAMARIA *et al.*, 2001, HU *et al.*, 2006, DU *et al.*, 2006). Isso pode ser explicado pelo fato da seleção dos fagos ser direcionada para aminoácidos que não dificultem a infectividade do fago durante a replicação, o que diminui o número de partículas virais durante as ampliações, havendo substituição desses aminoácidos por outros com as características físico-químicas semelhantes. Dybwad; Sioud; Zouali, (2003) mesmo não encontrando homologias perfeitas, sugerem possíveis proteínas alvo apresentadas nos alinhamentos com similaridade significativa aos seus peptídeos.

Os alinhamentos revelaram similaridades entre os peptídeos selecionados e proteínas relacionadas à regulação transcricional e translocações associadas ao câncer (clones 1, 5 e 11); glicogênio sintase 2 (clone 2); proteína relacionada à motilidade no esperma e translocação em carcinoma renal (clone 3); proteína transmembrana (clones 4 e 12); translocações associadas à proliferação de células T (clone 6); supressor de tumor (clone 7); proteína miosina (clone 8); proteínas reguladoras da proliferação, diferenciação e transformação da célula (clone 9) e antígeno associado ao esperma (clone 10).

Os métodos imunológicos de quantificação da concentração de antígenos fornecem sensibilidade e especificidade extraordinárias, e se tornaram técnicas padrão tanto para as aplicações clínicas quanto em pesquisa (ABBAS; LICHTMAN, 2005). Ensaios de imunoabsorção por ligação enzimática são comumente empregados para detecção de uma infinidade de anticorpos em soros humanos.

A Tabela IX demonstra que todos os clones selecionados apresentaram reatividade contra os soros de pacientes com CaP testados, sendo que o clone 1 e o clone 4 com maiores valores de sensibilidade do que os demais. Os clones 2 e 10 apresentaram baixa especificidade em pacientes com HPB, isso provavelmente se deve ao fato de a análise anatomopatológica dos pacientes ser subjetiva. Todos os clones apresentaram valores acima de 80% de especificidade para os pacientes controles, sendo que 50% dos fagos apresentou 100% de especificidade, sugerindo que a seleção dos clones contra proteínas tumorais foi eficiente.

Portefaix J. M. *et al.* (2001) investigaram a sensibilidade e a especificidade de *phage-ELISA* utilizando amostras de uma série de doadores saudáveis e pacientes com vários tipos de câncer para detecção de anticorpos anti-p53 utilizando a proteína p53 sintética ou peptídeos selecionados por *Phage Display* comprovando a especificidade para detecção desses anticorpos.

Um estudo da resposta imune humoral de pacientes com câncer de mama em um painel de antígenos tumorais humanos identificados por *Phage Display* revela que os anticorpos contra

esses antígenos é indicativo de potencial uso como marcadores em imunoterapia ou em diagnóstico (PAVONI *et al.*, 2006).

Bradford T. J. *et al.* (2006) desenvolveram um perfil de 22 peptídeos para reagir com autoanticorpos expressos em soros de pacientes com câncer de próstata. O uso deste perfil têm sido capaz de detectar o câncer de próstata em um pequeno e preliminar grupo, com uma especificidade de 88,2% e uma sensibilidade de 81,6%, sendo aparentemente superior ao PSA em alguns pacientes.

Os clones selecionados combinados 1+6 e 1+8 apresentaram uma resposta mais equilibrada entre a sensibilidade e a especificidade do que as outras combinações (1+4 e 8+10), demonstrando maior potencial para aplicação em diagnóstico. Santamaria *et al.* (2001) sugere que uma combinação de vários epítomos doença-específicos gerados por *Phage Display* pode compor um ensaio diagnóstico multicomponente potencial para a detecção do HPV em lesões cervicais pré-cancerosas, pois vários ensaios ELISA com fagos miméticos de HPV com soro de pacientes com câncer cervical foram realizados, e observou-se reação positiva de 44% de pacientes com pelo menos 1 clone, enquanto que 8% das pacientes do grupo controle apresentaram reação a pelo menos 1 clone.

A sensibilidade de um teste pode variar em diferentes estágios da doença. Diagnósticos com alta sensibilidade podem ser mais úteis na exclusão de uma hipótese do que na confirmação, pois um teste muito sensível se torna menos específico. (www.medicina.ufba.br/imuno/roteiros_imuno/Introd%20Imunodiagnostico.pdf -).

Através desse estudo, foi possível demonstrar que os peptídeos recombinantes selecionados apresentaram alta reatividade, sensibilidade e acurácia quando testados em painéis de antígenos contra soro de pacientes. Esses peptídeos possuem grande potencial para utilização como biomarcadores no diagnóstico do câncer de próstata, embora ainda sejam necessários testes com maior número de pacientes.

5. CONCLUSÃO

A utilização da metodologia *Phage Display* contra imunoglobulinas presentes em tecidos tumorais de CaP para a seleção de epítomos imunorreativos foi eficiente. A combinação entre os clones 1+6 e 1+8 demonstrou sensibilidade de 90% para pacientes com CaP, 80% e 100% de especificidade em soros de pacientes com HPB e controles, respectivamente. Esses resultados sugerem que tais peptídeos possuem grande potencial para a utilização em imunoenaios para diagnóstico de CaP. No entanto, são necessários mais estudos nesse sentido.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. *Imunologia celular e molecular*. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 540, 2005.

BARBAS, C. F.; BURTON, D. R.; SCOTT, J. K.; SILVERMAN, G. J. *Phage Display. A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p.8.4-8.7, 2001.

BOSTWICK, D. G. Prostatic intraepithelial neoplasia. In *Textbook of prostate cancer: Pathology, Diagnosis and Treatment*, Eds AV Kaisary, GP, p. 35-50, 1999.

BOYLE, P.; SEVERI, G.; GILLES, G. G. The epidemiology of prostate cancer, in Localized Prostate Cancer. *The Urological Clinics of North America*, v 30, p 209-217, may, 2003.

BRADFORD, T. J.; WANG, X.; CHINNAIYAN, A. M. Cancer immunomics: Using autoantibody signatures in the early detection of prostate cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, v. 24, p. 237-242, 2006.

BRUNINI, R.; TORLONI, H.; HENSON, D. E.; GLOTIEB, S. L. D.; SOUZA, J. M. P. *Câncer no Brasil*. Dados histopatológicos 1976-1980. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 198 p., 1992.

BUSSEMAKERS, M. J.; BOKHOVEN, A.; VAN VERHAEGH, G. W.; SMITH, F. P.; KARRTHAUS, H. F.; SCHALKEN, J. A.; DEBRUYNE, F. M.; RU, N.; ISAACS, W. B. A new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Research*, v. 59, p. 5975-5979. 1999.

CATALONA, W. J. Prostate cancer screening. *International British Journal Of Urology*, v. 94, n. 7, p. 964-966, 2004.

CENTRO DE TERAPIAS. Disponível em: <<http://www.centrodeterapias.com.br>>. Acesso em: 20 junho 2007.

COFFEY, D. S. Prostate cancer an overview of an increasing dilemma. *Cancer*, v. 71, p. 880-886, 1993.

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.

COTRAN, R.; ROBBINS, S.; KUMAR, V. *Robbins Pathologic Basis of Disease*, 5th edition, 1994. W.B Saunders Company.

CRAWFORD, L. V.; PIM, D. C.; BULBROOK, R. D. Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer. *Int J Cancer*, v. 30, n. 4, p. 403-408, 1982.

CUSSENOT, O.; VALERI, A. Heterogeneity in genetic susceptibility to prostate cancer. *Europ Journ of Inter Medi*, 2001, v. 12, p. 11-16.

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.

ERHART, E. A. *Elementos de Anatomia humana*. 8 ed. São Paulo: Atheneu, 1992, p.272.

FACULDADE DE MEDICINA DA UFBA. *Introdução ao Imunodiagnóstico*. Disponível: <www.medicina.ufba.br/imuno/roteiros_imuno/Introd%20Imunodiagnostico.pdf> Acesso em: 28 de jun. de 2007.

FRESCHI, A. P. P. *Desenvolvimento de aplicações tecnológicas da metodologia de Phage Display no diagnóstico do câncer de próstata*. Uberlândia (Doutorado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, 2007. 117p.

GOSLING, J. A.; HARRIS, P. F.; HUMPHERSON, J. R.; WHITMORE, I.; WILLAN, P. L. T. Pelve e Períneo. In: *Anatomia Humana*. 5^a ed. São Paulo: Manole, 1992, 5.16-5.17.

GRIFFITHS, K.; MORTON, M. S. Aspects of the cell biology of prostate cancer. In: KAISARY, A. V.; MURPHY, G. P.; DENIS, L.; GRIFFITHS, K. (Ed). *Textbook of prostate cancer: pathology, diagnosis and treatment*. Londres: Martin Dunitz, 1999, p. 51-74.

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.

INVITROGEN *Dynabeads*® *Protein* *G*. Disponível:
<[http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/100.03D04D_Dynabeads_Protein_G_\(rev04\).pdf](http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/100.03D04D_Dynabeads_Protein_G_(rev04).pdf)>. Acesso em 20 de jun. de 2007.

ISAACS, J. T. Molecular makers for prostate cancer metastasis: developing diagnostic methods for predicting the aggressiveness of prostate cancer. *American Journ of Pathol.* 1997, v. 150, p. 1511-1521.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Câncer de Próstata. Disponível em: <<http://www.inca.org.br/cancer/tipos/próstata>>. Acesso em: 20 jun. 2007.

JARMULOWICZ, M. R. The role of pathology in biopsy, diagnosis and management of prostate cancer. In *Textbook of prostate cancer: Pathology, Diagnosis and Treatment*, 1999. p. 16-33. Eds AV Kaisary, GP Murphy, Denis L ; K Griffiths. London: Martin Dunitz Ltd.

KRETZER, J. W.; LEHMANN, R.; SCHMELCHER, M.; BANZ, M.; KIM, K. P.; KORN, C.; LOESSNER, M. J. Use of high-affinity cell wall-binding domains of bacteriophage endolysins for immobilization and separation of bacterial cells. *Applied and Environmental Microbiology*, n. 6, p. 1992-2000, 2007.

JIA, W. D.; SUN, H. C.; ZHANG, J. B. A novel peptide that selectively binds highly metastatic hepatocellular carcinoma cell surface is related to invasion and metastasis. *Cancer Lett* 2006.

KIM, Y. G.; LEE, C. S.; CHUNG, W. J.; KIM, E. M.; SHIN, D. S.; RHIM, J. H.; LEE, Y. S.; KIM, B. G.; CHUNG, J. Screening of lps-specific peptides from a *Phage Display* library using epoxy beads. *Biochem Biophys Res Commun*, n. 7, p. 329-312, 2005.

KRUMHOLTZ, J. S.; CARVALHAL, G. F.; RAMOS, C. G.; SMITH, D. S.; THORSON, P.; YAN, Y.; HUMPHREY, P. A.; ROEHL, K. A.; CATALONA, W. J. Prostate specific antigen cutoff of 2.6 ng/ml for prostate cancer screening is associated with favorable pathologic tumor features." *Urology*, v 60, n 3, p 469-474, 2002.

LEINONEN, J.; WU, P.; KOIVUNEN, E.; NARVANEN, A.; STENMAN, U.H. Development of novel peptide ligands modulating the enzyme activity of prostate-specific antigen. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, v. 233: p. 59-64, 2000.

MEARES-JUNIOR, E. M. Prostatitis and related disorders. In: WALSH, P. C.; RETIK, A. B.; STAMEY, T. A.; VAUGHAN, E. D. *Campbell's Urology*. v.1, p. 807-822. W. B. Saunders Company: 6 ed. Philadelphia. 1992.

MINTZ, P. J.; KIM, J.; DO, K. A.; WANG, X.; ZINNER, R. G.; CRISTOFANILLI, M.; ARAP, M. A.; HONG, W. K.; TRONCOSO, P.; LOGOTHETIS, C. J.; PASQUALINI, R.; ARAP, W. Fingerprinting the circulating repertoire of antibodies from cancer patients. *Nat Biotechnol*, v. 21, n.1, p. 57-63, 2003.

MCGUIREA, M. J.; KAUSAR, N. S.; CHANGA, Y. C.; BROWNAB, K. C. Novel ligands for cancer diagnosis: selection of peptide ligands for identification and isolation of b-cell lymphomas. *Journal of Immunological Methods*, v. 34, n. 4, p. 443-452, 2006.

PAVONI, E.; PUCCI, A.; VACCARO, P.; MONTERIU, G.; CERATTI, A. D. P.; LUGINI, A.; VIRDIS, R. A.; CORTESI, E.; DE GAETANO, A.; PANUNZI, S.; FELICI, F.; MINENKOVA, O. A study of the humoral immune response of breast cancer patients to a panel of human tumor antigens identified by *Phage Display*. *Cancer Detection and Prevention*, n. 30, p. 248-256, 2006.

POPKOV, M.; RADER, C.; BARBAS, C. F. Isolation of human prostate cancer cell reactive antibodies using *Phage Display* technology. *Journal of Immunological Methods*, n. 291, p.137-151, 2004.

PORTEFAIX, J. M.; FANUTTI, C.; GRANIER, C.; CRAPEZ, E.; PERHAM, R.; GRENIER, J.; PAU, B.; DEL RIO, M. Detection of anti-p53 antibodies by elisa using p53 synthetic or phage-displayed peptides. *Journal of Immunological Methods*, v. 34, n. 4, p. 443-452, 2006.

ROHR, H. P.; BARTSCH, G. H. Benign prostatic hyperplasia: a stromal disease? new perspectives by quantitative morphology. *Urol.* 1980, v. 16, p. 625-633.

RUIJTER, E.; VAN DE KAA, C.; MILLER, G., RUITTER, D.; DEBRUYNE, F.; SCHALKEN, J. Molecular genetics and epidemiology of prostate carcinoma. *Endoc Rev*, 1999, v.20, p. 22-45.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual* (2nd ed.). Vol 1, 2 e 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

SCHEURLE, D.; DEYOUNG, M. P.; BINNINGER, D. M.; PAGE, H.; JAHANZEB, M.; NARAYANAN, R. Cancer gene discovery using digital differential display. *Cancer Res.*, v. 60, n. 15, p. 4037-4043, 2000.

SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, v. 228, p. 1315-1317, 1985.

SMITH, D. R. *Urologia Geral*. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979, p. 505.

SROUGI, M.; CURY, J. Hiperplasia benigna da próstata. In.: SCHIR, N.; SROUGI, M. *Nefrologia, Urol Clín*. São Paulo: Savier, 1998, cap. 6, p. 501-506.

SROUGI, M. Câncer de próstata. In: SCHOR, N.; SROUGI, M. *Nefrologia, Urol, Clin*. p. 510, Ed. Sarvier: São Paulo 1998.

STAMEY, T. A.; McNEAL, J. E. Adenocarcinoma of the prostate. In: WALSH, P. C.; RETIK, A. B.; STAMEY, T. A.; VAUGHAN, E. D. *Campbell's urology*. 6. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1992, v. 2, p. 1159-1221.

TAM, E. M. Autoantibodies as reporters identifying aberrant cellular mechanisms in tumorigenesis. *J Clin Invest*, v. 108, n. 10, p. 1411-1415, 2001.

WALSH, P. C.; WORTHINGTON, J. F. *Doenças da próstata: um guia para os homens e para as mulheres que os amam*. P. 420. Martins Fontes: 1ª ed. São Paulo. 1998.

XIAO, Y.; ZHOU, Y.; WANG, J.; YU, M.; WANG, G.; JIN, J.; XIAO, J. Selection and identification of human gonadotropin-releasing hormone promoter binding peptides by *Phage Display-CEMSA*. *J. Mol. Recognit*, n. 20, p. 51-7, 2007.

XIAOJU, W.; JIANJUN, Y.; ARUN, S.; SOORYANARAYANA, V.; RONGLAI, S.; DONALD, G.; ROHIT, M.; JAMES, E. M.; KENNETH, J. P.; MARTIN, G. S.; PHILIP, W. K.; MARK, A. R.; JOHN, T. W.; DEBASHIS, G.; ARUL, M. C. Autoantibody signatures in prostate cancer. *The New England Journal of Medicine*, n. 353, p. 1224-1335, 2005.

YAMABHAI, M. *Sut Workshop on Phage Display Technology*. Disponível: <<http://www.sut.ac.th/iat/biotech/PhDworkshop/index.htm>> Acesso em: 20 jun. de 2007.

ZIMERING, M. B.; THAKKER-VARIA, S. Increased fibroblast growth factor-like autoantibodies in serum from a subset of patients with cancer-associated hypercalcemia. *Life Sciences*, v. 71, p. 2939-2959, 2002.

ANEXO I
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Termo de Consentimento

O Laboratório de Genética Molecular dirigido pelo Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho juntamente com o Serviço de Urologia, do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, estão realizando um estudo genético relacionado ao Câncer de Próstata.

O projeto consiste no estudo da Biologia Molecular do Câncer de Próstata.

Para realização dos exames laboratoriais será necessária a coleta de 10 ml de sangue periférico, e biópsias de tecidos normais e tumorais da próstata. Cabe ressaltar, que todo material utilizado será estéril e descartável, e no caso das biópsias, serão realizadas juntamente com os procedimentos rotineiros do centro cirúrgico do Hospital de Clínicas, sem qualquer desconforto adicional ao paciente.

O material coletado será enviado ao laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia, onde serão realizados os exames de RNA e DNA.

É direito do paciente pedir esclarecimentos a respeito da finalidade da pesquisa, destino do material coletado e resultados dos exames realizados.

Espera-se que, com este estudo seja possível detectar em que estágio de desenvolvimento se encontra a doença no paciente, bem como definir os possíveis biomarcadores a serem utilizados na detecção precoce, auxiliando o tratamento.

Almeja-se com isso, estabelecer um programa de tratamento precoce e integrado do paciente, a fim de prevenir o desenvolvimento da doença.

Os pacientes e contatos familiares que concordarem em participar da pesquisa poderão desistir de fazê-lo a qualquer momento, sem que haja nenhum prejuízo próprio.

Pelos presentes termos apresentados por este documento, Eu,


_____ ,
concordo em colaborar com a pesquisa, declarando estar ciente dos riscos, benefícios e direitos.

Assinatura

Testemunhas

ANEXO II

SISTEMA DE GRADAÇÃO HISTOLÓGICO DE GLEASON

GLÂNDULAS		MARGENS	Padrão Glandular	Distribuição
 <p style="text-align: center;">Padrões Anatomopatológicos Adenocarcinoma da Próstata</p>	1	Bem definida	Simples Separadas Redondas	Pacote fechado
	2	Menos definida	Simples - Separadas Redondas Mais Variadas	Espaçamento médio de um diâmetro glandular
	3	Irregular Infiltrada	Simples, separadas, mais irregular. Massas epiteliais redondas cribiformes ou papilar	Espaçamento médio de mais de um diâmetro glandular. Raramente em pacotes. Massas arredondadas c/ contornos pouco definidos
	4	Irregular Infiltrada	Massas glandulares fundidas do tipo hipernefróide	Massas epiteliais anaplásicas irregulares
	5	Mal definida	Padrão quase ausente Poucas glândulas pequenas Poucos e pequenos lúmens envolvidos por massa epitelial sólida às vezes com necrose central	Massas irregulares ou cordões com contornos pouco definidos

2 a 4 = Diferenciados 5 a 7 = Moderadamente Diferenciado 8 a 10 = Indiferenciados

* Como os adenocarcinomas da próstata apresentam mais de um padrão histológico, o diagnóstico final na escala Gleason é dado pela soma dos graus do padrão primário (predominante) e do padrão secundário (segunda menor área representada) (Stamey; McNeal 1992; Isaacs, 1997; Srougi, 1998).

ANEXO III:

ESTADIAMENTO DOS ADENOCARCINOMAS DA PRÓSTATA, CLASSIFICAÇÃO DE WHITMORE-JEWETT E TNM 1992 (apud Stamey; McNeal 1992; Srougi, 1998)

WHITMORE-JEWETT	TNM 1992
	T- Tumor primário N- Linfonodos M- Metástases (proposto pela União Internacional contra o Câncer)
A Tumor não palpável no toque retal	pTx Tumor não avaliado
A1 Tumor não palpável ocupando ≤ 5 % da próstata	pTo Sem evidência de tumor pT1 Tumor incidental impalpável e invisível por técnicas de obtenção de imagens
A2 Tumor não palpável ocupando > 5 % da próstata	pT1a Tumor incidental ocupando ≤ 5 % do tecido ressecado pT1b Tumor incidental ocupando > 5 % do tecido ressecado pT1c Tumor não palpável ou visível por imagem, diagnosticado por biópsia com agulha em um ou ambos os lobos, em pacientes com PSA sanguíneo elevado
B1 Nódulo ≤ 1,5 cm em um lobo prostático	pT2 Tumor limitado à glândula pT2a Até metade de um lobo ou menos pT2b Até mais da metade de um lobo porém não os dois lobos
B2 Nódulo > 1,5 cm e/ou ocupando os dois lobos da próstata	pT2c Comprometimento dos dois lobos pT3 Tumor estende além da cápsula prostática pT3a Extensão extra capsular unilateral pT3b Extensão extra capsular bilateral pT3c Tumor invade vesícula seminal
C1 Extensão peri prostática mínima (sulcos)	pT4 Tumor fixo ou invadindo outras estruturas pélvicas adjacentes exceto as vesículas seminais
C2 Invasão da base das vesículas seminais com ou sem invasão dos sulcos	pT4a Tumor invadindo o colo vesical e/ou o esfíncter externo e/ou o reto
C3 Invasão da base das vesículas seminais com ou sem a invasão de outros órgãos adjacentes	pT4b Tumor invadindo o músculo elevador do ânus e/ou fixo à parede pélvica
D1 Metástases em linfonodos pélvicos	pNx Linfonodos regionais não avaliados pNo Sem metástases ganglionares pN1 Um linfonodo envolvido ≤ 2 cm
Do Metástases não identificadas	pN2 Um linfonodo >2 ≤5 e/ou múltiplos ≤5
D2 Metástases à distância	pN3 Linfonodos envolvidos > 5 cm pMx Metástases não avaliadas pMo Sem metástases à distância
D3 Resistente ao tratamento hormonal	pM1 Metástases presentes pM1a Linfonodo(s) não regional(is) pM1b Osso(s) pM1c Outras localizações

ANEXO IV

Reagentes para realização de gel SDS-PAGE (16%):

Gel de separação:	Tris-HCl 0,375M pH 8,8 SDS 0,1% EDTA 2mM Acrilamida/bis (29/1%) TEMED 0,125% Persulfato de Amônio 0,125%
Gel de empilhamento:	Tris-HCl 0,125M pH 6,8 SDS 0,1% EDTA 2mM Acrilamida/bis (29/1%) TEMED 0,125% Persulfato de Amônio 0,125% H ₂ O
Tampão Eletrodo pH 8,3 (4X):	Tris-HCl 0,1M EDTA 7,8M Glicina 0,77M SDS 3% H ₂ O
Tampão da amostra:	Tris-HCl 0,1M pH 6,8 SDS 4% Glicerol 20% Azul de bromofenol 0,2% H ₂ O

Reagentes/concentrações utilizados nos ciclos de seleção (*Biopanning*):

Meio LB (Por litro)	10g Bacto-Tryptona, 5g Extrato de Levedura, 25 g NaCl.
Meio LB Sólido	Meio LB + 15g/l de Agar
IPTG / Xgal	1,25g IPTG + 1g Xgal +25mL Dimetil Formamida.
Agarose Top (Por litro)	10g Bacto-Tryptona, 5g extrato de levedura, 25g NaCl, 1g MgCl ₂ ·6H ₂ O, 7g Agarose.
Tetraciclina (estoque)	20mg/mL Álcool Etilico
PEG/NaCl: 20% (p/v)	Polietilenoglicol, 2,5M NaCl.
Tampão Iodeto	10mM Tris-HCl (pH 8,0), 1mM EDTA, 4M NaI.