

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

FACULDADE DE MEDICINA

PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

***SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS MIMÉTICOS A
PROTEÍNAS TUMORAIS NO ESTADIAMENTO CLÍNICO-PATOLÓGICO
DO CÂNCER DE PRÓSTATA***

Patrícia Tieme Fujimura

Uberlândia – MG

2010

Patrícia Tieme Fujimura

***SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS MIMÉTICOS A
PROTEÍNAS TUMORAIS NO ESTADIAMENTO CLÍNICO-PATOLÓGICO
DO CÂNCER DE PRÓSTATA***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde (Área Genética Molecular).

Orientador: Carlos Ueira Vieira

Co-orientador: Luiz Ricardo Goulart

Uberlândia – MG

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

FACULDADE DE MEDICINA

PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

***SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS MIMÉTICOS A
PROTEÍNAS TUMORAIS NO ESTADIAMENTO CLÍNICO-PATOLÓGICO
DO CÂNCER DE PRÓSTATA***

Patrícia Tieme Fujimura

Comissão Examinadora:

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira

Examinadores Titulares: Dr. Guilherme Lino Rocha de Souza (UFG)

Dra. Cristiana Soares de Sousa (FUCAMP)

Dra. Maria Aparecida de Souza (UFU)

Data da Defesa: 23/02/2010

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGCS para o formato da dissertação foram contempladas.

Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira

Uberlândia, 23/02

Uberlândia – MG

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

- F961s Fujimura, Patrícia Tieme, 1981-
Seleção e caracterização de peptídeos miméticos a proteínas tumorais no estadiamento clínico-patológico do câncer de próstata [manuscrito] / Patrícia Tieme Fujimura. - 2010.
95 f. : il.
- Orientador: Carlos Ueira Vieira.
Co-orientador: Luiz Ricardo Goulart.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.
- Inclui bibliografia.
1. Próstata - Câncer - Teses. 2. Peptídios - Teses. I. Vieira, Carlos Ueira. II. Goulart Filho, Luiz Ricardo, 1962- . III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 616.65-006.6

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação

DEDICATÓRIA

*Gostaria de dedicar, em especial, meus
esforços e a minha a pesquisa:*

*aos meus pais e ao meu irmão, que sempre
me apoiaram e tiveram presentes no meu
crescimento pessoal, me ensinando a ser um
bom profissional; e a cima de tudo a ser
humano, paciente e sábio*

*ao Carlos Henrique Baziza, que sempre
estive do meu lado dando apoio,
principalmente, nos momentos difíceis;*

*aos pacientes, que doam parte de si para a
realização dessa pesquisa e, finalmente,*

às pessoas que acreditaram em mim,

*O sorriso é o caminho
para a
porta da felicidade*

Morisada Fujimura

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Carlos Ueira, pela oportunidade, confiança, e, principalmente, pelo exemplo de dedicação e de vontade de fazer pesquisa;

Ao meu co-orientador Luiz Ricardo Goulart, que me apoiou e me disponibilizou o laboratório para a realização desta pesquisa

Às minhas amigas, Carol Reis, Ana Paula Carneiro, Carol Siqueroli, Juliana Franco, Fabys e Thaíse pelo carinho e pela ajuda nos momentos difíceis da pesquisa;

Yara Cristina P. Maia, pela bela amizade e por ser sempre paciente, graciosa e delicada comigo;

Ao Xiton, Rafael, Galber e Rone Cardoso, pela amizade e carinho;

Ao Fausto Capparelli, pela amizade sincera e pela força em momentos de fraqueza;

A Ângela Sena pela amizade, carinho, mas principalmente, por ter doado parte de seu tempo para a conclusão desse trabalho;

A todos os meus amigos de laboratório que me proporcionaram momentos de alegria e distração;

Ao CNPQ que financiou esta pesquisa;

A UFU por oferecer um ensino e pesquisa de qualidade;

RESUMO

O câncer de próstata (CaP) tem sido considerado a segunda causa de óbitos por tumor em homens, sendo superado apenas pelo câncer de pulmão. A investigação clínica do CaP baseia-se no exame físico, através do toque retal, na ultrassonografia transretal e no exame sorológico do PSA. No entanto, devido a altas taxas de falso-positivo associado à hiperplasia benigna da próstata (HPB), têm estimulado muitos pesquisadores a identificar novos antígenos ou genes específicos do câncer de próstata, a estudar o reconhecimento molecular em câncer, além de buscar ferramentas inovadoras de diagnósticos e prognósticos, que ao serem associados aos novos biomarcadores, promovem o desenvolvimento de plataforma de detecção mais rápido que auxilie a conduta clínica a terapias específicas. Neste trabalho, foram isolados peptídeos reconhecidos por anticorpos purificados a partir do soro de pacientes com câncer de próstata por meio da metodologia de *Phage Display*, e padronizou-se o acoplamento dos fagos às microesferas para o desenvolvimento de uma plataforma de diagnóstico. Para seleção dos peptídeos foi realizado um *biopanning* subtrativo, seguida de uma seleção positiva utilizando uma biblioteca de peptídeos Ph.D.-C7C expressa na superfície do fago filamentosso M13. O DNA dos clones selecionados foi seqüenciado, traduzido, e os diversos clones foram submetidos aos ensaios de ELISA e bioinformática. A análise das seqüências de clones selecionados apresentou um motivo comum FPWL os quais relacionavam com o estadiamento do tumor pT1 e pT2, e especificamente com câncer associado à neoplasia intra-epitelial prostática. Um clone com a seqüência diferente reconheceu as imunoglobulinas presente no estadiamento T4 nenhum para pT3. Em relação à bioinformática, o consenso gerado pelos peptídeos mais reativos alinhou-se as proteínas do envelope do capsídeo viral do endovírus humano (HERV), reforçando as hipóteses que infecção viral associado à inflamação pode estar relacionada aos processos de tumorigênese. Já para o procedimento de acoplamento dos clones nas microesferas utilizou-se diferentes tampões em diversos pHs, e verificou que a conjugação foi eficiente, exceto para o tampão Fosfato de sódio 1,2M pH 10,2. Dessa forma, explorar a resposta humoral diferencial (autoanticorpos) do câncer associado à metodologia de *Phage Display*, pode nos fornecer potenciais alvos de tumorais, que podem ser utilizados em diagnóstico, prognóstico e terapêutica da doença. Além disso, o desenvolvimento de uma de metodologias novas de diagnóstico pode fornecer resultados mais rápidos e com menor custo.

Palavras chaves: *Phage Display*, marcadores tumorais, etiologia do câncer, microesferas e plataformas de diagnósticos.

ABSTRACT

Prostate cancer is the second cause of deaths by tumor in men, surpassed only to lung cancer. Currently, PSA (prostate-specific antigen) is clinical test of choice for PCa detection and treatment. However, the limitations of the PSA test such as large number of false positive results and unnecessary biopsies indicate the need for other means of screening for this neoplasm. Identification of new genes or antigens specific for prostate cancer, study of molecular recognition, and innovation in cancer diagnostics, can provide the development of new biomarkers, specific therapies, as well as provide faster diagnostic to assist doctors. This work was performed a screening method based on *phage* display to select peptides recognized by the repertoire of circulating tumor-associated antibodies and standardized the coupling of the *phages* to microspheres for the development of a diagnostic platform to obtain or biomarkers in the discovery of new etiologies for the tumor. We isolated peptides recognized by purified antibodies from serum of prostate cancer patients. For selection of peptides was performed a subtractive biopanning, followed by positive selection using a library of peptides Ph.D.-C7C expressed on the surface of filamentous *phage* M13. The DNA from selected *phages* was sequenced, translated, and the various clones were subjected to ELISA assays and bioinformatics. Analysis of the sequences of selected clones had a common reason FPWL, which were linked with tumor staging pT1 and pT2, and specifically to cancer associated with prostatic intraepithelial neoplasia. One clone with a different sequence recognized the tumor staging pT4 and none for pT3. Procedure for the coupling of the *phages* used in the microspheres is different in different pH buffers and found that the combination was effective, except for the sodium phosphate buffer 1.2 M pH 10.2. Exploiting the differential humoral response to cancer through may identify molecular markers and targets for diagnostic and therapeutic intervention. Furthermore, the development of a new diagnostic methods can provide results faster and with less cost.

Key words: *Phage* Display, tumor markers, cancer etiology, immunomagnetic beads, diagnostic platforms.

LISTA DE ABREVIACÕES

AIP- Atrofia inflamatória proliferativa

BLASTp – (Basic Local Alignment Search Tool), programa de busca por alinhamento.

BSA- (Bovine Serum Albumin), Soro Albumina Bovina

CEP/UFU- Cômite de Ética e Pesquisa da UFU

cDNA- DNA complementar

CaP- câncer de próstata

DAB- 3-3' – (diaminobenzidine tetrahydrochloride), tetrahidrocloroeto diaminobenzidina

DNA- Ácido desoribonucléico

DNA2PRO- Programa do RELIC destinado a tradução do DNA

ELISA- (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), Imunoensaio enzimático

EUA- Estados Unidos da América

HC- Hospital das Clínicas

HE- Hematoxilina e eosina

HPB- Hiperplasia benigna da próstata

HRP- (Horse radish peroxidase), marcação com peroxidase

INCA- Instituto Nacional do Câncer

IPTG- (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside)

LB- Meio de cultura Luria-Bertani

MOTIF2- Programa disponível no RELIC para busca de motivos

NEG- Negativo

NIP- neoplasia intra-epitelial prostática

OD- Densidade ótica

OPD- Orto-fenilenodiamina

pIII- Proteína três do capsídeo do fago

pVI- Proteína seis do capsídeo do fago

pVII- Proteína sete do capsídeo do fago

pVIII- Proteína oito do capsídeo do fago

pIX – Proteína nove do capsídeo do fago

PBS- Tampão fosfato salino

pH- Potencial Hidrogeniônico

Ph.D.- C7C- Biblioteca comercial de *Phage* Display de 7 aminoácidos conformacionais

RELIC- (Receptor Ligands Contacts), site com programas disponíveis on-line para análise de seqüências peptídicas

SEL- selvagem

T.A- Temperatura ambiente

TNM- Estadiamento: Tamanho do tumor (T); acometimento de nódulos (N); metástase à distância (M)

TBS- Tampão Tris-NaCl

TBST Tampão Tris-NaCl com tween 20

UFU- Universidade Federal de Uberlândia

UNIPROT- (Universal Protein Resource)

XGal- 5-Bromo-4-cloro-3indolil- α -D-galactosídeo

LISTA DE NOTAÇÕES

°C- Graus Celsius

dL- decilitro

g- gramas

M- Molar

mcg- micrograma

mg- miligrama

mim- minuto

mL- mililitro

mM- milimolar

mUI- miliunidades

N- normal

ng- nanogramas

pmol- picomol

rpm- rotações por minuto

μL- microlitro

μm- micrometro

Lista de Aminácidos:

Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cis	C
Ácido glutâmico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Fen	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fago filamentoso.....	8
Figura 2. Ataque nucleofílico de amino primário ou secundário a microesfera magnética.....	11
Figura 3. Estratégia para identificação de epítomos tumorais antigênicos usando biblioteca de peptídeo randômico por <i>Phage</i> Display.....	20
Figura 4. Ensaio de beads-ELISA para o acoplamento de IgGs.....	31
Figura 5. Ensaio de beads-ELISA para o teste de enriquecimento.....	33
Figura 6. Painel de pré-validação dos clones reconhecidos por IgG de pacientes com CaP em diferentes estadiamento.....	36
Figura 7. Análise do primeiro grupo de clones selecionados especificamente pelos anticorpos dos diferentes tipos de pool de soro de pT1, pT2, pT3, pT4 de pacientes.....	37
Figura 8. Análise de clones selecionados especificamente pelos anticorpos dos diferentes tipos de pool de soro de pT1, pT2, pT3, pT4 de pacientes.....	38
Figura 9. Análise de clones selecionados especificamente pelos anticorpos dos diferentes tipos de pool de soro de pT1, pT2, pT3, pT4 de pacientes.....	39
Figura 10. Ensaio de <i>Beads</i> -ELISA, com fagos e BSA acoplado nas microesferas.....	44
Figura 11. Teste de bloqueio da pIII.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Caracterização clínica das amostras utilizadas.....	17
Tabela II. Relação do tipo e da quantidade dos tampões utilizados versus o teste de acoplamento do fago selecionado (F1 - CaP).....	28
Tabela III. Seleção dos fagos com peptídeos ligantes aos anticorpos policlonais IgG anti-CaP. Título obtido (pfu) no processo de seleção dos fagos por imunoafinidade.....	32
Tabela IV. Frequência dos clones de fagos seqüenciados em diferentes estadiamentos.....	34
Tabela V. Alinhamento dos peptídeos selecionados pelo Programa <i>clustalW</i>	40
Tabela VI. Alinhamento das seqüências consenso dos peptídeos selecionados, mostrando as similaridades encontradas com as proteínas anotadas no banco de dados do <i>GeneBank</i> pelo BLAST , com os números de acesso no <i>Swissprot</i> , e sua regiões de prováveis epítomos antigênicos lineares feita de acordo com o programa <i>Bepipred</i>	41
Tabela VII. Frequência de pacientes positivos para o teste de ELISA sobre o valor total de pacientes diagnosticado nos três clones.....	42
Tabela VIII. Comparação de dados estatísticos epidemiológicos entre o CaP geral e CaP associado ao NIP.....	43
Tabela IX. Quantificação dos beads em Câmara de Neubauer.....	44

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Epidemiologia e etiologia do câncer de próstata.....	2
1.2 Aspectos Imunológicos.....	3
1.3 Aspectos moleculares.....	4
1.4 Detecção do câncer e <i>Phage</i> display.....	6
1.5 Plataforma tecnológica.....	9
2 OBJETIVO.....	13
2.1 Objetivos Gerais.....	14
2.2 Objetivos Específicos.....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Obtenção das amostras e seleção das amostras.....	16
3.2 Acoplamento das IgGs nas microesferas proteína G.....	18
3.3 Seleção dos peptídeos recombinantes.....	19
3.3.1 <i>Biopanning</i> (Seleção de Fagos).....	19
3.3.2 Titulações.....	21
3.3.3 Análise de enriquecimento do <i>panning</i> : Teste <i>Bead</i> -ELISA.....	22
3.3.4 Extração de DNA de Fagos.....	22
3.3.5 Sequenciamento.....	23
3.3.6 Pré-screening <i>Phage</i> -ELISA.....	24
3.3.7 <i>Screening</i> dos fagos escolhidos com soros de pT1, pT2, pT3, pT4.....	24

3.3.8	Análise de dados pela Bioinformática.....	25
3.3.9	<i>Screening</i> dos fagos escolhidos com soros individuais.....	26
3.4	Desenvolvimento de uma plataforma de diagnóstico.....	27
3.4.1	Avaliação dos diferentes tampões para o teste de acoplamento.....	27
3.4.2	Teste de <i>Bead</i> -ELISA : Certificação do acoplamento.....	28
3.4.3	Teste de Bloqueio da Região da pIII.....	29
3.5	Análise estatística.....	29
4	RESULTADOS.....	30
4.1	Acoplamento das IgGs nas microesferas proteína G.....	31
4.2	Seleção de peptídeos recombinantes.....	31
4.2.1	<i>Biopanning</i> e Titulações.....	31
4.2.2	Análise do Enriquecimento: Teste <i>Bead</i> -ELISA.....	33
4.2.3	Extração de DNA e Seqüenciamento dos Clones de Fagos.....	33
4.2.4	Pré-Validação de Mimetopos por <i>Phage</i> -ELISA.....	35
4.2.5	<i>Screening</i> dos Fagos Seleccionados com Soros de pT1, pT2, pT3, pT4.....	37
4.2.6	Bioinformática.....	40
4.2.7	<i>Screening</i> dos fagos escolhidos com soros individuais.....	42
4.3	Padronização da plataforma biotecnológica.....	43
4.3.1	Quantificação dos <i>Beads</i> na Câmara de Neubauer e Teste de <i>Bead</i> -ELISA para a certificação do acoplamento.....	43
4.3.2	Teste de bloqueio da pIII.....	45
5	DISCUSSÃO.....	46

6 CONCLUSÕES.....	54
7 REFERÊNCIAS.....	56
ANEXOS.....	76

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia e etiologia do câncer de próstata

O câncer tem sido considerado um problema de saúde pública tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento. De acordo com os dados da *American Cancer Society* ocorreram mais de 12 milhões de casos novos em todo mundo no ano de 2007, sendo que 5,4 milhões ocorreram em países economicamente desenvolvidos e 6,7 milhões em países emergentes.

Em especial, o câncer de próstata, também conhecido como doença de idosos (BRAWLEY, ANKERST, THOMPSON, 2009), é o tumor não-epitelial mais comumente diagnosticado nos homens americanos (JEMAL, SIEGEL, WARD, et al, 2009). Em 2006, o câncer de próstata representou cerca de 20% dos cânceres não cutâneo detectados em homens europeus, colocando-o no topo da lista dos cânceres diagnosticados (FERLAY, AUTIER, BONIOL, et al, 2007). Estimou-se que, em 2009, 192.280 americanos iriam ser diagnosticados com câncer de próstata, e mais de 27.000 homens iriam morrer dessa doença, tornando-a o segundo causador de morte por câncer em homens (JEMAL, SIEGEL, WARD, et al, 2009). No Brasil, esta doença é a segunda patologia mais comum entre os homens, estimando cerca de 52.350 novos casos para 2010 (INCA, 2010).

Em relação à etiologia do câncer de próstata, esta permanece obscura e seus tumores variam desde a forma indolente, com baixas taxas de evolução, para forma extremamente agressiva, com rápidas taxas de crescimento (GIMBA, BARCINSKI, 2003). Algumas causas multifatoriais, tais como a interação entre fatores genéticos, andrógenos (hormonais), alimentares e ambientais, podem estar relacionadas com o desenvolvimento do tumor. Dentre os fatores de risco que amplamente associam ao CaP estão a idade, etnia, a dieta e o estilo de vida (KLEIN, SILVERMAN, 2008). Além disso, estudos epidemiológicos têm demonstrado aumento de risco ao desenvolvimento do tumor associada às infecções sexualmente transmissíveis, sugerindo que a inflamação pode estar relacionada com etiologia do câncer de próstata, já que células produzem numerosas substâncias oxidantes com potencial de causar dano celular ou genômico na próstata. Estudos mais recentes relatam que, as contribuições sobre conhecimento da malignância de agentes infecciosos, como

bactérias e vírus, tem sido útil na compreensão de como os processos celulares básicos culminam no câncer (DENNIS et al, 2002; HAYES et al, 2000; PAGANO et al, 2004; EISERICH et al, 1998).

1.2 Aspectos Imunológicos

Existem evidências que os diversos tipos de cânceres, como colorretal (COOMBER, WARD, 2001), de testículo e próstata (FOSSA et al, 2004), pulmão (BAZHIN et al, 2004; YAGIHASHI et al, 2005a), mama (MADRID, 2005; YAGIHASHI et al, 2005b; CANELLE et al, 2006), carcinoma hepatocelular (COVINI et al, 1997), melanoma (HOUGHTON et al, 2001) e cânceres ginecológicos (KORNEEVA et al, 2000) têm a capacidade de estimular resposta imune humoral. E a melhor compreensão do significado biológico dessa resposta pode ser benéfica para pacientes com cânceres, já que poderiam ser utilizados nos diagnóstico ou classificação do tumor, no potencial terapêutico ou no uso no tratamento da doença (FORRESTER et al, 2007). Além disso, o estudo da autoimunidade associada ao tumor pode oferecer esclarecimentos não apenas na patogênese de doenças autoimunes em geral, mas talvez até em eventos que direcionam alguns tipos de cânceres (TAN, 2001).

Pesquisas têm mostrado que o sistema imunológico pode ser eliciado por duas vias, sendo a primeira em resposta contra os antígenos associados ao tumor (TAA), e a segunda contra os antígenos específicos ao tumor (TSA) (FINN, 2008). Esses antígenos tumorais, geralmente, são modificações na estrutura ou expressão de proteínas próprias, as quais permitem o reconhecimento de epítomos associados a tumores como estranhos (TAN, 2001).

O reconhecimento imunológico inicia-se quando pequenas quantidades de antígenos tumorais, produzido pelos cânceres, são capturadas e processadas pelas células apresentadoras de antígeno (APCs). Os fragmentos processados do antígeno tumoral ligam-se às fendas de ligação dos peptídeos das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e este complexo de antígeno/MHC são expressos na superfície das APCs. O complexo interage com o receptor de células T auxiliares, permitindo uma resposta imune direcional a uma proteína específica, ao se

multiplicar e diferenciar-se. Além disso, as células T auxiliares antígeno específico têm a capacidade de estimular os linfócitos B a se proliferarem e diferenciarem, pela interação de moléculas co-estimulatórias (CD40 e CD40L) e citocinas. Uma vez ativadas, as células B específicas, podem produzir e liberar autoanticorpos circulantes, os quais podem servir como repórteres para identificar aberrações nos mecanismos celulares durante a tumorigênese (WANG, 2008 e ABBAS, 2005).

A presença de autoanticorpos no soro de pacientes com câncer tem sido relatada em infinidade de trabalhos tais como autoanticorpos contra p53 (CRAWFORD et al, 1982; COOMBER, WARD, 2001), fator de crescimento de fibroblasto (ZIMERING, THAKKER-VARIA 2002), proteínas ribossomais (SCHEURLE, 2000), proteínas *heat shock* (KORNEEVA et al, 2000), α -metilacetil CoA (SREEKUMAR et al, 2004), mucina (VON MENSNDORFF-POUILLY et al 2000), proteína HER2 (DISIS et al, 1997), estas duas últimas envolvidas na inibição da progressão tumoral. Em especial, para câncer de próstata, vários trabalhos têm sido publicados (MINTZ et al, 2003, FOSSA et al, 2004, WANG et al, 2005, BRADFORD et al, 2006, DUNPHY et al, 2006, LARSSON et al, 2006). Em 2006, Bradford *et al.* apresentaram um perfil protéico aparentemente superior ao PSA após a seleção de 22 peptídeos sintéticos imunorreativos contra autoanticorpos do soro de pacientes com câncer de próstata com sensibilidade de 81.6% e especificidade de 88.2%. Assim, a detecção de autoanticorpos no soro de pacientes com CaP pode fornecer uma forma menos invasiva e mais precisa de diagnóstico, além de novas abordagens terapêuticas, como por exemplo, o uso de triagem de autoanticorpos (CASIANO et al, 2006).

1.3 Aspectos moleculares

Estudos têm mostrado que há existência de mais de 100 tipos de cânceres e diversos subtipos, sendo que a maioria deles ou, praticamente todos, compartilham alterações essenciais na fisiologia celular ou nas múltiplas vias que, em conjunto, ditam o crescimento tumoral. Dentre as alterações que ocorrem têm-se a auto-suficiência em sinais de crescimento, insensibilidade aos sinais de inibição de crescimento, evasão a apoptose, potencial ilimitado de replicação, autonomia angiogênica e capacidade para invadir tecidos e produzir metástases (HANAHAAN, WEINBERG, 2000).

O câncer de próstata é originado por aberrações genéticas que inativam genes supressores de tumor e ativam proto-oncogenes (PORKKA, VISAKORPI, 2004). Estas alterações desorganizam a homeostase tissular por aumentar desregradamente à divisão celular ou por diminuir a apoptose, causando o aparecimento dos tumores (GATTAS, 2003). A maioria das mutações é adquirida ao longo do desenvolvimento do câncer (mecanismo da tumorigêneses), no entanto, algumas podem ser herdadas, resultando na predisposição da patologia (PORKKA, VISAKORPI, 2004).

Por muito tempo atribuiu-se a origem do tumor prostático como determinada apenas pela estimulação hormonal da testosterona, porém, atualmente se sabe que o desenvolvimento tumoral é também regido por componentes genéticos e ambientais (NWOSU et al, 2001), sendo em 10% dos casos por transmissão hereditária e os demais por alterações genéticas esporádicas (GATTAS, 2003). Além disso, pesquisas têm sugerido que a atrofia inflamatória da próstata (AIP) e a neoplasia intraepitelial prostática (NIP) de alto grau sejam precursores para muitos carcinomas prostáticos, já que são altamente freqüentes nas próstatas com adenocarcinoma e por apresentarem alterações genéticas em comum. Por essas e outras características, a NIP tem sido relatada como doença precursora do CaP, entretanto, nenhuma evidência convincente tem mostrado ser a AIP um precursor para a NIP de alto grau e/ou carcinogênese (BOSTWICK, 1999; JARMULOWICZ, 1999; DE MARZO et al. 2001).

Muitos esforços têm sido destinados ao melhor entendimento dos complexos mecanismos moleculares envolvidos na ontogênese e progressão do CaP (GIMBA, BARCINSKI, 2003). Além disso, a presença de modificações moleculares e e moléculas alvo interessantes têm sido associadas à progressão do tumor prostático e ao desenvolvimento de resistência a terapia (CAVARRETTA et al, 2005). Os métodos que são usados para caracterizar as aberrações genéticas encontradas nessa doença neoplásica incluem estudos familiares designados a mapear *loci* hereditários, estudos cromossomais para a identificação de anomalias que possam localizar oncogenes ou supressores de tumor e diversos estudos de expressão gênica (LI, NELSON, 2001; KARAN et al, 2003).

Marcadores biológicos têm sido de grande importância para o diagnóstico e tratamento do CaP por mais de 50 anos e a identificação de novos genes e novos produtos envolvidos no processo tumoral tem crescido rapidamente. Novos produtos gênicos têm sido identificados no sangue de pacientes com câncer de próstata por técnicas proteômicas (BOK, SMALL, 2002). Proteínas biomarcadores presente no soro oferecem grande promessa para detecção não invasiva, para a classificação, bem como para o estadiamento do câncer de próstata. Arranjos de anticorpos parecem ser adequados para a descoberta de marcadores sorológicos, pela possibilidade de comparação da abundância relativa de centenas de proteínas (GIMBA, BARCINSKI, 2003).

1.4 Detecção do câncer e Phage display

Atualmente, o PSA (antígeno prostático-específico) é o teste clínico de escolha para a detecção e prognóstico CaP. No entanto, as limitações do PSA, vinculado ao excesso de resultados falso-positivos principalmente relacionados à hiperplasia prostática benigna (HPB), indicam a necessidade de outros meios de rastreio para esta neoplasia (BANEZ et al, 2003; FORD et al, 2005). HPB caracteriza-se por aumento notório do componente acinar prostático em relação aos componentes intersticial e capsular, acarretando, por conseqüência, aumento volumétrico da próstata. Esse aumento benigno ocorre sempre após os 35 anos de idade, sendo responsável por vários sintomas do trato urinário inferior em homens (STAMEY, MCNEIL, 1992; CATALONA et al., 2002; KRUMHOLTZ et al., 2002; CATALONA, 2004). Câncer de próstata e HPB, apesar de conferirem risco e prognósticos bastante diferentes aos pacientes, incidem sobre a mesma faixa etária. A neoplasia prostática, em estágios iniciais, apresenta alterações clínicas e laboratoriais semelhantes à hiperplasia benigna, dificultando o diagnóstico preciso no caso de ambas as doenças coexistirem. Esses fatos dificultam sensivelmente a diferenciação dessas patologias (KRUMHOLTZ et al., 2002; CATALONA, 2004).

Além da dosagem do PSA, compõe ainda o rastreamento das anomalias prostáticas o exame físico da próstata (toque retal), sendo que o diagnóstico final tanto do CaP quanto da HPB são obtidos pelo exame patológico do material da biopsia da próstata.

O estadiamento (TNM- anexo I) é o desfecho mais utilizados em estudos sobre fatores prognósticos clínicos em câncer de próstata. No entanto, o estadiamento clínico, baseado em grande parte no toque retal, possui importantes limitações. Já o estadiamento patológico é realizado a partir da biopsia, sendo que este exame físico é recomendado para todo paciente com toque retal duvidoso, independentemente do valor do PSA, já que 25% dos homens com CaP apresentam níveis de PSA abaixo do suspeito (ARAGÃO, 2003). No entanto, a biopsia é um exame invasivo, com riscos de infecção e extremamente desagradável para o paciente.

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), já que biomarcadores protéicos proporcionaram um grande impacto sobre tratamento clínico de doenças humanas, especialmente câncer (WHITEAKER, 2007).

Peptídeos selecionados 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). Essa metodologia consiste no princípio de que polipeptídeos podem ser expressos na superfície de bacteriófagos filamentosos pela inserção de um segmento de DNA codificante no genoma dos mesmos, de modo que o peptídeo ou proteína expressado fique exposto na superfície da partícula viral fusionado a uma proteína endógena, pIII ou pVIII conforme a Figura 1 (BARBAS et al, 2001).

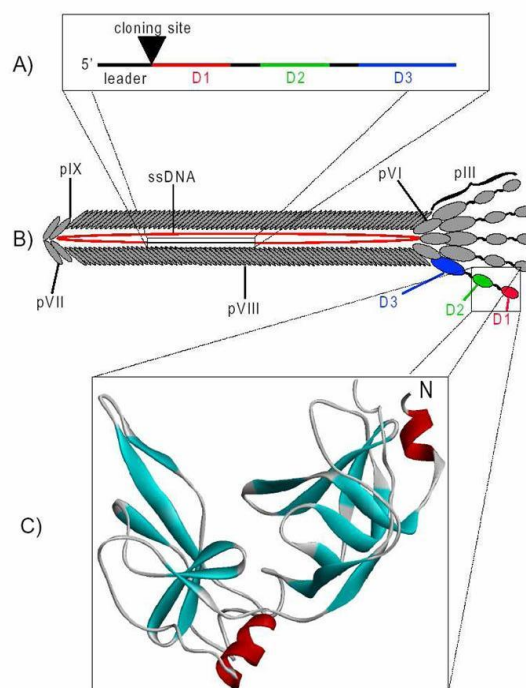


Figura 1. Fago filamentosso. A) Composição do gene III, mostrando o sítio de ligação de clonagem para introdução do gene adicional; B) Partícula viral com as proteínas pIII, pVI, pVII, pVIII e pXI; C) Cristalografia dos domínios D1 e D2 da proteína III (Holliger e Williams, 1999), as alfa-hélices estão coloridas em vermelho e as fitas β em ciano

A biblioteca combinatória de peptídeos, *Phage display*, emergiu como um recurso de triagem para a identificação de peptídeos ligantes em molécula alvo. Essa tecnologia tem sido aplicada em vários estudos tais como interações de proteína ligante; maturação de afinidade de peptídeos ligantes isolados previamente; mapeamento epítipo ligantes em sítios e identificação de especificidade de enzima substrato. Além disso, apresenta grande impacto na imunologia, biologia celular, desenvolvimento de medicamentos e outros fármacos (AZZAZY, HIGHSMITH, 2002; OHKUBO et al 2001; WILLATS, 2002).

Vários trabalhos têm relatado a identificação de peptídeos, por *Phage Display*, que mimetizam biomoléculas específicas em diversos tipos de câncer, como por exemplo, mama (HANSEN et al, 2001a; HANSEN et al, 2001b), 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. As aplicações dos peptídeos expressos em

bacteriófagos em câncer têm sido as mais variadas, dentre elas mapeamento da diversidade tumoral (HANSEN et al, 2001b, DYBWAD, 2003, LIU et al, 2004) a seleção de peptídeos que inibem metástase (HU et al, 2006); peptídeos miméticos de oncogenes (STEPHEN, 1995; MADRID, 2005); receptores vasculares (ZURITA, et al, 2003; ARAP et al, 2002) e peptídeos relacionados a fatores de crescimento (CAMPA et al, 2002; HETIAN et al, 2002).

A tecnologia de *Phage Display* tem sido largamente empregada no estudo do câncer de próstata (ROMANOV et al, 2001, ZURITA et al, 2004, LIU et al, 2004, KELLY et al, 2008, CONRAD et al, 2009). Esses trabalhos têm identificado peptídeos relacionados com marcadores e proteínas prostáticas, como receptor de andrógeno AR (HSU et al, 2003), PSA (WU et al, 2004, FERRIEU-WEISBUCH et al, 2006) calicreína 2 (HEKIM et al, 2006), receptor α da interleucina 11 (ZURITA et al 2004). Dessa forma, através desta metodologia é possível a identificação de proteínas capazes de detectar o câncer anteriormente aos métodos tradicionais, predizer o estadió atual do tumor, além de permitir o desenvolvimento de tratamentos mais eficientes para o câncer por meio de endereçamento vascular dos peptídeos (NILSSON et al, 2000) e de alvos em imunoterapia (POPKOV, 2000).

1.5 Plataforma tecnológica

O desenvolvimento de ferramentas inovadoras de diagnóstico e prognóstico que efetivamente explorem biomarcadores para a gestão dos cânceres humanos é uma necessidade do mundo contemporâneo (CASSIANO, et al, 2006). Várias tecnologias vêm sendo utilizadas na identificação e detecção desses biomarcadores através de autoanticorpos como eletroforese em gel bi-dimensional (CANELLE et al 2006), *microarrays* (PATWA et al, 2009), Ressonância Plasmônica de Superfície –SPR- (AVRAMIS et al, 2009), SEREX (WANG, 2009), biossensores (CONROY et al, 2009), e *Phage Display* (PASSARELLA, 2009).

Melhoria nas técnicas de microtecnologia abriu novos campos na bioquímica analítica e no desenvolvimento de plataformas de detecção. A vantagem de explorar técnicas de microreações é o uso de pequenos volumes de reagente, menor produção

de resíduos tóxicos, aumento do número de análises por unidade de volume, análises mais rápidas e por fim uma boa relação custo-eficácia (HÄRMÄ et al., 2000).

Muitos ensaios e testes de diagnósticos têm utilizado partículas de tamanho submicron ou microesferas (*beads*), em substratos ou suportes como base em reações imunológicas para diagnóstico e pesquisa. Microesferas ou *beads* são partículas de polímeros esféricos de diferentes tamanhos e compostas por diversos materiais tais como poliestireno, sílica e magnéticas, dependendo da utilização. Por apresentarem superfícies ativadas com diversos grupamentos químicos, tornam essas partículas adequadas para a ligação de uma infinidade de substâncias. Depois de ativadas, podem ser preparadas para o acoplamento de ligantes. A adsorção de um ligante é um processo em que vários fatores físico-químicos estão envolvidos. A quantidade e modo no qual o ligante é adsorvido dependem da natureza do mesmo, das características da superfície sólida e das condições da solução tamponante (PEULA-GARCIA et al., 2002).

A vantagem da utilização das microesferas é que, por apresentarem uma vasta gama de tamanhos disponíveis comercialmente, variando de nanopartículas (50 nm) para micropartículas (até 20 μm) podem ser utilizados em investigação de imunologia celular (*beads* menores - 50 nm) e quando conjugados com anticorpos separam alvos (*beads* maiores - 1-5 μm), a fim de melhorar o desempenho dos testes ELISA, reforçando a sensibilidade e diminuindo o tempo de incubação (GUNDERSEN et al., 1992; GEHRING et al., 2004).

Em especial, as microesferas magnéticas têm sido amplamente utilizadas em diagnósticos e pesquisa básica para captura de biomoléculas e células. Tipicamente, exibem propriedades superparamagnéticas em que há magnetização apenas na presença de um campo magnético, sem, contudo, permanecerem magnetizadas quando há a remoção do mesmo, característica única das escalas nanométricas (CAMILO, 2006).

A microesfera magnética de grupamento epóxi é caracterizada como um suporte sólido com ampla variedade de separação e de manipulação biomagnética. A superfície hidrofílica garante excelentes habilidades de dispersão e baixas interações

não-específicas. Por apresentarem um pequeno tamanho ($2,8\ \mu\text{m}$) e uma ampla área de superfície ($2\text{-}5\ \text{m}^2/\text{g}$), tornando-as particularmente adequadas para isolamento de proteínas de uma amostra, para os bioensaios e para a seleção de ligantes de afinidade (INVITROGEN, 2008).

A reação entre o grupamento epóxi e os ligantes de afinidade em geral, como proteínas, ácidos nucleicos e várias pequenas moléculas, tem sido aplicado com sucesso e ocorre pela via de adição nucleofílica de amino primário ou secundário e de grupamento sulfidril no anel do grupamento epóxi (WHEATLEY; SCHMIDT JR, 1999).

Já o acoplamento do bacteriófago M-13 nos *beads* ocorre na região n-terminal da proteína do capsídeo. De acordo com Straus (2007), o bacteriófago possui aproximadamente $60\text{\AA}$ de diâmetro e $1\text{-}2$ micrômetros de comprimento (dependendo da cepa). O capsídeo proteico é uma concha helicoidal formada por milhares de subunidades de ~ 50 resíduos idênticos, formando a principal proteína que protege o DNA central, sendo que a parte n-terminal encontra-se para fora do capsídeo e a c-terminal para o interior do mesmo, interagindo com o material genético. O esquema abaixo mostra o ataque da molécula nucleofílica à microesfera:

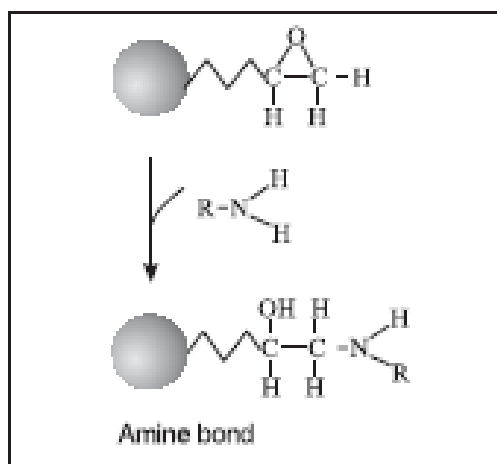


Figura 2. Esquema ilustrativo do ataque nucleofílico de amino primário ou secundário a microesfera magnética (Fonte: Invitrogen)

Assim, a possibilidade de desenvolver múltiplas plataformas diagnósticas através da interação entre antígenos, selecionados por *Phage Display* e conjugados a

microesferas, e anticorpos séricos, pode gerar resultados com rapidez, especificidade, sensibilidade e baixo custo, características encontradas nos sensores biológicos. A originalidade desta proposta está apoiada associação da técnica de *Phage Display* a um sistema de *beads* na busca da inovação e validação de testes laboratoriais para a detecção precoce do CaP.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

O presente trabalho teve como objetivo selecionar peptídeos miméticos de proteínas tumorais prostáticas imunorreativos contra IgGs de pacientes com câncer de próstata nos diferentes estadiamentos clínico-patológicos através da metodologia de *Phage Display* e padronizar o acoplamento entre os peptídeos selecionados e microesferas imunomagnéticas para desenvolver uma plataforma biotecnológica.

2.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer um serviço de vigilância junto aos setores de Urologia no Hospital de Clínicas (UFU) para triagem dos pacientes e coleta do material biológico;
- Selecionar peptídeos miméticos a proteínas tumorais ligantes a IgGs circulantes dos diferentes estadiamentos clínico-patológicos de CaP, por *Phage Display*;
- Realizar um *screening* em soro para identificação de reatividade dos clones com as amostras de pacientes com câncer em diferentes estadiamentos, doença benigna e controle por meio da técnica de ELISA;
 - Realizar o alinhamento dos peptídeos com a bioinformática
- Correlacionar o painel de marcadores selecionados com os dados clínicos dos pacientes;
- Padronizar o acoplamento de peptídeos miméticos expressos pela pIII dos fagos as microesferas imunomagnéticas de grupamento epóxi para desenvolver um diagnóstico de imunoensaio, o *Beads-ELISA*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção e seleção das amostras

As amostras de câncer de próstata e controle foram coletadas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, pela equipe médica e ambulatorial do setor de Urologia, mediante autorização dos pacientes, os quais assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo I). O procedimento de coleta foi realizado no contexto da rotina do setor cirúrgico, sem causar desconforto adicional aos pacientes. Após a coleta, as amostras (tecido e sangue) foram levadas ao laboratório de Nanobiotecnologia da UFU, processadas, identificadas por seus números de prontuários e armazenadas a -80°C . Este trabalho foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa da UFU sob o processo nº005/2001 e todas as técnicas de manipulação dos materiais biológicos seguiram normas do Código de Ética em Pesquisa com Humanos (Resolução CNS Nº 196/96).

A seleção dos pacientes deste estudo foi baseada nos seguintes critérios:

- **Critérios de inclusão:** foram incluídos no estudo pacientes acima de 45 anos de idade com o exame de toque retal suspeito e/ou níveis séricos de $\text{PSA} \geq 2.5 \text{ ng/mL}$ que foram submetidos ao rastreamento ambulatorial realizado pelo setor de Urologia do Hospital de Clínicas da UFU, como prostatectomia radical ou transvesical no caso de câncer e HPB. O rastreamento também considerou esses pacientes com ou sem história familiar de câncer de próstata. Amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos *vacutainer*TM contendo K2EDTA 7,2 mg. Um grupo composto por 60 indivíduos voluntários saudáveis com idade média de 22 anos (mínima de 14 e máxima de 29 anos) foi utilizado como grupo controle nas análises em sangue periférico.
- **Critérios de exclusão:** foram excluídos do estudo pacientes que não passaram pelo exame de prostatectomia ou aqueles caso em que a doença não pôde ser confirmada pelo exame clínico-patológico. No caso do grupo controle, excluiu-se todos os homens acima de 30 anos.

Neste estudo foram utilizados 42 soros de pacientes com adenocarcinoma de próstata (CaP) em diferentes estadiamentos; 32 soros de pacientes com hiperplasia benigna da próstata (HPB) e 39 soros de sadios conforme a Tabela I.

Tabela I Caracterização clínica das amostras utilizadas

Pacientes diagnosticados clinica e/ou patologicamente com CaP		
	BIOPANNIG	ELISA
Número de pacientes	20	22
Idade média	64,1	63,2
Mínimo e máximo	55-76	54-75
Nível médio de PSA (ng/mL)	10,31	11,2
Mínimo e máximo (ng/mL)	2,5-24,3	2,5-22
Gleason	Porcentagem de n amostral	Porcentagem de n amostral
≤ 6	80%	74%
≥ 7	20%	26%
Estadiamento	Porcentagem de n amostral	Porcentagem de n amostral
pT1	30%	18,18%
pT2	30%	72,72%
pT3	30%	9,09%
pT4	10%	0
Pacientes diagnosticado clinica e/ou patologicamente como HPB		
Número de pacientes	10	22
Idade média	67	63
Mínimo e máximo	57-76	55-73
Nível médio de PSA (ng/ml)	22,57	21,2
Mínimo e máximo (ng/mL)	2,5 – 66	2,5-36
Indivíduos controles		
Número de pacientes	18	21
Idade média	22,94	20,3
Mínimo e máximo	19-30	19-30

3.2 Acoplamento das IgGs nas microesferas proteína G

A purificação de IgGs a partir do soro de pacientes com CaP de cada estadiamento (pT1, pT2, pT3 e pT4), com HPB e do controle, foi feita por meio de microesferas magnéticas (*beads* magnéticos) conjugadas a proteína G (Dynabeads-Invitrogen) como plataforma.

Para cada 2×10^9 partículas (100ul do estoque), lavadas anteriormente três vezes com tampão MES (0,1 M pH=5,0) para ativar as microesferas, adicionou-se 100uL de pool de soro dos estádios do CaP (pT1, pT2, pT3 e pT4), de HPB e de controle, seguida da incubação por 40 minutos sob agitação a temperatura ambiente (T.A). As microesferas adsorvidas com anticorpos foram, então, lavadas novamente três vezes com tampão MES (0,1 M pH=5,0) com a finalidade de retirar os anticorpos não ligantes.

Para realizar a ligação covalente entre a microesfera e os anticorpos, o sistema *beads*-anticorpo foi lavado duas vezes com 1ml de tampão trietanolamina (0,2M pH=8,2) e, ressuspendido e 1mL de tampão de ligação covalente (20mM de dimetil pimelinidato x 2HCl em tampão trietanolamina) por 30 minutos sob agitação a T.A. A neutralização da reação da ligação covalente foi feita pela incubação do sistema *beads*-anticorpos com 1mL de tampão Tris (50mM pH=7,5) por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as microesferas foram lavadas com TBS-T 0,1% de tween e bloqueadas por 1hora a 37°C com a solução de bloqueio (5% de BSA em TBS-T 0,05% de tween) e ressuspendidas em 200ul de TBS.

Para certificar-se do acoplamento, 5ul de *beads* contendo IgG, dos diferentes grupos, foram incubados por 1 hora a 37°C com anti-IgG (VH+ VL da *Sigma*) humana diluído na proporção 1:5000 na solução de bloqueio e com anti-IgY na proporção 1:5000 para o controle da reação. Após a incubação, os *beads* foram lavados 3 vezes com TBS-Tween 0,1% e reveladas com substrato de tetrametilbenzidina (TMB). A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 2N e efetuada a leitura a 450 nm em leitor de microplacas (*Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, USA*).

3.3 Seleção dos Peptídeos Recombinantes

3.3.1 Biopanning (Seleção de Fagos)

Foram utilizadas 10 μ L (1×10^{11} partículas virais) de uma biblioteca randômica de peptídeos fusionados em fagos (Ph.D.-C7C da NEW ENGLAND BioLabs[®]Inc.), diluída em 190 μ L de TBS-Tween 0,1% para a seleção de ligantes de IgG de pacientes de CaP nos quatro estadiamentos. A biblioteca é composta de 7 aminoácidos randômicos expresso na região da pIII do bacteriófagos, os quais são flanqueados por um par de resíduos de cisteína, que quando oxidados durante a montagem do fago formam uma ligação dissulfeto.

A seleção foi realizada com 20 μ L das microesferas de proteína G acopladas com IgGs dos diferentes grupos. Para a seleção negativa, a biblioteca de *Phage Display* foi incubada, por 30 minutos a T.A, com as microesferas acopladas com IgGs de controles, e em seguida, as microesferas foram precipitadas por centrifugação e o sobrenadante foi transferido a outro tubo contendo microesferas acopladas com IgGs de outro grupo controle. Este procedimento foi realizado por 3 vezes com grupo controle e 2 vezes com grupo de HPB.

Para a seleção positiva, o sobrenadante de fagos, previamente incubado com IgGs de pacientes com HPB, foi transferido para um tubo contendo microesferas acopladas com IgGs de pacientes com câncer do estadiamento pT1, e este foi incubado por 30 minutos a T.A. Posteriormente, precipitou as microesferas e o sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo microesferas com IgG do estadiamento pT2. As microesferas contendo o sistema *beads*-anticorpo do estágio pT1 mais o fago foram lavadas 10 vezes com TBS-T 0,1%, e os fagos selecionados foram eluídos com 500 μ L de glicina pH 2,0 e neutralizada com 75 μ L de Tris pH 9. Esses passos foram repetidos para os estágios pT2, pT3 e pT4, conforme a Figura 3.

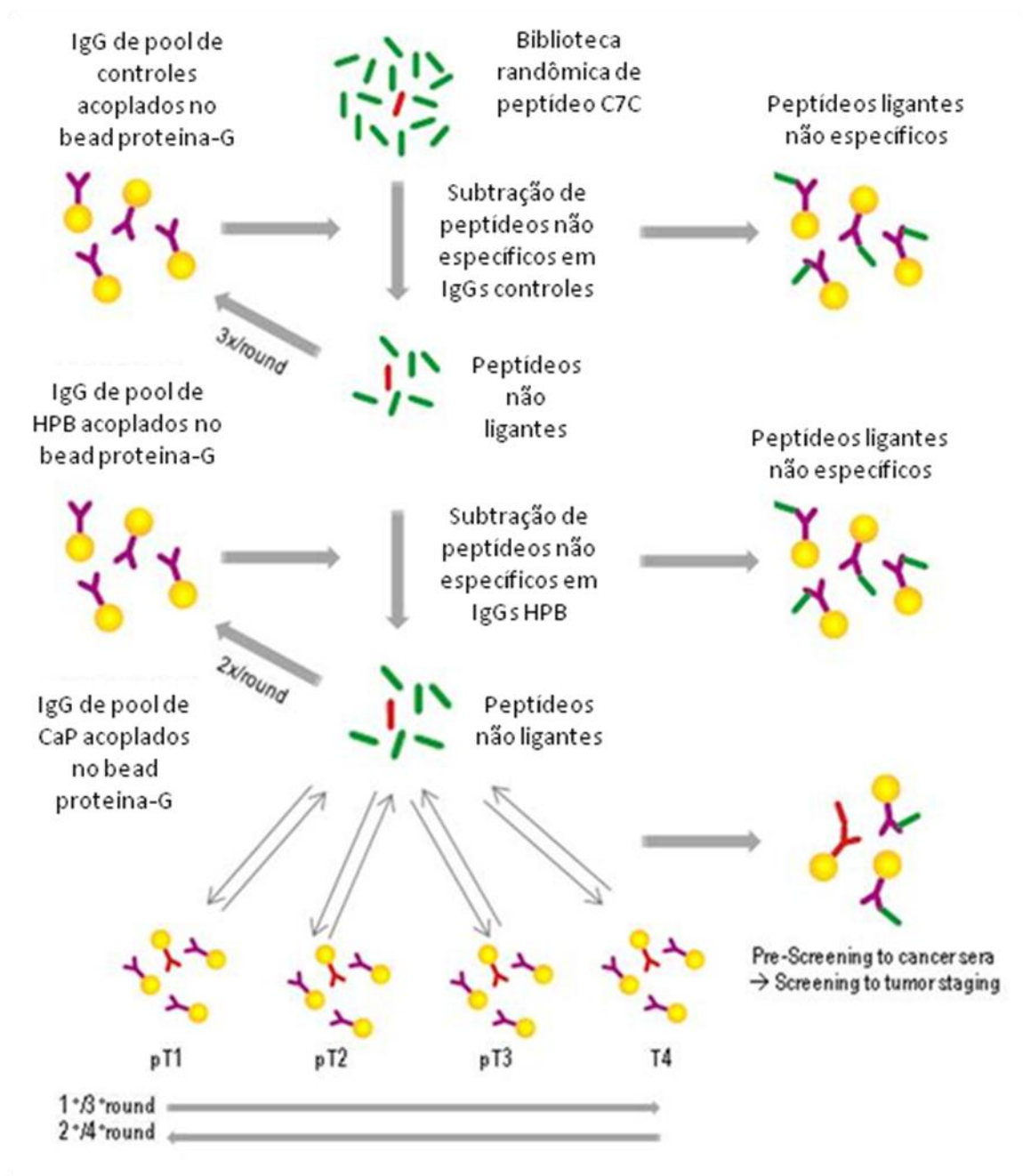


Figura 3. Estratégia para identificação de epítopos tumorais antigênicos usando biblioteca de peptídeo randômico por Phage Display. Fonte: Hanash, S. Harnessing immunity for cancer markers Discovery, *Nature biotechnology*. V. 21. 2003. .

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, 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 600 ~

0,3). Ao atingir esta fase, a cultura bacteriana foi inoculada com 500ul dos eluatos dos fagos e incubados a 37°C por 4-5 horas sob forte agitação.

Em seguida, a cultura foi centrifugada a 4°C a 10000rpm por 10 minutos e o sobrenadante 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. A solução foi incubada por 12-16 horas a 4°C para a precipitação do fago e posteriormente, centrifugada a 10000 rpm por 15 minutos a 4°C para descartar o sobrenadante. O precipitado foi, então, suspenso em 1mL de TBS e reprecipitado 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 ressuspenso em 200uL de TBS a 0.02% de NaN₃, obtendo-se então o eluato amplificado, posteriormente titulado e armazenado a 4°C. A cada ciclo do *biopanning* foi invertido a ordem de incubação dos fagos ao estadiamentos do tumor, sendo que a estrigência das lavagens variou de 0,1 a 1% em cada ciclo.

3.3.2 Titulações

A titulação é um procedimento utilizado para determinar a quantidade de partículas virais durante entrada e saída de cada ciclo do “*Biopanning*”. A solução de fagos foi submetida a diluições seriadas crescentes exponenciais sob log₁₀ em meio LB. Para eluatos não amplificados de cada estadiamento foram utilizadas as diluições de 10⁻¹ até 10⁻⁴ e no caso das soluções com eluatos amplificados a faixa de diluição utilizada foi entre 10⁻⁸ 10⁻¹¹. Para cada diluição acrescentou-se 200μL da cultura de ER2738 na fase mid-log (densidade óptica 600nm ~0,5) e a solução foi agitada rapidamente e incubada por 5 minutos a 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 tetracilina. 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.

3.3.3 Análise de Enriquecimento do Panning: Teste Beads-ELISA

Para verificar o enriquecimento dos clones dos estadiamentos (pT1, pT2, pT3 e pT4) a cada ciclo do “*Biopanning*”, foi realizado um teste de imunoenensaio enzimático (*beads*-ELISA) tendo os *beads* como plataforma adotada. Em uma placa de microtitulação de 96 poços não carregada foi depositado em triplicada 1ul de microesferas acopladas com as imunoglobulinas G de cada estadiamento. Em seguida, fez-se a diluição de 1×10^{11} dos fagos eluídos não amplificados de cada ciclo na solução de BSA 5% diluído em TBS-T 0,05%, os quais foram incubados com as microesferas por 1 hora sob agitação a T.A . Com um aparato magnético, as microesferas foram precipitadas, lavadas 6 vezes com TBS-T 0,5% e incubadas com o anticorpo monoclonal anti-M13 conjugado com peroxidase (GE Healthcare) na diluição de 1:5000 em BSA 5% diluído em TBS-T 0,5%, por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação. As microesferas foram novamente precipitadas, lavadas 6 vezes e reveladas com tampão orto-fenilenodiamina (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*, USA) pela leitura a 492nm.

3.3.4 Extração de DNA de Fagos

As colônias, oriunda das placas tituladas dos 3º e 4º ciclos do *biopanning*, foram isoladas e transferidas para poços de placas de cultura (tipo deepwell), contendo 1,2mL de cultura de ER2738 em fase early-log (OD 600 ~ 0,3) para a extração do DNA dos fagos. Nos poços da primeira linha da placa foram adicionadas colônias dos fagos pT1, nos poços da segunda linha, fagos pT2 e, assim, sucessivamente. A placa foi, então, vedada com um adesivo perfurado e incubada a 37°C, por 24 horas, sob vigorosa agitação (250 rpm). Para isolar os fagos das bactérias, as placas foram centrifugadas a 3700 rpm, a 20°C, durante 30 minutos. Então, 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 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) foram adicionados aos fagos precipitados. As placas foram agitadas vigorosamente por 40 segundos e 250µL de etanol absoluto foi acrescentado. Após uma incubação de 10 minutos, à temperatura ambiente, as placas foram centrifugadas (3700 rpm, 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.

3.3.5 Sequenciamento

Na reação de sequenciamento, foram utilizados 500ng de DNA molde, 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). 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 sequenciado foi feito com 1µL de Acetato de Amônio e 27,5µL Etanol. Posteriormente, a placa foi centrifugada por 45 minutos, a 3700 rpm e o sobrenadante descartado. Adicionou-se 150µL de Etanol 70% ao DNA precipitado e centrifugou-se por 15 minutos, a 3700 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 papel alumínio e permaneceu em repouso durante 5 minutos para evaporar o etanol remanescente. Os precipitados resultantes foram ressuspensos em 10ul 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) no Laboratório de Nanobiotecnologia (UFU).

3.3.6 Pré-Screening Phage-ELISA

Para analisar a reatividade dos clones às IgGs dos pacientes com CaP, HPB e negativo, foi realizado o ensaio de ELISA. As placas de microtitulação (NUNC Maxisorp) carregadas foram sensibilizadas com 100µg/poço de anticorpo monoclonal anti-M13 (GE Healthcare) sem marcação diluído em tampão carbonato 50mM pH 9,6 por 16 horas a 4°C. Decorrido o tempo de sensibilização, as placas foram bloqueadas com tampão de bloqueio (TBS-T 0,05% suplementado com 5% de leite desnatado) por 1 hora a 37°C. As placas foram lavadas três vezes com TBS-Tween a 0,5% e incubadas com 100µL/poço de cultura dos fagos selecionado de cada estadiamento e de cultura de fago selvagem (fago que não expressa nenhuma proteína exógena) para controle das reações por 1 hora a 37°C. Posteriormente, as placas foram lavadas cinco vezes e os clones miméticos as proteínas tumorais de cada estádios foram incubadas por 1 hora a 37°C com o respectivo *pool* de soro CaP de cada estadiamento, HPB e sadios (controle negativo) – na concentração de 1:500, diluídos em tampão de bloqueio.

Após este período, as placas foram lavadas cinco vezes e incubadas com anti-IgG humana conjugado com peroxidase (Sigma) diluído 1:5000 em TBS-T 0,05% suplementado com 5% de leite desnatado, durante 1 hora a 37°C. Após 5 lavagens com TBS-T 0,5%, a ligação antígeno/anticorpo foi detectada pela adição de tampão orto-fenilenodiamina (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, USA*) pela leitura a 492nm.

3.3.7 Screening dos Fagos Escolhidos com Soros de pT1, pT2, pT3, pT4

Os fagos mais reativos do ELISA pré-screenig foram amplificados e testados com os pool de soro CaP pT1, pT2, pT3 e pT4, HPB e negativo para analisar se os clones são capazes de discriminar os estádios clínico-patológico doença e manter uma reatividade baixa quanto incubados com o soro de HPB e negativo.

As placas de microtitulação foram sensibilizadas com 40µg/poço de anticorpo monoclonal anti-M13(GE Healthcare) sem marcação diluído em tampão carbonato 50mM pH 9,6 por 16 horas a 4°C. Após a sensibilização, descartou-se o sobrenadante, e as mesmas foram bloqueadas com PBS-T 0,05% suplementado com 5% de leite desnatado por 1 hora a 37°C. Em seguida, lavou-se as placas três vezes com PBS-T 0,5% de tween e diluiu os fagos a 10¹¹/poço em PBS-T 0,05% suplementado com 5% de leite desnatado e incubou por 1 hora a 37°C. Lavou-se, novamente, três vezes com PBS-T 0,5% de tween, e incubou com pool de soro dos pT1, pT2, pT3 e pT4, além de HPB e controle, na proporção de 1:500 diluído em PBS -T 0,05% suplementado com 5% de leite desnatado por 1 hora a 37°C. Lavou-se a placa cinco vezes com PBS-T 0,5% de tween e, em seguida, incubou-as com anti-IgG humana conjugado com peroxidase (Sigma) diluído 1:5000 em PBS-T 0,05% suplementado com 5% de leite desnatado, durante 1 hora a 37°C. Lavou-se, novamente, cinco vezes com PBS-T 0,5% e a ligação antígeno/anticorpo foi detectada pela adição de tampão orto-fenilenodiamina (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*, USA) pela leitura a 492nm.

3.3.8 Análise de Dados pela Bioinformática

Após o sequenciamento e a determinação dos fagos específicos para cada estadiamento, as seqüências de DNA foram traduzidas 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>).

O alinhamento dos peptídeos selecionados foi testado utilizando os programas *CLUSTAL W2* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html/>). O programa

CLUSTAL W2 inclui ainda na análise a formulação da sequência consenso. 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 seqüências a serem investigadas com todas as depositadas nos bancos de dados de ácidos nucléicos 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 seqüências 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.

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

3.3.9. Screening dos Fagos Escolhidos com Soros individuais

Após a triagem dos fagos mais reativos com os estadiamento do câncer, os clones SPLFPWL, LFPWLGS, NLLFPWL foram testados com soros individuais de pacientes com CaP, HPB e negativo para analisar o valor preditivo positivo, negativo, sensibilidade especificidade e *odds ratio*. Para isso, as placas de microtitulação foram sensibilizadas com 40µg/poço de anticorpo anti-M13(GE Healthcare) sem marcação diluído em tampão carbonato 50mM pH 9,6 por 16 horas a 4°C. Após a sensibilização, descartou-se o sobrenadante, e as mesmas foram bloqueadas com PBS-T 0,05% suplementado com 5% de leite desnatado por 1 hora a 37°C. Em seguida, lavou-se as placas três vezes com PBS-T 0,5% de

tween e diluiu os fagos a 10^{11} /poço em PBS-T 0,05% suplementado com 5% de leite desnatado e incubou por 1 hora a 37°C. Lavou-se, novamente, três vezes com PBS-T 0,5% de tween, e incubou com de soro de pacientes individuais CaP, de HPB e controle, na proporção de 1:500 diluído em -T 0,05% suplementado com 5% de leite desnatado por 1 hora a 37°C. Lavou a placa cinco vezes com PBS-T 0,5% de tween e, em seguida, incubou com anti-IgG humana conjugado com peroxidase (Sigma) diluído 1:5000 em PBS-T 0,05% suplementado com 5% de leite desnatado, durante 1 hora a 37°C. Lavou-se, novamente, cinco vezes com PBS-T 0,5% e a ligação antígeno/anticorpo foi detectada pela adição de tampão orto-fenilenodiamina (OPD) a 1mg/mL acrescida de 3% de água oxigenada (H_2O_2). A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 4N. A reatividade foi obtida em leitor de placas (*Titertek Multiskan Plus*, Flow Laboratories, USA) pela leitura a 492nm.

3.4 Desenvolvimento de uma Plataforma de Diagnóstico

3.4.1 Avaliação dos diferentes tampões para o teste de acoplamento

A padronização do acoplamento dos peptídeos selecionados por *Phage Display* aos *beads* (microesfera magnética) foi realizado com intuito de desenvolver uma plataforma de diagnóstico. O procedimento de acoplamento do fago selecionado baseou-se no protocolo (Dynal ®). Utilizou-se a proporção de 10^7 *beads*/ ml (Dynabeads M-270 Epoxy - Dynal cat. N. 143.02, solução estoque a 3mg/ml) para 3µg de fago ($2,4 \cdot 10^{11}$ de partículas virais) e para a solução de 5ug/ml de BSA como controle de reação.

A realização do procedimento de acoplamento foi feito pela combinação dos diferentes tampões (fosfato de sódio 0,1M pH 7,4; fosfato de sódio 1,2M pH 10,2 e sulfato de amônio 3M pH 7,4) durante cinco ensaios. No primeiro ensaio de acoplamento utilizou-se 30µL de *beads*, os quais foram incubados com o fago selecionado em 30 µL de tampão fosfato de Na pH 7,4, 0,1M e 30 µL de sulfato de amônio 3M, sob agitação a 37°C por 24 horas. Em seguida, os *beads* foram lavados três vezes com 200 µL de solução PBS e ressuspensos em 60 µL de tampão fosfato. Do segundo ao quinto ensaios realizou-se os mesmos procedimentos porém

variando os tampões, bem como a sua quantidade (Tabela II). Os *beads* controles com BSA também foram submetidos aos mesmo cinco ensaios.

Tabela II Relação do tipo e da quantidade dos tampões utilizados versus o teste de acoplamento do fago selecionado (F1 - CaP).

Ensaio	Tampões		
	Sulfato de amônio 3M pH 7,4	Fosfato de sódio 0,1M pH 7,4	Fosfato de sódio 1,2M pH 10,2
1°	30µL	30µL	-
2°	60µL	-	-
3°	45µL	-	15µL
4°	-	-	60µL
5°	45µL	15µL	-

Para verificar se houve perda de *beads* além de padronização da quantidade de *beads* a serem utilizados nos futuros testes, foi realizada a contagem das microesferas na câmara de Neubauer. Diluiu-se, primeiramente, 10 µL de *beads* em 990 µL de água destilada. Posteriormente, pipetou-se 10 µL da solução e colocou na câmara de Neubauer para realizar as contagens. Contou-se os quatro quadrantes e calculou a quantidade de microesfera por mL através da seguinte fórmula:

***Beads/mL*: média dos quatro quadrantes x fator de correção (10) x diluição x 1000mL**

3.4.2 Teste de *Beads*-ELISA : Certificação do acoplamento

Para analisar se os fagos foram acoplados ao *beads*, foi feito um teste de *beads*-ELISA. Em uma placa de microtitulação não carregada foi depositado 1 µL de *beads* acoplado com os fagos nos diversos tampões, sendo que para cada acoplamento foi feito 6 repetições. O *beads*-BSA acoplado nos diferentes tampões foi repetido também 6 vezes e utilizado como controle da reação. Posteriormente, os *beads* acoplados foram incubados com 100 µL de anti-M13 marcado com peroxidase (GE Healthcare) diluído em 1:5000 em solução de PBS-BSA 5% por 1 hora a

temperatura ambiente sob agitação. Lavou-se três vezes os *beads* com PBS-Tween 0,1% e a revelação foi executada com orto-fenilenodiamina (OPD) a 1mg/mL acrescida de 3% de água oxigenada (H₂O₂). A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 4N, enquanto a reatividade foi obtida em leitor de placas (*Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, USA*) pela leitura a 492nm.

3.4.3 Teste de Bloqueio da Região da pIII

Para verificar se há o bloqueio da região pIII quando há o acoplamento ocorre na região n-terminal, os fagos acoplados aos *beads* foram titulados. Primeiramente, os *beads* foram submetidos a diluição seriada de 10 vezes. Então, 1ul de *beads* foi diluído de 10⁻¹ até 10⁻². A diluição 10⁻² foi acrescida de 200μL da cultura de ER2738 na fase mid-log (OD600 ~0,5) e incubada por 15 minutos a temperatura ambiente. As células bacterianas foram transferidas para tubos de cultura contendo 3mL de Ágar-Top a 45°C e espalhadas sobre a placa de Petri, contendo meio LB sólido, com IPTG/Xgal e tetracilina. As placas foram incubadas a 37°C, durante 16 horas. Após este período, verificou-se se houve a formação de colônias azuis.

3.5 Análise Estatística

As análises estatísticas foram feitas para verificar o acoplamento dos anticorpos e fagos nas diferentes microesferas, bem como, a positividade e especificidades dos clones reativos ao CaP. O teste utilizado foi ANOVA seguido de pós-teste Bonferroni, com intervalo de confiança 95%. Para o teste de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e *odds ratio* foi realizado Teste Exato de *Fisher*. As análises e os gráficos foram realizados pelo software estatístico *GraphPad Prism 4.0*, assumindo significância quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Acoplamento das IgGs nas microesferas proteína G

Para quantificar e verificar a eficiência do isolamento dos anticorpos dos pacientes com CaP (pT1, pT2, pT3 e pT4), com HPB e do controle por meio de microesferas magnéticas (*beads* magnéticos) proteína G, foi realizado o teste de *beads* ELISA. Como pode ser visto na Figura 4, o acoplamento das IgGs mostrou-se significativo quando comparou-se os dados com o controle.

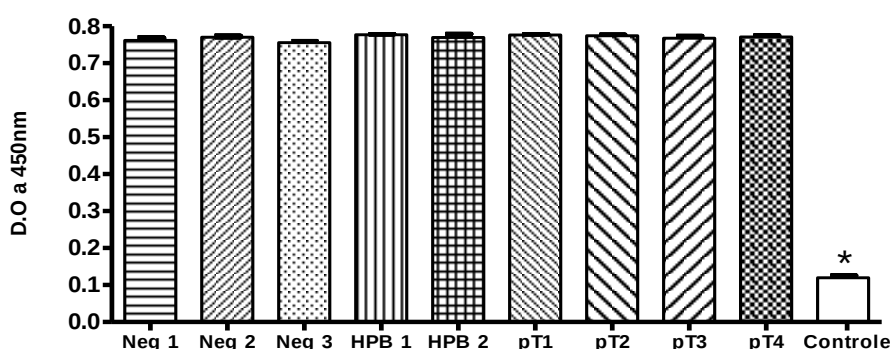


Figura 4. Ensaio de *beads*-ELISA para o acoplamento de IgGs: O eixo Y representa a leitura média da absorbância a 450nm e no eixo X representa os diferentes grupos em que os anticorpos foram acoplados no *beads* e testado tanto com anti-IgG humana quanto com anticorpo irrelevante como controle da reação. * representa o valor de $p < 0,05$ quando compara-se o acoplamento dos IgGs dos diferentes grupos com o controle da reação. A barra superior em cada coluna representa o desvio padrão de N=2. Teste estatístico utilizado para análise foi ANOVA um critério com pós teste de Bonferroni, Software *GraphPadPrisma* versão 4.0.

Além disso, não houve diferença significativa entre os valores da absorbância dos acoplamentos dos grupos Negativos, HPBs e CaPs.

4.2 Seleção de Peptídeos Recombinantes

4.2.1 Biopanning e Titulações

Para a seleção dos peptídeos ligantes aos anticorpos policlonais IgGs dos diferentes estadiamento do câncer de próstata, a especificidade dos peptídeos foi assegurada por três passos de subtrações negativas com o grupo controle e das duas subtrações com HPB, utilizando IgGs purificadas acoplada a microesferas proteína-G. Já a eluição ácida possibilitou a seleção positiva dos fagos ligantes a IgGs de pacientes com CaP.

A quantidade de fagos selecionados durante os quatro ciclos de seleção foi estimada pela titulação dos eluatos amplificados e não amplificado de cada ciclo, (Tabela III). Os títulos de entrada dos fagos no “*biopanning*” foram sempre maiores que os títulos de saída, pois os fagos com maior afinidade aos anticorpos contra o tumor ficam ligados as IgGs tumorais por interação peptídeo/anticorpo e o restante dos fagos com baixa ou sem afinidade foi removido durante as lavagens. Nas amplificações ocorre o inverso, indicando a eficiência do processo.

Tabela III. Seleção dos fagos com peptídeos ligantes aos anticorpos policlonais IgG anti-CaP. Título obtido (pfu) no processo de seleção dos fagos por imunoafinidade

Ciclos	Número de Partículas de Fagos			
	Entrada		Saída	
1º Ciclo de seleção	Biblioteca original	1×10^{11}	pT1	7×10^7
			pT2	5×10^3
			pT3	2×10^3
			pT4	6×10^3
2º Ciclo de seleção	Pool de fagos	1×10^{11}	pT1	5×10^3
			pT2	3×10^3
			pT3	1×10^3
			pT4	5×10^3
3º Ciclo de seleção	Pool de fagos	1×10^{11}	pT1	1×10^5
			pT2	$1,6 \times 10^5$
			pT3	4×10^4
			pT4	7×10^4
4º Ciclo de seleção	Pool de fagos	1×10^{11}	pT1	3×10^4
			pT2	8×10^4
			pT3	1×10^4
			pT4	3×10^4

4.2.2 Análise do Enriquecimento: Teste Beads-ELISA

Para verificar o enriquecimento do pool de mimetopos de CaP selecionados durante os ciclo do *biopanning*, utilizou-se a estratégia de *beads* ELISA. No quarto ciclo, pôde-se observar um enriquecimento significativo dos fagos com afinidade aos anticorpos presentes no soro de pacientes com CaP, principalmente, entre o 1° e 4° ciclo e o 2° e 4° ciclo ($p \leq 0,001$) (Figura 5).

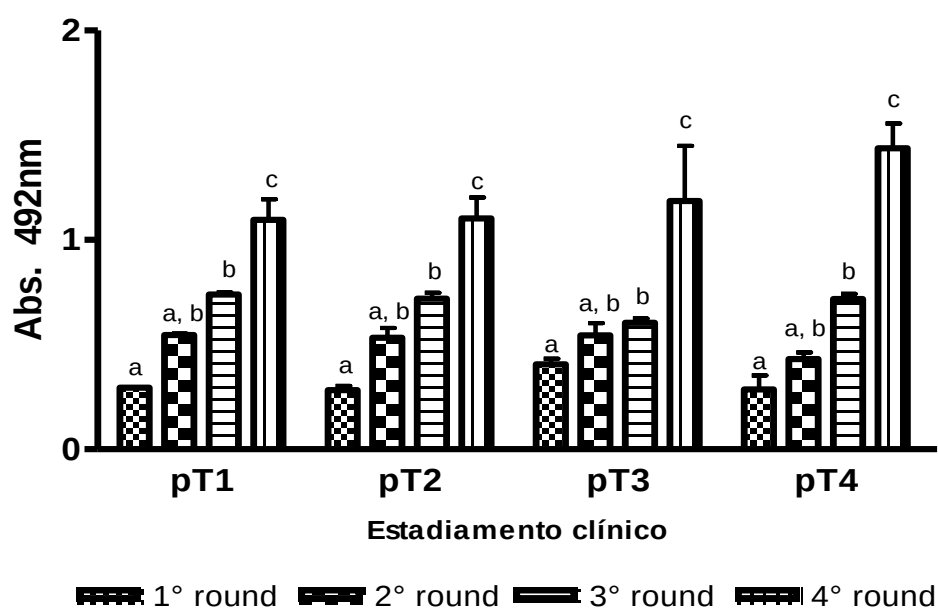


Figura 5. Ensaio de *beads*-ELISA para o teste de enriquecimento: O eixo Y representa a leitura média da absorbância feita no espectrofotômetro a 490nm e no eixo X representa os diferentes grupos de anticorpos acoplado no *beads* testado com pool de fagos do primeiro, segundo, terceiro e quarto ciclo (C). As letras indicam os grupos em que houveram diferença significativa nos estadiamentos tumorais pelo teste de ANOVA um critério, com pós teste de correção de Bonferroni no software GraphPad Prisma 4.0. **c-** 4°ciclo vs 3°, 2° e 1° ciclos com $p < 0,001$; **b-** 3° ciclo vs 1° ciclo com valor de $p < 0,01$.

Quando comparado com os outros grupos do teste de enriquecimento, o estadiamento pT3 foi aquele que menor teve um enriquecimento significativo.

4.2.3 Extração de DNA e Seqüenciamento dos Clones de Fagos

Dentre os 196 clones seqüenciados, 81 apresentaram seqüências válidas (sem erros de seqüenciamento), e apenas 43 seqüências apresentaram-se diferentes. A Tabela IV mostra a frequência de cada clone nos diferentes estadiamentos.

Tabela IV . Freqüência dos clones de fagos seqüenciados em diferentes estadiamentos.

Peptídeos	Frequência dos peptídeos	Frequência absoluta			
		pT1	pT2	pT3	pT4
SPLFPWL	12/81	4	2	6	0
LPTRTSH	7/81	1	2	1	3
SSIFPWL	5/81	1	3	1	0
NLSSSWI	5/81	1	3	0	1
NLLFPWL	4/81	1	2	1	0
SSGPPHS	3/81	2	0	1	0
LGAPFSR	3/81	0	0	0	3
GLYSFSK	2/81	0	0	0	2
SSAGSLF	2/81	0	0	0	2
LFPWLGS	2/81	1	1	0	0
SALFPWL	2/81	0	2	0	0
PSLFPWL	2/81	0	2	0	0
LFPWLSS	2/81	0	2	0	0
LFPLLPG	1/81	0	0	1	0
GFPLPHL	1/81	0	0	1	0
ESSCFLG	1/81	0	0	1	0
DVFPWLP	1/81	0	0	0	1
VPAWNPH	1/81	0	0	0	1
LSSSASL	1/81	0	0	0	1
CSFSASC	1/81	0	0	0	1
TTLSPHL	1/81	0	0	0	1
TTMSPLL	1/81	0	0	0	1
LGLPFSN	1/81	0	0	0	1
LGHPFLR	1/81	0	0	0	1
LFPWLAP	1/81	0	0	0	1
STLAPSL	1/81	0	0	0	1
STLLPQL	1/81	0	0	0	1
SVLFPWL	1/81	1	0	0	0
PLLSITA	1/81	1	0	0	0
TSRLGHL	1/81	1	0	0	0
VSICSVD	1/81	0	1	0	0

EATRPAT	1/81	0	1	0	0
NPVFPWL	1/81	1	0	0	0
LFPWLPG	1/81	1	0	0	0
SSLFPWL	1/81	1	0	0	0
PPSSRPS	1/81	1	0	0	0
PSPASSF	1/81	1	0	0	0
HALFPWL	1/81	0	1	0	0
NTSPLHQ	1/81	1	0	0	0
QPSSHSL	1/81	0	1	0	0
SPIFPWL	1/81	1	0	0	0
SPDSSAL	1/81	0	0	1	0
LFPWLPD	1/81	0	1	0	0
TOTAL	81	21	24	14	22

4.2.4 Pré-Validação de Mimetopos por Phage-ELISA

Os fagos eluídos do terceiro e quarto ciclo de cada estadiamento do *biopanning* foram submetidos ao ensaio de *Phage-ELISA* com pool de soro de pacientes com CaP para verificar a reatividade ao alvo. A normalização da quantidade de partículas virais entre os clones a serem testados foi feita pela sensibilização do anticorpo anti-M13 na placas de microtitulação. Utilizou-se o fago selvagem como controle negativo de reação, além de indivíduos sadios.

A Figura 6 demonstra a reatividade dos anticorpos anti-CaP presentes nos soros dos pacientes contra os clones. Os clones que obtiveram uma absorbância média superior ao controles saudáveis e ao fago selvagem foram selecionados como os prováveis mimetopos de câncer.

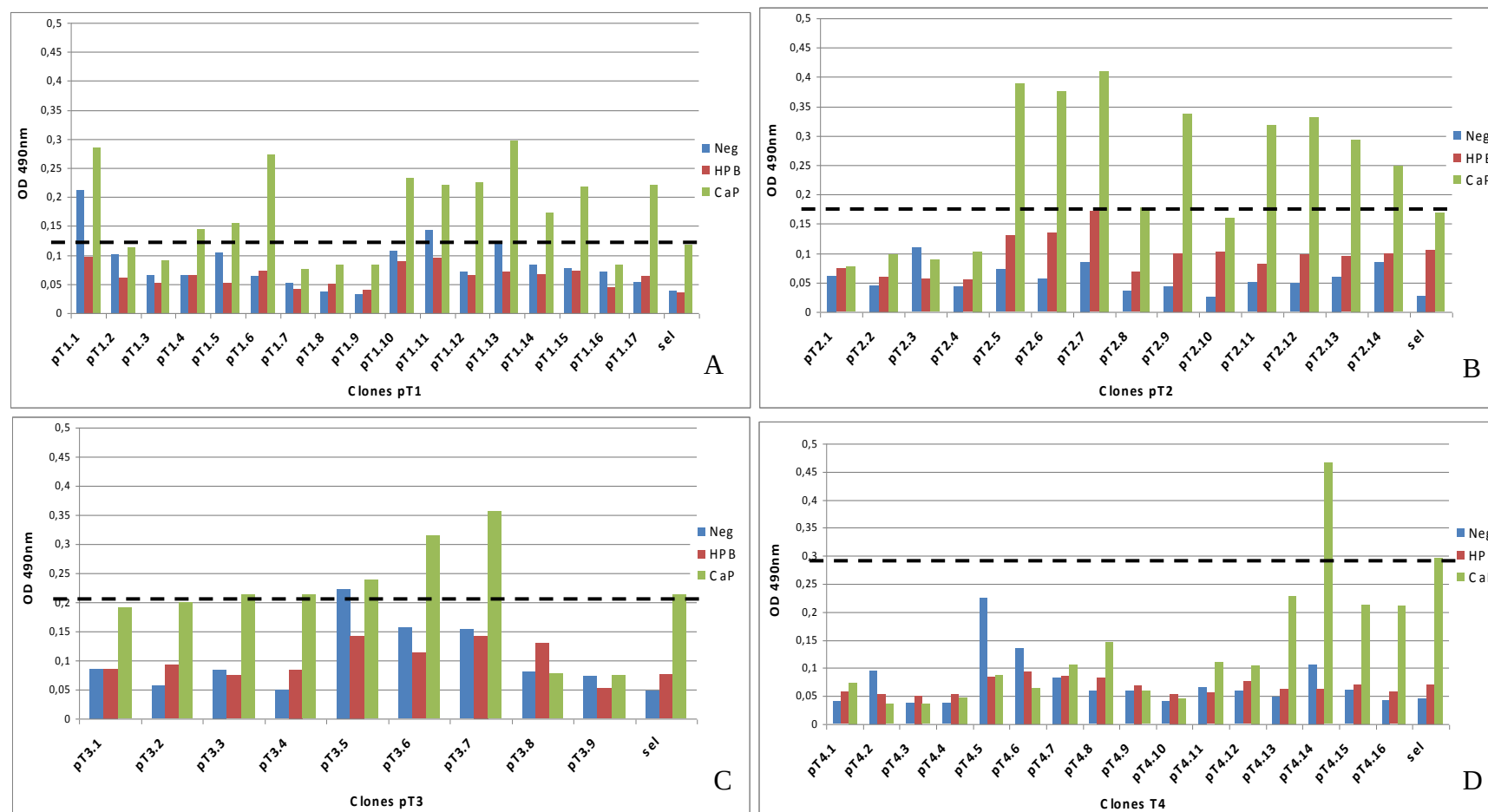


Figura 6. Paine de pré- validação dos clones reconhecidos por IgG de pacientes com CaP em diferentes estadiamento. Os clones foram capturados por anticorpo anti-M13 e incubados com soros de pacientes com câncer, HPB e indivíduos saudáveis. Para comparação, o fago selvagem foi submetido às mesmas condições. Os 11 clones do pT1(A), 8 fagos do pT2 (B), 2 fagos pT3 (C), e 1 fago pT4 (D) selecionados mostraram uma alta afinidade de ligação, quando comparado ao selvagem. Totalizando, desse modo, 22 fagos, sendo que são diferentes.

4.2.5 Screening dos Fagos Seleccionados com Soros de pT1, pT2, pT3, pT4

Após selecionar os 16 fagos distintos, os mesmos foram submetidos ao teste *Phage-ELISA* para verificar se os mimetopos apresentam reatividade cruzada entre os quatros tipos de sorológico do CaP (pT1, pT2, pT3, pT4), além de HPB e controle. Além disso, o teste possibilitou analisar a predominância de um peptídeo específico a cada estadiamento. As Figuras 7-9 mostram a reatividade dos 16 peptídeos selecionados no *screening* nos diferentes estadiamentos.

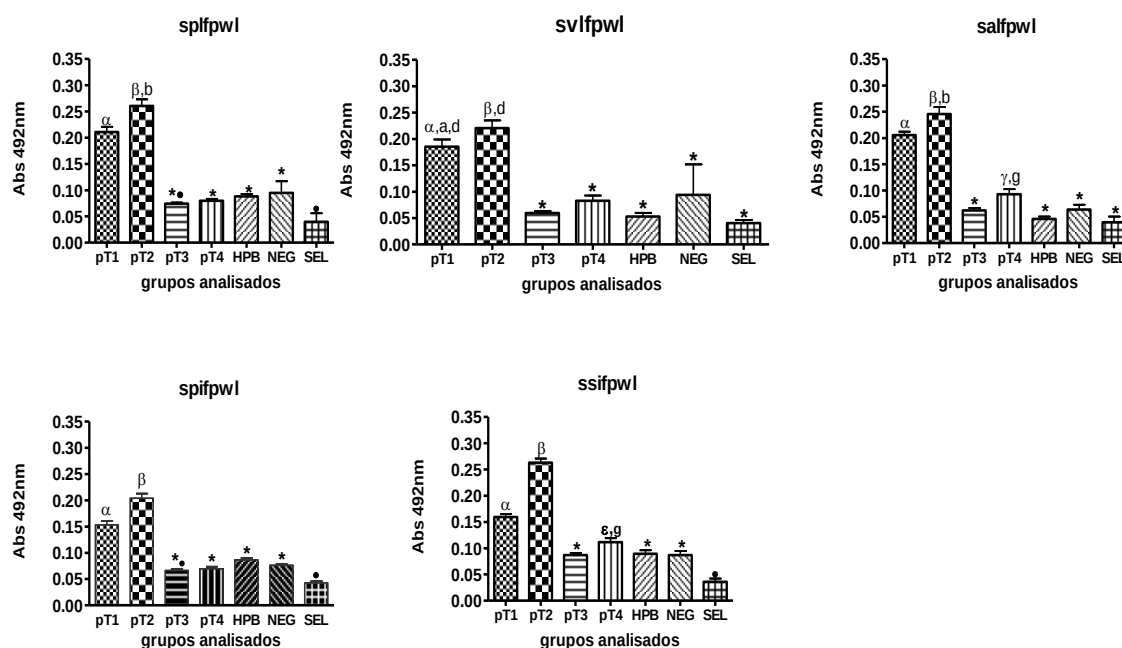


Figura 7. Análise do primeiro grupo de clones selecionados especificamente pelos anticorpos dos diferentes tipos de pool de soro de pT1, pT2, pT3, pT4 de pacientes. Os clones foram agrupados de acordo com as similaridades químicas dos aminoácidos. A escala no eixo y mostra a absorbância a 492nm correspondente aos fagos ligantes. Os dados estão representados pela média $\pm$ desvio padrão. As letras e símbolos representam os valores positivos para as diferenças de médias e os valores significativos para o câncer, e letras iguais mostram grupos em que não houveram diferenças. α - pT1 vs pT3, pT4, HPB, NEG, selvagem, com $p < 0.001$; a -pT1 vs; pT4, NEG, com $p < 0,01$; b - pT2 vs pT1, com $p < 0,01$; β - pT2 vs pT3, pT4, HPB, NEG, selvagem com $p < 0.001$; g - pT4 vs pT3, NEG com $p < 0,05$; γ -pT4 vs pT3, HPB, NEG, sel com $p < 0,05$, ϵ - pT4 vs pT3 com $p < 0,01$. O teste estatístico utilizado foi ANOVA um critério, com pós teste de correção de Bonferroni feito pelo software *GraphPad Prism* versão 4.0.

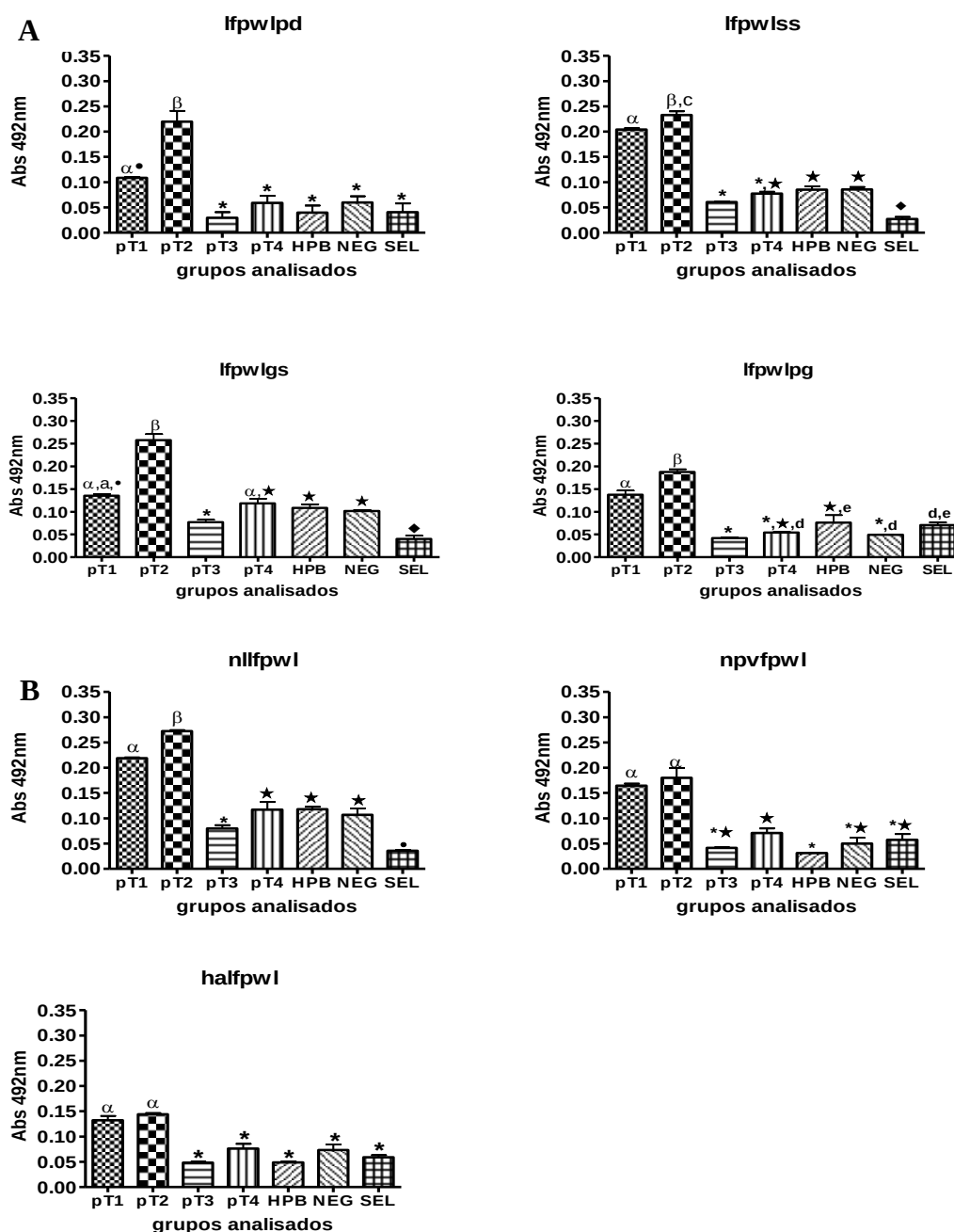


Figura 8. Análise de clones selecionados especificamente pelos anticorpos dos diferentes tipos de pool de soro de pT1, pT2, pT3, pT4 de pacientes. Os clones foram agrupados de acordo com as similaridades químicas dos aminoácidos em A e B. A escala no eixo y mostra a absorvância a 492nm correspondente aos fagos ligantes. Os dados estão representados pela média $\pm$ desvio padrão. As letras e símbolos representam os valores positivos para as diferenças de médias e os valores significativos para o câncer, e letras iguais mostram grupos em que não houveram diferenças. α - pT1 vs pT3, pT4, HPB, NEG, selvagem, com $p < 0.001$; a - pT1 vs NEG com $p < 0.01$; $\bullet$ - pT1 vs HPB ou vs pT4 e NEG com $p < 0.05$; β - pT2 vs pT3, pT4, HPB, NEG, selvagem com $p < 0.001$; c - pT2 vs pT1 com $p < 0.05$; γ - pT4 vs pT3, HPB, NEG, sel com $p < 0.05$. O teste estatístico utilizado foi ANOVA um critério, com pós teste de correção de Bonferroni feito pelo software *GraphPad Prism* versão 4.0.

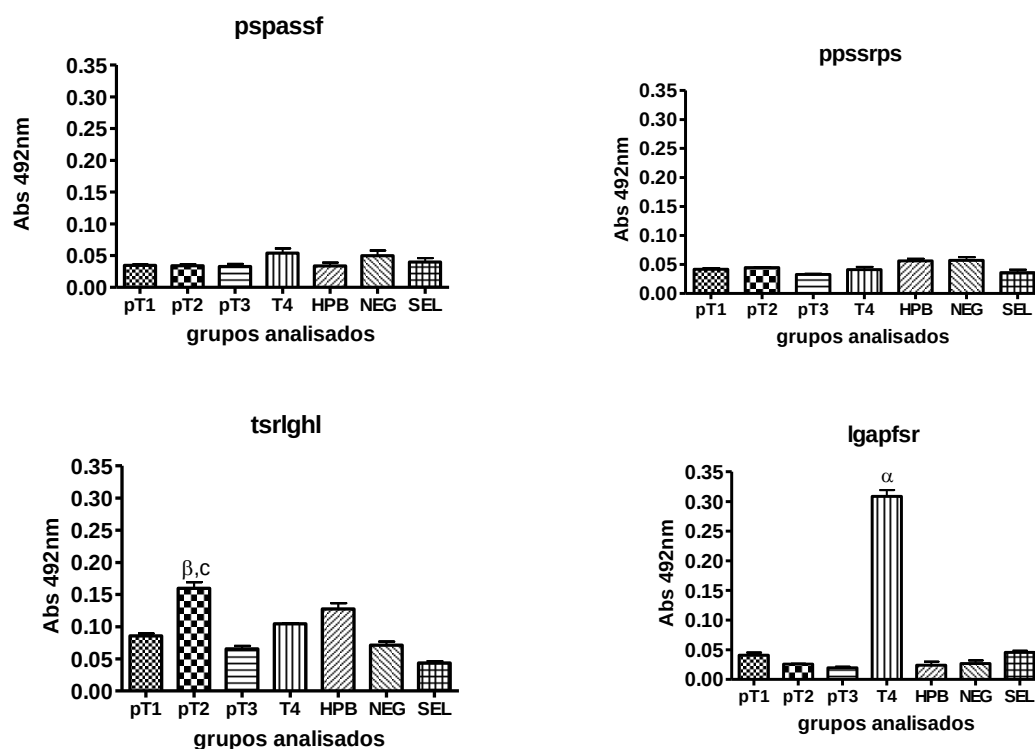


Figura 9. Análise de clones selecionados especificamente pelos anticorpos dos diferentes tipos de pool de soro de pT1, pT2, pT3, pT4 de pacientes. Os clones foram agrupados de acordo com as similaridades químicas dos aminoácidos. A escala no eixo y mostra a absorbância a 492nm correspondente aos fagos ligantes. Os dados estão representados pela média $\pm$ desvio padrão. As letras e símbolos representam os valores positivos para as diferenças de médias e os valores significativos para o câncer. β -pT2 vs pT1, pT3, pT4, NEG, Sel com $p < 0,001$, C - pT2 vs HPB, $p < 0,05$; α - pT4 vs outros grupos com $p < 0,001$. O teste estatístico utilizado foi ANOVA um critério, com pós teste de correção de Bonferroni, feito pelo software GraphPad Prisma versão 4.0.

Como pode ser observado nas Figuras 8-10, os fagos foram separados em painéis de acordo com a semelhança química do aminoácido. Nestas figuras, todos os clones que apresentaram o motivo FPWL foram significativamente reativos para IgG do soro de pacientes com câncer de próstata, especialmente para os estádios pT1 e pT2, quando comparada a outros grupos com o valor de p variando de 0,05 a 0,001.

Embora muitos clones tenham apresentado diferença significativa em favor de tumor do estádio pT2, dois (NPVFPWL e HALFPWL) clones não mostram diferença significativa quando foram comparados ao pT1. Em contraste, os clones TSRLGHL e LGAPFSR mostraram reatividade significativa apenas com os estádios pT2 e pT4, respectivamente, enquanto os clones PSPASSF e PPSSRPS demonstraram

baixa reatividade para todos os grupos (Figura 10) e nenhum fago foi encontrado para o estadiamento pT3 apesar de alguns clones terem sido selecionados durante o bioppaning.

4.2.6 Bioinformática

Com intuito de identificar uma região conservada ou um motivo comum nos peptídeos selecionados, realizou-se o múltiplo alinhamento pelo programa *clustal w* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). O programa possibilitou, também, a formulação de um consenso, criando uma sequência peptídica (Tabela V).

Tabela V . Alinhamento dos peptídeos selecionados pelo Programa clustalW.

Clones	Alinhamento pelo clustal W
pT1.5; pT2.6; pT3.9	---LFPWLSS
pT1.5	---LFPWLGS
pT1.10	-SPIFPWL--
pT1.6; pT2.7; pT3.9	-SSI ~~F~~ PWL--
pT1.11; pT2.11; pT3.6	-SPLFPWL--
pT1.1	-SVLFPWL--
pT2.12	-SALFPWL--
pT2.13	-HALFPWL--
pT1.14	---LFPWLPG
pT2.9	---LFPWL ~~P~~ D
pT1.12	-NPVFPWL--
pT1.11; pT2.5; pT3.7	-NLLFPWL--
pT4.15	-TS ~~R~~ LGHL--
pT1.4	LGAPFSR---
Consenso	-S+LFPWLPS

Para a identificação de possíveis epítomos lineares foi realizada uma busca no *BLAST* (*blastp*), utilizando a sequência consenso de peptídeo gerado pelo programa *clustal w* e o banco de dados de sequências de proteínas *Swissprot*, restrito a proteínas

humanas. As proteínas que se alinharam foram submetidas ao ensaio *in silico* *Bepipred* de predição de epítomos antigênicos lineares, com o objetivo de saber se as regiões alinhadas correspondiam às regiões preditas, ou seja, regiões que por método matemático poderiam gerar a produção de anticorpos. A última coluna da Tabela VI mostra as regiões de prováveis epítomos antigênicos lineares dos peptídeos selecionados alinhado com a proteína.

Tabela VI Alinhamento das seqüências consenso dos peptídeos selecionados, mostrando as similaridades encontradas com as proteínas anotadas no banco de dados do *GeneBank* pelo *BLAST*, com os números de acesso no *Swissprot*, e sua regiões de prováveis epítomos antigênicos lineares feita de acordo com o programa *Bepipred*.

Peptídeo consenso	Alvos Potenciais	Swissprot	Alinhamento	E Value	Provável região antigênica
S+LFPW LPS	HERV-R(b)_3p24.3 provirus ancestral Env polyprotein	P60509	Query 1 S--LFPWLPS 9 SL+PWLPS Sbjct274 SPNLWPWLPS 283	18	276 a 283
	HERV-H_19p13.11 provirus ancestral Env polyprotein	P61549	Query 1 SLFPWLPS 8 SL PWLPS Sbjct 223 SLHPWLPS 230	5.5	228-230
	HERV-H_2q24.1 provirus ancestral Env polyprotein	Q9N2J8	Query 1 SLFPWLPS 8 SL PWLPS Sbjct 237 SLHPWLPS 244	5.5	242-244

Como pode ser observado pela Tabela VI, o peptídeo consenso mostrou similaridade com as proteínas retrovirais e o seu alinhamento apresentou como uma possível região antigênica avaliado pelo programa *Bepipred*.

4.2.7 Screening dos Fagos Escolhidos com Soros individuais

Para analisar o comportamento dos fagos individuais, bem como testar a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo risco relativo (VPP E VPN), e *odds ratio*, testou os clones (SPLFPWL, LFPWLGS, NLLFPWL) que apresentavam um motivo em comum. Para o teste de ELISA foram comparados 22 pacientes com CaP, 22 pacientes com HPB e 21 pacientes negativos. Dos 22 pacientes com câncer, 4 pacientes analisados apresentavam, neoplasia intra-epitelial prostática (NIP)

A Tabela VII demonstra o número de pacientes que apresentaram Índice ELISA (I.E) maior que 1 (pacientes positivos par o teste) para os 3 clones e se houve diferença significativa para o teste de Fisher:

Tabela VII .Frequência de pacientes positivos para o teste de ELISA sobre o valor total de pacientes diagnosticado nos três clones.

	SPLFPWL*	LFPWLGS	NLLFWL+
	(Positivo/ total)	(Positivo/ total)	(Positivo/ total)
CaP	5/22	5/22	5/22
CaP NIP	3/ 4	2/4	3/ 4
HPB	2/22	4/22	0/22
NEG	0/21	0/21	1/21

*valor de $p < 0.04$; +valor de $p < 0.02$ para o teste de Fisher tanto para o CaP geral como CaP NIP

Para o teste de sensibilidade, os clones apresentaram a mesma porcentagem de 23%, porém a especificidade bem como o risco relativo, *odds ratio*, VPP, VPN. Porém ao calcular os dados de sensibilidade, especificidade, *odds ratio*, risco relativo, VPP e VPN, para o caso de câncer associado à NIP, o fago LFPWLGS diferenciou nos resultados como mostra a Tabela VIII.

Tabela VIII- Comparação de dados estatísticos epidemiológicos entre o CaP geral e CaP associado ao NIP

	SPLFPWL* (CaP geral/ CaP NIP)	LFPWLGS (CaP geral/ CaP NIP)	NLLFWL+ (CaP geral/ CaP NIP)
Risco relativo	2,44/10,2	1,9/3,4	2,84/10,2
Odds ratio	6,03/24	3,01/5,0	12,1/24
Sensibilidade	23%/75%	23%/50%	23%/75%
Especificidade	95%/98%	91%/83%	98%/98%
VPP	71%/60%	56%/40%	83%/60%
VPN	71%/94,1%	71%/88%	71%/94,1%

*valor de $p < 0.04$; +valor de $p < 0.02$ para o teste de Fisher tanto para o CaP geral como CaP NIP

Valores gerados pelo programa Prisma cálculo de Contingência

4.3 Padronização da Plataforma Biotecnológica

4.3.1 Quantificação dos Beads na Câmara de Neubauer e Teste de beads ELISA para a certificação do acoplamento

Após a seleção do fago ligante a IgG de pacientes com câncer de próstata, acoplou o fago na microesfera de grupamento epóxi para o desenvolvimento de uma nova plataforma de diagnóstico. Para verificar se houve perda de microesferas durante o acoplamento e as lavagens, as mesmas foram contadas pela câmara de Neubauer, visto que os *beads* possuem um tamanho semelhante a uma célula (2,8 μm). A Tabela IX mostra quantificação das microesferas.

Tabela IX. Quantificação dos *beads* em Câmara de Neubauer.

<i>Beads</i> - BSA	Unidades /ml	<i>Beads</i> - fago	Unidades/ ml	<i>Beads</i> - sel	Unidades/ ml
1°	2,75x 10 ⁷	1°	1,49 x 10 ⁷	1°	2,58 x 10 ⁷
2°	2,53x 10 ⁷	2°	1,9 x 10 ⁷	2°	1,15 x 10 ⁷
3°	2,3 x 10 ⁷	3°	2,13 x 10 ⁷	3°	1,65 x 10 ⁷
4°	2,53x 10 ⁷	4°	2,3 x 10 ⁷	4°	2,53 x 10 ⁷
5°	2,65x 10 ⁷	5°	2,33 x 10 ⁷	5°	2,30 x 10 ⁷

Os dados apresentados pela Tabela IX mostram que não houve perda relevante entre os diferentes alvos acoplados (BSA, fago selecionado e selvagem) e nem entre os diferentes tampões.

Para analisar se os fagos foram acoplados ao *beads*, foi feito um teste de *beads*-ELISA. Conforme observado na Figura 11, houve uma diferença significativa ($p < 0,001$) entre a absorbância média do fago acoplado no *beads* quando comparado com o *beads* controle (BSA), porém, não foi observada nenhuma diferença significativa entre os diferentes tampões.

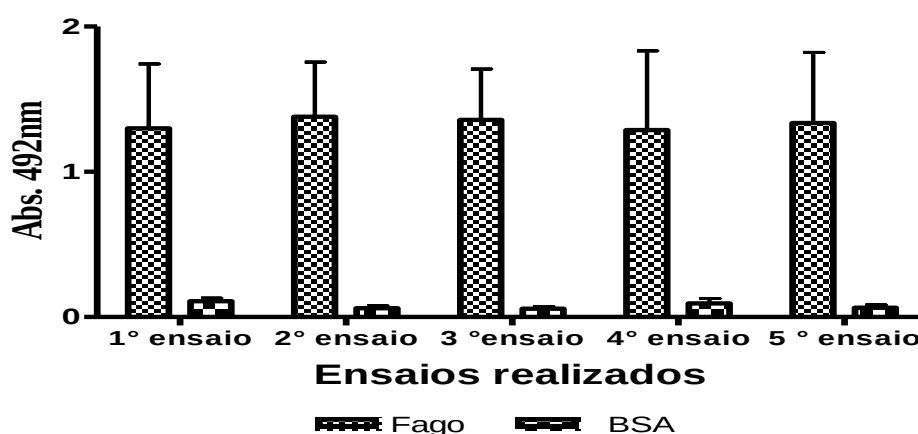


Figura 10. Ensaio de *beads*-ELISA, com fagos e BSA acoplado na microesfera. O eixo Y representa a leitura média da absorbância a 492nm e no eixo X apresentam os diferentes ensaios de acoplamento. Colunas representam a média ($n = 6$); barras mostram o desvio-padrão. O teste estatístico ANOVA dois ou mais critérios, com pós teste de correção de Bonferroni, mostra a diferença estatística de $p < 0,001$ entre o fago acoplado e o controle.

4.3.3 Teste de bloqueio da pIII

Com a certificação do acoplamento dos fagos aos *beads*, realizou-se uma titulação destes para verificar se ocorria o bloqueio da região da pIII do fago, região onde está inserido o mimetopo. Como pode ser observado pela Figura 12, houve a formação de colônias azuis, demonstrando que a proteína III do fago não se encontra bloqueada.

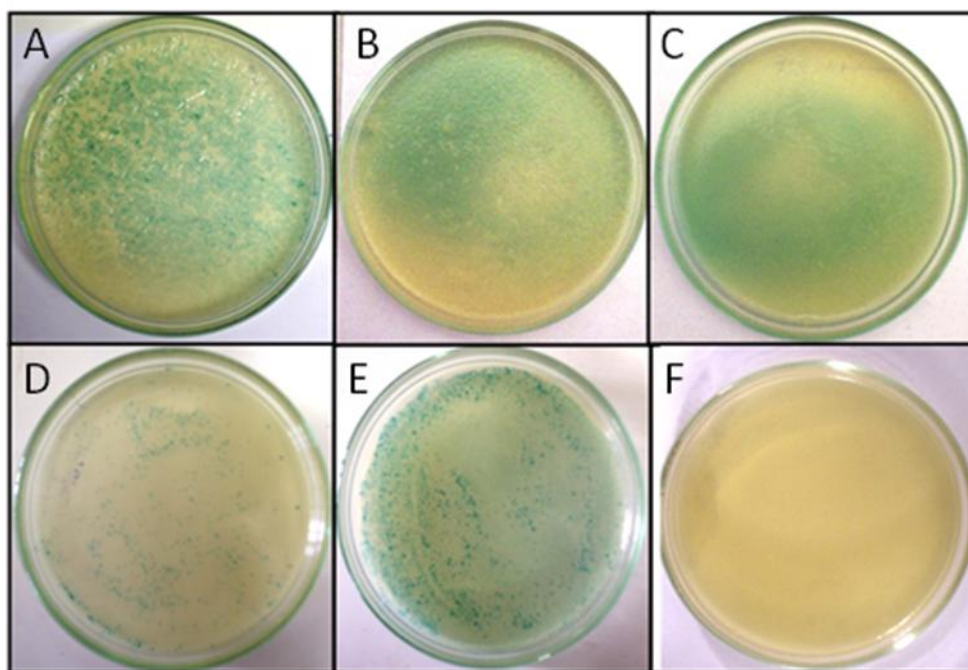


Figura 11. Teste de bloqueio da pIII . Formação de colônias azuis mostra a capacidade infectiva do fago na bactéria. Letras representam as titulações dos fagos acoplados no *beads* na diluição a 10^{-2} em diferentes tampões. A - fago acoplado no tampão sulfato de amônio 3M pH 7,4 e fosfato de sódio 0,1M pH 7,4 na proporção 1:1(ensaio 1), B- fago acoplado no tampão sulfato de amônio 3M pH 7,4 (ensaio 2), C - fago acoplado no tampão sulfato de amônio 3M pH 7,4 e fosfato de sódio 1,2 M pH 10,2 na proporção 3:1 (ensaio 3), D - fago acoplado no tampão fosfato de sódio 1,2 M pH 10,2 (ensaio 4), E- fago acoplado no tampão sulfato de amônio 3M pH 7,4 e fosfato de sódio 0,1M pH 7,4 na proporção 3:1, F- Controle da reação.

Quando se compara as placas dos diferentes ensaios verifica-se que ocorre uma maior formação de colônias nos ensaios 1, 2, 3 e 5 (Figuras 12A, B, C, E), demonstrando que o 4º ensaio, não seja adequado para o acoplamento de fago, visto que houve menor formação de colônias (Figura 12D). A Figura 12F representa o ensaio controle, indicando que os *beads* acoplados ao BSA não apresentam poder de infectividade ou contaminação.

A identificação de antígenos tumorais, que eliciam a produção de anticorpos a partir da resposta imune, pode ser útil na detecção do câncer bem como em imunoterapia (HANASH, 2003). Muitos pesquisadores têm verificado que pacientes com câncer podem produzir autoanticorpos (SAHIN et al, 1995; CHEN et al, 1998; STOCKERT et al, 1998; BRICHORY et al, 2001, MINENKOVA, 2003), e atualmente, há um crescente entusiasmo para a aplicação de técnicas proteômicas para a identificação de marcadores biológicos na fase inicial da doença, além do desenvolvimento de plataformas para diagnóstico não invasivo do câncer e monitoramento da progressão do tumor (CASIANO et al, 2006)

Com o intuito de encontrar novos alvos reativos ao sistema imune, este estudo propôs a identificação de antígenos tumorais a partir de autoanticorpos em pacientes de câncer de próstata de diferentes estádios através da técnica de *Phage Display*. Além disso, padronizou-se o acoplamento dos peptídeos antigênico, expresso em fagos, em microesfera de grupamento epóxi para o desenvolvimento de plataforma de imuno-ensaio enzimático baseado em micropartículas.

A seleção de epítomos miméticos ao adenocarcinoma foi feita utilizando uma biblioteca conformacional de peptídeos de sete aminoácidos (*New England Biolabs*, Ph.D.-C7C). Escolheu-se essa biblioteca porque se supõe que o reconhecimento das IgGs de CaP por peptídeos conformacionais seria melhor do que peptídeos lineares. Pesquisas têm demonstrado que peptídeos, que incorporam algumas características conformacionais, têm implicações importantes no desenvolvimento de vacinas e no reconhecimento dos anticorpos (DAKAPPAGARI et al, 2005; SUNDARAM et al, 2004). Bukawa H et al 1995 e Cabezas et al. 2000 investigaram o uso de epítomos conformacionais do vírus de imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) para estudar as respostas dos anticorpos específicas ao vírus. Eles demonstraram que a conformação do peptídeo V3 e V5 da glicoproteína gp120 foram capazes de provocar uma resposta imune, diferentemente do epítomo linear. Além disso, apenas os peptídeos com loops obtiveram anticorpos neutralizadores de vírus em coelhos vacinados.

O *panning* em fase de solução em partículas magnéticas de proteína G foi a escolha do procedimento metodológico e a plataforma, a qual foi dividido em dois passos: o acoplamento dos anticorpos e a seleção de peptídeos.

A captura de IgG pela microesfera mostrou-se eficiente visto que houve alta absorvância apresentada pelo reconhecimento do anti-IgG aos anticorpos acoplado no *beads*, comparado ao controle (reconhecimento do anticorpo irrelevante ao IgG-*beads*). Além disso, a baixa absorvância do controle mostra a eficiência do bloqueio, garantindo uma boa seleção de mimetótipos de câncer de próstata. A escolha do *beads* proteína-G como plataforma foi devido à correta orientação, que a proteína-G, favorece ao anticorpo, potencializando o seu uso (HÄRMÄ et al, 2000), da baixa ligação inespecífica e baixa contaminação das micropartículas (WHITEAKER et al, 2007), além da diminuição do impedimento estérico entre o anticorpo e o antígeno (KIM et al, 2009), quando se compara às seleções feitas em placas de poliestireno.

Já para a *panning*, utilizou-se a estratégia de seleção negativa para aumentar a seleção de peptídeos ligantes a IgG associado ao tumor. Este tipo de seleção, já tem sido desenvolvido por Mikhail Popkov et al. 2004, com o objetivo de remover a reação cruzada com antígenos de clones comuns em *Phage Display*, em pesquisas de neurônios de rato (HOU et al, 2004), de carcinoma hepatocelular metastática (JIA, 2006) e de câncer de próstata (MINTZ et al, 2003).

Durante os ciclos de seleção, verificou-se o aumento esperado do título de fago, já que os clones, que apresentam maior imuno-afinidade, ficaram retidos aos anticorpos para subsequente eluição e amplificação para o ciclo seguinte, enquanto que os fagos com baixa ou sem afinidade aos anticorpos são lavados e removidos. Apesar da maioria dos fagos com baixa afinidade serem removidos durante as lavagens dos ciclos, o excesso de anticorpo presente no *beads* e o excesso de fagos podem favorecer a ligação inespecífica, ou ainda esses clones podem interagir diretamente com a microesfera, sendo necessário o aumento da estrigência (*Tween-20*), o qual variou de 0,1 a 1%.

O resultado de *Beads-ELISA* mostrou que o enriquecimento dos pools de fagos específicos do terceiro e quarto ciclo do *panning* exibiram ligação significativa a IgG do câncer, quando comparados com o pool de fago do primeiro e segundo ciclo. Este

enriquecimento sugere alta reatividade de ligação e consequentemente o sucesso do *panning*. McCafferty, 1996, relatou que dois fatores, a afinidade e o nível de exibição, afetam diretamente a eficiência da seleção. A existência de ligantes que expõe peptídeos com grande afinidade em biblioteca de *Phage Display* melhora seu enriquecimento mesmo se o nível de exposição seja baixo.

No ensaio de *Phage*-ELISA, dos 16 fagos selecionados no ELISA pré-validação, 14 clones apresentavam alta afinidade de ligação especificamente com IgG de CaP. Desses 14, 12 peptídeos continham aminoácidos análogos e exibiam imuno-reatividade similares, isto é, estes clones eram reconhecidos especificamente pelos anticorpos presentes no estadiamento tumoral pT1 e pT2, sugerindo que o motivo compartilhado FPWL mimetizam a mesma região da proteína. Além disso, a não reatividade dos PSPASSF e PPSSRPS reforça a idéia de que o motivo foi realmente selecionado positivamente. Interessantemente, para o estágio pT3 nenhum clone foi reconhecido, enquanto que para o estágio pT4, o clone LGAPFSR exibiu reatividade exclusiva. A importância de selecionar alvos tumorais em diferentes estágios é que esses alvos ajudariam a determinar o melhor tratamento, bem como o prognóstico (CHO-CHUNG, 2006). Além disso, a detecção precoce, com estágio I e II, em câncer de próstata, continua a ser a abordagem mais promissora para melhorar a sobrevivência em longo prazo dos pacientes com câncer (OTT et al, 2009).

O uso da metodologia de *Phage Display* para encontrar alvos ou ligantes tumorais tem tido resultados promissores entre os pesquisadores. Zhong et al (2008), verificou que a combinação de três tipos de peptídeos expressos pelos fagos apresentavam 80% de sensibilidade e 100% especificidade na predição do estado da amostra, enquanto o cada um separadamente prediziam 77,0% de sensibilidade e especificidade de 82,8% entre 87 amostras de pacientes e 87 amostras de controle. Tong et al (2008) encontrou fagos ligantes a autoanticorpos em cacinoma e Ran et al (2008) relatou que auto-anticorpos contra antígenos expressos *phage*-derivadas de tecidos de câncer poderiam ser utilizados como marcadores do soro para detecção de câncer de cólon.

Uma abordagem alternativa para a identificação de ligantes e de identificação de alvos em potencial através de programas de bioinformática é a busca de seqüências

consenso entre os clones selecionados. Pelo programa *clustal w* foi encontrado um consenso (S+LFPWLPS) que continham tanto o motivo como a presença de alguns aminoácidos presentes em outros fagos mais não na maioria. O consenso compartilha similaridade de sequência com uma variedade de proteínas humanas, especialmente com as proteínas de retrovírus endógenos humanos (HERV-provírus poliproteínas Env ancestral), já que houve repetição de subtipos do endovírus no alinhamento e do total de 8 aminoácido do consenso, 7 são alinhado.

Muitos estudos têm mostrado a relação entre o vírus e o câncer, por exemplo, as proteínas E6 e E7 de papilomavírus humano oncogênico (HPV) se ligam e inativam proteínas celulares supressor de tumor (PAGANO, et al 2004). Em outros casos, os vírus podem indiretamente causar câncer induzindo a destruição crônica de compensação e substituição de células, como Hepatite B e vírus C, que podem criar um ambiente celular inflamatória, onde produzem numerosas substâncias oxidantes com potencial de causar dano celular ou genoma da célula (MÜNGER, HOWLEY, 2002; KLEIN, 2008). Devido a isso, o vírus pode ser candidato para marcador sorológico, ou agente etiológico do câncer de próstata.

As proteínas com seqüências compartilhadas com retrovírus endógeno humano (HERV) são muito interessantes, já que relacionam com a etiologia da CaP e outros cânceres, como os de ovário (WANG-JOHANNING et al, 2006), de mama (WANG-JOHANNING et al, 2001), testicular (GOEDERT et al, 1999) , câncer gastrointestinal (WENTZENSEN et al, 2007) . Retrovírus endógeno humano (HERVs) são descendentes de retrovírus exógenos que se tornaram genes celulares pela integração as células da linhagem germinal (LEIB-MOSCH, 1990). Embora se tenha verificado que os genomas HERV geralmente estão com defeito, eles representam um reservatório de genes virais que podem ser ativados de forma espontânea, por eventos de recombinação, ou pela radiação e agentes químicos. A função biológica dos retrovírus humanos relacionados com seqüências permanece desconhecida, mas há especulações de que eles desempenham papel na carcinogênese, autoimunidade, e imunossupressão em seres humanos (BOESE et al, 2000; TAMURA et al 1994; KERSHAW et al, 2001; YANG; PERRY-LALLEY, 2000; MANGENEY et al, 2001).

No caso da relação entre o desenvolvimento do câncer e os retrovirus endógenos, os HERVs podem produzir partículas retrovirais competentes para a replicação, os quais são capazes de formar novas inserções proviral que induzem tumores por mutagênese de inserção (ou seja, integração de provírus com seus potentes elementos promotores e potenciadores próximo a um protooncogene), ou que promovam o crescimento do tumor por imunossupressão. Especialmente, neste último caso, a expressão dos antígenos em células tumorais podem provocar uma resposta imunológica antitumoral envolvendo, entre outros, os anticorpos e células T citotóxicas (CTL). Idealmente, as respostas imunes antitumorais resultam na eliminação das células cancerosas. No entanto, a expressão das proteínas imunossupressoras do envelope de retrovirus endógenos nas células do tumor pode levar a um aumento da população de células T reguladoras (Treg), promovendo a supressão da atividade antitumoral de células citotóxicas, o que leva à fuga de células tumorais da imunovigilância (escape do tumor) e conseqüentemente invasões do crescimento do câncer. (RUPRECHT et al 2008). Além disso, verificou-se também que RNAsel defectivo pode permitir maior infecção viral já que este gene é efetor de resposta inata via interferon gama, via degradação de partículas virais e apoptose celular (URISMAN et al, 2006).

Em concordância a bioinformática, a baixa sensibilidade dos fagos SPLFPWL, LFPWLGS, NLLFWL aos pacientes individuais com CaP em geral já era esperada, visto que, a associação entre o desenvolvimento do tumor e o vírus é também pequena. De acordo com os resultados da pesquisa de Wang-Johanning et al (2006) verificou-se que somente 55% dos pacientes com câncer de ovário apresentaram títulos positivos para o anticorpo contra a proteína de superfície HERV-K, 40% foram positivo para o anti-HERV-E e 30% foram positivos para anticorpos contra EV3. Já o trabalho de Ishida et al (2008) mostrou que a proteína NGO-Pr-54, homólogo ao HERV-K, identificado pela metodologia de SEREX, apresentou resposta imune de somente de 5,1% em pacientes com câncer de bexiga, 4,1% em câncer de fígado, 3,4% em câncer de pulmão, 5,6% em câncer de ovário e 4,2% em câncer de próstata. Apesar de a resposta humoral ser baixa, a importância do estudo da associação entre o vírus e o desenvolvimento do tumor está na busca de novas etiologias ou no reforço das pesquisas já existentes sobre infecção e câncer. No entanto, ao relacionar a sensibilidade

dos fagos com o câncer de próstata associado à neoplasia intra-epitelial prostática, verifica-se que a sensibilidade sobe para 50% a 75%, reforçando a hipótese que a infecção por vírus pode levar a inflamação e consequentemente o desenvolvimento do tumor. Klein et al (2008) relatou que as infecções podem levar a inflamação crônica, e estas gerarem espécies reativas a oxigênio (ROS), o que lesa as células e promove a atrofia inflamatória proliferativa (AIP) e a neoplasia intra-epitelial prostática (NIP). A hiperproliferação, e as rápidas divisões podem levar ao acúmulo de mutações, promovendo o aparecimento do tumor.

Mediante disso, verifica-se que existem muitas etiologias para o câncer de próstata, e o desenvolvimento de biomarcadores associado a plataformas eficientes de diagnóstico torna-se necessário. Com relação ao desenvolvimento de plataformas de detecção, os imunoenaios são extremamente vitais para diagnósticos clínicos, análises ambientais e estudos bioquímicos.

No diagnóstico clínico, existe uma demanda para a análise rápida que auxilie no diagnóstico preciso e tratamento da doença de um paciente ou condições do prejuízo. Atualmente, imunoenaios enzimáticos (ELISA), realizado em placa de microtitulação é a técnica mais comum utilizada para os imunoenaios. No entanto, com a demanda por menor tempo de análise, menor volume de amostra e maior sensibilidade, outras técnicas estão sendo exploradas para executar imunoenaios (LIMA et al, 2007).

Neste ponto, os sistemas de diagnósticos baseado em *beads* oferecem alternativa atrativa para detecção de auto-anticorpos em soro humano, quando estes são acoplados com epitopo antigênico (KOURILOV, STEINITZ, 2002).

No teste *Beads*-ELISA para a verificação do acoplamento do fago nos *beads* houve uma diferença significativa entre o controle e o fago acoplado nos diversos tampões, certificando-se a imobilização do clone selecionado a microesfera, mas a não observação de diferença de acoplamento entre os tampões, permite analisar que por esse teste não é possível avaliar o melhor tampão. De modo geral, imobilização dos alvos é dependente da superfície da estrutura da partícula, bem como das condições da solução tais como pH, temperatura, estringência iônica e outros (KAWAGUCHI, 2000).

Para o teste de bloqueio da pIII, verificou-se que a formação de colônia azul permite concluir que a ligação do n-terminal do fago com o grupamento epóxi, não ocorre via pIII, mas com maior probabilidade pela via da pVIII. A região da pIII contém três domínios (N1, N2, CT), sendo que N1 e N2 (n-terminal) estão envolvidos com a infecção do vírus na Ecoli ER2738 e o do CT na estabilidade do fago. Assim, o bloqueio da pIII, via reação com o grupamento epóxi, seria prejudicial no desenvolvimento de diagnóstico via microesfera, visto que é nessa região é que se encontra o epítipo mimético às regiões antigênicas do câncer.

Ao se comparar as placas dos diferentes ensaios, pode-se verificar que o ensaio 4 foi a placa que menor produziu colônias azuis, sugerindo que esse tampão não seja adequado para esse tipo de acoplamento. Apesar de ser o tampão mais básico, visto que imobilização de pequenas moléculas em grupamentos epóxi ativados é geralmente acompanhada de valores alto de pH, de 9 a 11, devido ao desprotonamento do grupo amino (WHEATLEY, SCHMIDT, 1999), a menor concentração salina durante o acoplamento (outros tampões apresentaram uma molaridade salina superior a 1,5), pode ter influenciado, haja vista que alta molaridade salina concentra grupos nucleofílicos da molécula perto dos sítios ativos do grupamento epóxi do suporte (WHEATLEY, 1991; WHEATLEY, et al., 1996).

6. CONCLUSÕES

Os resultados da seleção e caracterização de peptídeos em diferentes estadiamentos clínico-patológicos do câncer de próstata permitiram concluir que:

- Por meio da tecnologia de *Phage Display* foi possível selecionar peptídeos imunorreativos contra os anticorpos circulantes em pacientes com câncer de próstata em diferentes estadiamentos, apresentando baixa reação cruzada com outras IgGs tais como HPB e controles saudáveis.
- Foi possível encontrar peptídeos especificamente para o estadiamento do tumor precoce (pT1 e pT2) e para a fase avançada do tumor pT4, sendo que nenhum peptídeo foi relevante para o estadiamento pT3.
- A semelhança entre o peptídeo consenso e as proteínas do capsídeo viral HERVs fornecida pela bioinformática, sugere que o endovírus humano poderia estar envolvido na etiologia do câncer, e por conseguinte, ser um provável marcador tumoral ou ser utilizado em vacina de peptídeos, já que o HERVs são de interesse como o potencial patógeno indutor da doença.
- A identificação dos fagos com a associação do câncer de próstata com NIP possibilita a reafirmar as hipóteses que, através de infecções ocorre processos inflamatórios que podem estar envolvidos no desenvolvimento do tumor. Mas será importante avaliar a reatividade dos peptídeos selecionados com maior número de pacientes com CaP, e incluir nas análises outras doenças como a prostatite, doenças auto-imunes, e outros câncer.
- Paralelamente, o desenvolvimento de uma nova plataforma que utiliza microesferas magnéticas e peptídeos expressos pela pIII do fago, permite um menor tempo do diagnóstico e um menor custo.

7. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. Imunidade contra tumores. In:_____.
Imunologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Elsevier. Cap. 17, p. 401-421, 2005

ARAGÃO, A. J. O exame físico na avaliação do câncer de próstata. In:
WROCLAWSKI, E. R.; BENDHACK, D. A.; DAMIÃO, R.; ORTIZ, V. **Guia Prático
de Urologia. São Paulo: Segmento**. cap. 130, p. 437-438, 2003.

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. New York. v. 8 n. 2 p. 121-127. Fev. 2002.

AVRAMIS, V. I.; AVRAMIS, E. V.; HUNTER, W.; LONG, M. C. Immunogenicity of
Native or Pegylated *E. coli* and *Erwinia* Asparaginases Assessed by ELISA and Surface
Plasmon Resonance (SPR-Biacore) Assays of IgG Antibodies (Ab) in Sera from
Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). **Anticancer Research**. Attiki. v.
29. n. 1. p. 299-302. Jan. 2009.

AZZAY, H. M. E.; HIGHSMITH, W. E. *Phage display technology: clinical
applications and recent innovations*. **Clin Biochem**, Canada. v.35. n. 6. p.425-445, Set.
2002.

BANEZ, L. L.; P. PRASANNA, L. SUN, A. ALI, Z. ZOU, B.L. ADAM, D.G.
MCLEOD, J.W. MOUL, S. SRIVASTAVA. Diagnostic potential of serum proteomic
patterns in prostate cancer. **Journal of Urology**. Hagerstown. v. 170. n. p. 442-446.
Ago. 2003.

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

BAZHIN, A. V.; SAVCHENKO, M. S.; SHIFRIN, O. N.; DEMOURA, S.A.;
CHIKINA, S. Y.; JAQUES, G.; KOGAN, E. A.; CHUCHALIN, A. G.; PHILIPPOV,

- P.P. Recoverin as a paraneoplastic antigen in lung cancer: the occurrence of anti-recoverin autoantibodies in sera and recoverin in tumors. **Lung Cancer**. Oxford. v. 44. p. 193-198. Maio. 2004.
- BOESE, A.; SAUTER, M.; GALLI, U.; BEST, B.; HERBST, H.; MAYER, J.; KREMMER, E.; ROEMER, K.; MUELLER-LANTZSCH N. Human endogenous retrovirus protein cORF supports cell transformation and associates with the promyelocytic leukemia zinc finger protein. **Oncogene**. Basingstoke. v. 19. n. 38. p. 4328–4336. Set. 2000.
- BOK, R. A.; SMALL, E. J. Bloodborne biomolecular Markers in prostate cancer development and progression. **Nature Reviews Cancer**. London. v. 2, n. 12. p. 918-926, Dez. 2002.
- BOSTWICK, D. G. Prostatic intraepithelial neoplasia. In: KAISARY, A. V., MURPHY, G. P., DENIS, L., GRIFFITHS, K. Textbook of prostate cancer: Pathology, Diagnosis and Treatment. London: Martin Dunitz, cap. 3, p. 35-50, 1999.
- 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**. Nova York. v. 24. n. 3. p. 237–242, Mai./Jun. 2006.
- BRAWLEY, O. W.; ANKERST, D. P.; THOMPSON, I. M. Screening for prostate cancer. **CA Cancer J. Clin**, Atlanta, v. 59, n. 3, p. 264-273, Maio/Jun. 2009.
- BRICHORY, F. M.; MISEK, D. E.; YIM, A. M.; KRAUSE, M. C.; GIORDANO, T. J.; BEER, D. G.; HANASH, S. M. An immune response manifested by the common occurrence of annexins I and II autoantibodies and high circulating levels of IL-6 in lung cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** Washington. v. 98. n. 17. p. 9824-9829. Ago. 2001.
- BUKAWA, H.; FUKUSHIMA, J.; HAMAJIMA, K.; KIMURA, M.; TSUJI, T.; XIN, K. Q.; OKUDA, K. Antibody responses raised against a conformational V3 loop

peptide of HIV-1. **Microbiology and immunology**. Tokyo. v. 39. n. 8. p. 607-614. 1995.

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. DD3:A new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. **Cancer Research**, Philadelphia. v. 59. n. 23. p. 5975-5979. Dez. 1999.

CABEZAS, E.; WANG, M.; PARREN, P. W.; STANFIELD, R. L.; SATTERTHWAIT, A. C. A structure-based approach to a synthetic vaccine for HIV-1. **Biochemistry**. Washington. v. 39. n. 47. p. 14377–14391. Nov. 2000.

CAMILO, R. L, **Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas de ferrita de cobalto recobertas por 3-aminopropiltriétoxissilano para uso como material híbrido em nanotecnologia**. São Paulo (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais)-Universidade de São Paulo, 2006. 187p.

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

CANELLE, L.; BOUSQUET, J.; PIONNEAU, C.; HARDOUIN, J.; CHOQUET-KASTYLEVSKY, G.; JOUBERT-CARON, R.; CARON, M. A proteomic approach to investigate potential bioMarkers directed against membrane-associated breast cancer proteins. **Electrophoresis**. Weinheim. v. 27. n. 8. p. 1609-1616. Abr. 2006.

CANELLE, L.; BOUSQUET, J.; PIONNEAU, C.; HARDOUIN, J.; CHOQUET-KASTYLEVSKY, G.; JOUBERT-CARON, R.; CARON, M. A proteomic approach to investigate potential bioMarkers directed against membrane-associated breast cancer proteins. **Electrophoresis**. Weinheim. v. 27. n. 8. P. 1609-1616. Abr. 2006.

CASIANO, C. A.; MEDIAVILLA-VARELA, M.; TAN, E. M.. Tumor-associated Antigen Arrays for the Serological Diagnosis of Cancer. **Molecular & Cellular Proteomics**. Bethesda. v. 5. n. 10. p. 1745-1759. Mai. 2006.

CASIANO, C.A.; MEDIAVILLA-VARELA, M.; TAN, E.M. Tumor-associated antigen arrays for the serological diagnosis of cancer. **Mol Cell Proteomics**, Nova York, v. 5, n.10. p. 1745-1759. Maio. 2006.

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

CATALONA, W.J.; ANTENOR, J.A.; ROEHL, K.A.; MOUL, J.W. Screening For Prostate Cancer In High Risk Populations. **The Journal Of Urology**. Baltimore. v. 168. n. 5. p. 1.980-1.984. Nov. 2002.

CAVARRETTA, I. T. R.; CULIG, Z.; KLOCKER, H.; EDER, I. E. Novel Experimental Therapeutic Approaches for Prostate Cancer. **EAU Update Series**. Canada. v. 3. n. 4. p. 227-239. Dez. 2005.

CHEN, Y.T.; GURE, A.O.; TSANG, S.; STOCKERT, E.; JÄGER, E. Identification of multiple cancer/testis antigens by allogeneic antibody screening of a melanoma cell line library. **Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.** Washington. v. 95. n. 12. p. 6919-23. Jun. 1998.

CHO-CHUNG, Y. S. Autoantibody biomarkers in the detection of cancer. **Biochim. Biophys. Acta**. Amsterdam. v. 1762. n. 6. p. 587-591. Jun. 2006.

CONRAD, F.; ZHU, X .; ZHANG, X.; CHALKLEY, R. J.; BURLINGAME, A. L.; MARKS, J. D.; LIU, B. Human antibodies targeting cell surface antigens overexpressed by the hormone refractory metastatic prostate cancer cells: ICAM-1 is a tumor antigen that mediates prostate cancer cell invasion. **Journal of Molecular Medicine**. Berlim. v. 87. n. 5. p. 507-514. Mai. 2009.

CONROY, P. J.; HEARTY, S.; LEONARD, P.; O’KENNEDY, R. J. Antibody production, design and use for biosensor-based applications. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. Amsterdam. v. 20. n. 1. p. 10–26. Fev. 2009.

- 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**. Philadelphia. v. 7. n. 9. p- 2802-2808. Set. 2001.
- COVINI, G.; VON MTIHLEN, C.A.; PACCHETTI, S.; COLOMBO, M.; GHAN, E. K. L. Diversity of antinuclear antibody responses in hepatocellular carcinoma. **J Hepatol**. New York. v. 26. n. 6. p.1255-1265. Jun. 1997.
- 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**, Weinheim. v. 30. n. 4. p. 403-408. Out. 1982.
- DAKAPPAGARI, N. K.; LUTE, K. D.; RAWALE, S.; STEELE, J. T.; ALLEN, S. D.; PHILLIPS, G.; REILLY, R. T.; KAUMAYA, P. T. P. Conformational HER-2/neu B-cell Epitope Peptide Vaccine Designed to Incorporate Two Native Disulfide Bonds Enhances Tumor Cell Binding and Antitumor. **Activities J. Biol. Chem.** Bethesda. v. 280. n. 1. p. 54 – 63. Jan. 2005.
- DE MARZO, A. M., PUTZI, M. J., NELSON, W. G. New concepts in the pathology of prostatic epithelial carcinogenesis. **Urology**. v. 57(Suppl. A4), p. 103-114. 2001.
- DENNIS, L. K.; DAWSON, D. V. Meta-analysis of measures of sexual activity and prostate cancer. **Epidemiology**. Philadelphia. v. 13. n. 1. p. 72–79. Jan. 2002.
- DISIS, M. L.; PUPA, S. M.; GRALOW, J. R.; DITTADI, R.; MENARD, S.; CHEEVER, M. A. High-titer HER-2/neu protein-specific antibody can be detected in patients with early-stage breast cancer. **J Clin Onco.**, Baltimore. v. 15. n. 11. p. 3363-3367. Nov. 1997.
- 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**. San Diego. v. 342. n. 3. p. 956-962. Abr. 2006.

DUNPHY, E. J.; JOHNSON, L.E.; OLSON, B.M.; FRYE, T.P.; MCNEEL, D.G. New approaches to identification of antigenic candidates for future prostate cancer immunotherapy. **Update on Cancer Therapeutics**. Canada. v. 1, n. 2, p. 273-284, Jun. 2006.

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

EISERICH, J. P.; HRISTOVA, M.; CROSS, C. E.; JONES, A. D.; FREEMAN, B. A.; HALLIWELL, B.; VLIET, A. V. D. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. **Nature**. Cambridge. v. 391. p. 393-397. Jan. 1998.

FERLAY, J.; AUTIER, P.; BONIOL, M.; HEANUE, M.; COLOMBET, M.; BOYLE, P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. **Ann Oncol**. Canada, v. 18, n. 3, p. 581–92, Fev. 2007.

FERRIEU-WEISBUCH, C.; MICHEL, S.; COLLOMB-CLERC, E.; POTHION, C.; DELEAGE, G.; JOLIVET-REYNAUD, C. Characterization of prostate-specific antigen binding peptides selected by *phage display* technology. **J Mol Recognit**. Chichester. v.19. n.1. p.10-20. Jan-Fev. 2006.

FINN, J. O. Cancer Immunology. **N England of J of Medicine**, Nova York. v. 358, n. 25, p. 2704-2715. Jun. 2008.

FORD, M. E.; HAVSTAD, S. L.; DEMERS, R.; JOHNSON, C. C.. Effects of false-positive prostate cancer screening results on subsequent prostate cancer screening behavior. **Cancer Epidemiol. BioMarkers Prev**. Philadelphia. v. 14. n. 1. p. 190-194. Jan. 2005.

FORRESTER, S.; QIU, J.; MANGOLD, L.; PARTIN, A.; MISEK, D.; PHINNEY, B.; WHITTEN, D.; ANDREWS, P.; DIAMANDIS, E.; OMENN, G. S.; HANASH, S.; HAAB, B. B. An experimental strategy for quantitative analysis of the humoral

immune response to prostate cancer antigens using natural protein microarrays. **Proteomics**. Weinheim. v. 1. n. 5. p. 494-505. Abr. 2007.

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.**, Heidelberg. v. 53. n. 5. p. 431-438. Jan. 2004.

GARCIA, M.; JEMAL, A.; WARD, E. M.; CENTER, M. M.; HAO, Y.; SIEGEL, R. L.; THUN, M. J.; **Global Cancer Facts & Figures 2007**. Atlanta, GA: American Cancer Society, 2007. Disponível em:<
http://www.cancer.org/downloads/STT/Global_Facts_and_Figures_2007_rev2.pdf>
 Acesso em: 20 Jan. 2010.

GATTAS, N. Genética e câncer de próstata. In: WROCLAWSKI, E. R.; BENDHACK, D. A.; DAMIAO, R.; ORTIZ, V. Guia Prático de Urologia. São Paulo: Segmento, cap. 128, p. 433-434, 2003.

GEHRING, A. G.; IRWIN, P. L.; REED, S. A.; TU, S. I.; ANDREOTTI, P. E.; AKHAVAN-TAFTI, H.; HANDLEY, R. S. Enzyme-linked immunomagnetic chemiluminescent detection of Escherichia coli O157: H7. **J. Immunol. Methods**. Amsterdam. v. 293. n. 1-2. p. 97-106. Out. 2004.

GIMBA, E. R. P.; BARCINSKI, M. A. Molecular aspects of prostate cancer: implications for future directions, **Int. braz j urol**. Rio de Janeiro. v. 29. n. 5. p. 401-411. Set./Out. 2003.

GOEDERT, J. J.; SAUTER, M. E.; JACOBSON, L. P.; VESSELLA, R. L.; HILGARTNER, M. W.; LEITMAN, S. F.; FRASER, M. C.; MUELLER-LANTZSCH, N. G. High Prevalence of Antibodies against HERV-K10 in Patients with Testicular Cancer but not with AIDS1. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev**. Philadelphia. v. 8. n. 4. p. 293-296. Nov. 1999.

- GUNDERSEN, S. G.; HAAGENSEN, I.; JONASSEN, T. O.; FIGENSCHAU, K. J.; DE JONGE, N.; DEELDER, A. M.. Magnetic *beads* antigen capture enzyme-linked immunoassay in microtitre trays for rapid detection of schistosomal circulating anodic antigen. **J. Immunol.Methods**. Amsterdam. v. 148. n.1-2. p. 1-8. Abr. 1992.
- HANAHAHAN D.; WEINBERG, R.A. The hallMarks of cancer. **Cell**, Nova York. v. 100, n. 1. p. 57-70. Jan. 2000.
- HANASH, S. Harnessing immunity for cancer marker discovery. **Nat Biotechnol**. New York. v. 21. n. 1. p. 37-38. Jan. 2003.
- HANSEN, M. H.; OSTENSTAD, B.; SIOUD, M. Antigen-specific IgG antibodies in stage IV long-time survival breast cancer patients. **Molecular Medicine**. Nova York. v. 7, n. 4, p. 230-239, Abr. 2001a.
- HANSEN, M. H.; OSTENSTAD, B.; SIOUD, M. Identification of immunogenic antigens using a *phage*-displayed cDNA library from an invasive ductal breast carcinoma tumor. **Int J Oncol**, Grecia. v. 19, n. 6, p. 1303-1309, Dez. 2001b.
- HÄRMÄ, H.; TARKKINEN, P.; SOUKKA, T.; LÖVGREN, T.; Miniature Single-Particle Immunoassay for Prostate-specific Antigen in Serum Using Recombinant Fab Fragments. **Clinical Chemistry**. Washington. v. 46. n. 1. p. 1755-1761. Nov. 2000.
- HAYES, R. B.; POTTERN, L. M.; STRICKLER, H.; RABKIN, C.; POPE, V.; SWANSON, G. M.; GREENBERG, R. S.; SCHOENBERG, J. B.; LIFF, J.; SCHWARTZ, A. G.; HOOVER, R. N.; FRAUMENI JR, J. F. Sexual behaviour, STDs and risks for prostate cancer. **Br. J. Cancer**. London. v. 82. n. 3 p. 718–725. Fev. 2000.
- HEKIM, C.; LEINONEN, J.; NARVANEN, A.; KOISTINEN, N.; ZHU, L.; KOIVUNEN, E.; VÄISÄNEN, V.; STENMAN, U. H. Novel Peptide Inhibitors of Human Kallikrein 2. **The Journal of Biological Chemistry**. Bethesda. v. 281. n. 18. p. 12555–12560. Mai. 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.** Bethesda. v. 277. n. 45. p. 43137-43142. Ago. 2002.

HOU, T. S.; DOVE, M.; ANDERSON, J. Z.; ZHANG, J.; MACKENZIE, C.; Identification of polypeptides with selective affinity to intact mouse cerebellar granule neurons from a random peptide-presenting *phage* library. **J. Neurosci. Methods.** Amsteram. v. 138. n. 1-2. p. 39-44. Set. 2004.

HOUGHTON, A.N.; GOLD, J.S.; BLACHER, N.E. Immunity against cancer: lessons learned from melanoma. **Current Opinion in Immunology.** New York. v. 13. p.134-140. Abril. 2001.

HSU, C. L.; CHEN, Y. L.; YEH, S.; TING, H. J.; HU, Y. C.; LIN, H.; WANG, X.; CHANG, C. The use of *phage display* technique for the isolation of androgen receptor interacting peptides with (F/W)XXL(F/W) and FXXLY new signature motifs. **J Biol Chem.** Bethesda. v. 278. n. 26. p. 23691-23698. Jun. 2003.

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,** San Diego. v. 341, n. 4, p. 964-972, Março. 2006.

Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. O câncer de próstata: consenso do Ministério Nacional da Saúde. Rio de Janeiro: INCA, Janeiro, 02, 2010.

Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata/definicao>> Acesso em: 07 de Janeiro de 2009.

INVITROGEN Dynabeads® Protein G. Disponível: <[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)>. Acesso em 20 de Jun. de 2008.

ISHIDA, T.; OBATA, Y., OHARA, N.; MATSUSHITA, H.; SATO, S.; UENAKA, A.; SAIKA, T.; MIYAMURA, T.; CHAYAMA, K.; NAKAMURA, Y.; WADA, H.; YAMASHITA, T.; MORISHIMA, T.; OLD, L.J.; NAKAYAMA, E. Identification of the HERV-K gag antigen in prostate cancer by SEREX using autologous patient serum and its immunogenicity. **Cancer Immun.** New York. v. 8. n. 15. p. 1-10. Nov. 2008.

JARMULOWICZ, M. R. The role of pathology in biopsy, diagnosis and management of prostate cancer. In: KAISARY, A. V., MURPHY, G. P., DENIS, L., GRIFFITHS, K. **Textbook of prostate cancer: Pathology, Diagnosis and Treatment.** London: Martin Dunitz, 1999.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; HAO, Y.; XU, J.; THUN, M. J. Cancer statistics. **CA Cancer J. Clin.** Atlanta, v. 59, n. 3, p. 225-249, Maio/Jun. 2009.

JIA, W. D.; SUN, H. C.; ZHANG, J. B.; XU, Y.; QIAN, Y. B.; PANG, Y. B.; WANG, L.; QIN, L. X.; LIU, Y. K. N.; TANG, Z. Y. A novel peptide that selectively binds highly metastatic hepatocellular carcinoma cell surface is related to invasion and metastasis. **Cancer Lett.** Irlanda. v. 247. n. 2. p. 234-242. Jun. 2006.

KARAN, D.; LIN, M. F.; JOHNSON, S. L.; BATRA, S. K. Current status of the molecular genetics of human prostatic adenocarcinomas. **Int J Cancer.** Nova York. v. 103. n. 3. p. 285-293. Jan. 2003.

KAWAGUCHI, H.; Functional polymer microspheres, **Prog. Polym. Sci.** Oxford. v. 25. n. 8. p-1171-1210. Out. 2000.

KELLY, K. A.; SETLUR, S. R.; ROSS, R.; ANBAZHAGAN, R.; WATERMAN, P.; RUBIN, M. A.; WEISSLEDER, R.. Detection of Early Prostate Cancer Using a Hepsin-Targeted Imaging Agent. **Cancer Research.** Philadelphia. v. 68. n. 7. p. 2286-2291. Abr. 2008.

KERSHAW, M. H.; HSU, C.; MONDESIRE, W.; PARKER, L. L.; WANG, G.; OVERWIJK, W. W.; LAPOINTE, R.; YANG, J. C.; WANG, R. F.; RESTIFO, N. P.;

- HWU, P. Immunization against endogenous retroviral tumor-associated antigens. **Cancer Res.** Philadelphia. v. 61. n. 21. p. 7920–7924. Nov. 2001.
- KIM, H. J.; AHN, K. C.; TECHERA, A. G.; SAPIENZA, G. G. G.; GEE, S. J.; HAMMOCKA, B. D. Magnetic *beads*-based *phage* anti-immunocomplex assay (PHAIA) for the detection of the urinary biomarker 3-phenoxybenzoic acid to assess human exposure to pyrethroid insecticides. **Analytical Biochemistry**. San Diego. v. 386. n. 1. p. 45-52. Mar. 2009.
- KLEIN, E. A.; SILVERMAN, R. Inflammation, infection, and prostate cancer. **Current Opinion in Urology**. London. v.18. n. 3. p. 315–319. Mai. 2008.
- KORNEEVA, I.; BONGIOVANNI, A.M.; GIROTRA, M.; CAPUTO, T.A.; WITKIN, S.S. Serum antibodies to the 27-kd heat shock protein in women with gynecologic cancers. **Am J Obstet Gynecol**, New York. v. 183. n. 1. p. 18-21. Julho. 2000.
- KOURILOV, V.; STEINITZ, M. Magnetic-*beads* enzyme-linked immunosorbent assay verifies adsorption of ligand and epitope accessibility. **Analytical biochemistry**. San Diego. v. 311. n. 2. p. 166-170. Dez. 2002.
- 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**. Nova York. v. 60, n. 3, p. 469-474, Set. 2002.
- LARSSON, A.; RONQUIST, G.; WULFING, C.; ELTZE, E.; BETTENDORF, O.; CARLSSON, L.; NILSSON, B.O.; SEMJONOW, A. Antiprostasome antibodies: possible serum Markers for prostate cancer metastasizing liability. **Urol Oncol**, Nova York. v. 24, n. 3, p. 195-200, Maio-Junho. 2006.
- LEIB-MOSCH, C.; BRACK-WERNER, R.; WERNER, T.; BACHMANN, M.; FAFF, O.; ERFLE, V.; HEHLMANN, R. Endogenous retroviral elements in human DNA. **Cancer Res.** Philadelphia. v. 50. n. 17. p. 5636s-5642s. Set. 1990.

- 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.
- LI, P. E.; NELSON, P. S. Prostate cancer genomics. **Cur. Urol Rep.** London. v. 2. n. 1. p. 70-78. Fev. 2001.
- LIMA, C. T.; ZHANG, Y. *Beads-based microfluidic immunoassays: The next generation.* **Biosensors and Bioelectronics.** Amsterdam. v. 22. n. 7. p. 1197-1204. Fev. 2007.
- 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**, Philadelphia v. 64. n. 2 p. 704–710. Jan. 2004.
- MADRID, F.F. Autoantibodies in breast cancer sera: candidate bioMarkers and reporters of tumorigenesis. **Cancer Letters**, Heidelberg. v. 230. n. 2. p. 187-198. Dez. 2005.
- MANGENEY, M.; DE PARSEVAL, N.; THOMAS, G.; HEIDMANN, T. The full-length envelope of an HERV-H human endogenous retrovirus has immunosuppressive properties. **J Gen Virol.** England. v. 82. n. 10. p. 2515–2518. Out. 2001.
- MCCAFFERTY, J. *Phage display: factors affecting panning efficiency.* In: B.K. Kay, J. Winter, J. McCafferty, (Eds), **Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual.** Academic Press Inc., San Diego, CA, 1996, pp. 261–276.
- MINENKOVA, O.; PUCCI, A.; PAVONI, E.; DE TOMASSI, A.; FORTUGNO, P.; GARGANO, N.; CIANFRIGLIA, M.; BARCA, S.; DE PLACIDO, S.; MARTIGNETTI, A.; FELICI, F.; CORTESE, R.; MONACI, P. Identification of tumor-associated antigens by screening *phage*-displayed human cDNA libraries with sera from tumor patients. **Int. J. Cancer.** New York. v. 106. n. 4. p. 534-44. Set. 2003.

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 Biotechnology**. Nova York. v. 21, n.1, p. 57-63. Jan. 2003.

MÜNGER, K.; HOWLEY, P. M. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. **Virus Res**. Irlanda. v. 89. n. 2. p. 213-228. Nov. 2002.

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

NWOSU, V.; CARPTEN, J.; TRENT, J. M.; SHERIDAN, R. Heterogeneity of genetic alterations in prostate cancer: evidence of the complex nature of the disease. **Human Molecular Genetics**. Oxford. v. 10 n. 20. p. 2313-2318. Out. 2001.

OHKUBO, S.; MIYADERA, K.; SUGIMOTO, Y.; MATSUO, K.; WIERZBA, K.; YAMADA, Y. Substrate *phage* as a tool to identify Novel substrate sequences of proteases. **Comb Chem High Throughput Screen**. Bussum. v. 4. n. 7. p. 573-83. Nov. 2001.

OTT, J. J.; ULLRICH, A.; MILLER, A. B. The importance of early symptom recognition in the context of early detection and cancer survival. **European Journal of Cancer**. Oxford. v. 45. n. 16. p. 2743-2748. Nov. 2009.

PAGANO, J. S.; BLASER, M.; BUENDIA, M. A.; DAMANIA, B.; KHALILI, K.; RAAB-TRAUB, N.; ROIZMAN, B. Infectious agents and cancer: criteria for a causal relation. **Semin. Cancer Biol**. Amsterdam. v. 14. n. 6. p. 453-471. Dez. 2004

- PASSARELLA, R. J.; ZHOU, L.; PHILLIPS, J. G.; WU, H.; HALLAHAN, D. E.; DIAZ, R. **Recombinant Peptides as BioMarkers for Tumor Response to Molecular Targeted Therapy. Clin Cancer Res. Philadelphia**, v. 15. n. 20. P. 6421-6429. Out. 2009.
- PATWA, T. H.; LI, C.; POISSON, L. M.; KIM, H. Y.; PAL, M.; GHOSH, D.; SIMEONE, D. M.; LUBMAN, D. M. The identification of phosphoglycerate kinase-1 and histone H4 autoantibodies in pancreatic cancer patient serum using a natural protein microarray. **Electrophoresis**. Weinheim. v. 30. n. 12. p. 2215 – 2226. Jun. 2009.
- PEULA-GARCIA, J. M.; MOLINA-BOLIVAR, J. A.; VELASCO, J.; ROJAS, A.; GALISTEO-GONZÁLEZ, F. Interaction of Bacterial Endotoxine (Lipopolysaccharide) with Latex Particles: Application to Latex Agglutination Immunoassays. **Journal of Colloid and Interface Science**. San Diego. v. 245. n. 2. p. 230–236. Jan. 2002.
- POPKOV, M.; RADER, C.; BARBAS, C. F. Isolation of human prostate cancer cell reactive antibodies using *phage* display technology. **Journal of Immunological Methods**. Amsterdam. v. 291. n. 1-2. p. 137-151. Ago. 2004.
- POPKOV, M.; SIDRAC-GHALI, S.; ALAKHOV, V.; MANDEVILLE, R. Epitope-specific antibody response to HT-1080 fibrosarcoma cells by mimotope immunization. **Clin Cancer Res**, Philadelphia. v. 6, n. 9, p. 3629-35, Set. 2000.
- PORKKA, K. P.; VISAKORPI, T. Molecular mechanisms of prostate cancer. **European Urology**. Nova York, v. 45. n. 6.; p. 683-691. Jun. 2004.
- RAN, Y.; HU, H.; ZHOU, Z.; YU, L.; SUN, L.; PAN, J.; LIU, J.; YANG, Z. Profiling Tumor-Associated Autoantibodies for the Detection of Colon Cancer. **Clin Cancer Res**. Philadelphia. v. 14. n. 9. p. 2696-700. Mai. 2008.
- ROMANOV, V. I.; DURAND, D. B.; PETRENKO, V. A. *Phage display* selection of peptides that affect prostate carcinoma cells attachment and invasion. **The Prostate**. New York. v. 47. n. 4. p. 239-251. Jun. 2001.

- RUPRECHT, K.; MAYER, J.; SAUTER, M.; ROEMER, K.; MUELLER-LANTZSCH N. Endogenous retroviruses and cancer. **Cellular and molecular life sciences**. Heidelberg. v. 65, n. 21, p. 3366-3382. Nov. 2008.
- SAHIN, U.; TURECI, O.; SCHMITT, H.; COCHLOVIUS, B.; JOHANNES, T.; SCHMITS, R.; STENNER, F.; LUO, G.; SCHOBERT, I.; PFREUNDSCHUH, M. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** Washington. v. 92. n. 25. p. 11810-11813. Dez. 1995.
- SCHEURLE, D.; DEYOUNG, M.P.; BINNINGER, D.M.; PAGE, H.; JAHANZEB, M.; NARAYANAN, R. Cancer gene discovery using digital differential display. **Cancer Res**, Philadelphia. v. 60, n. 15, p. 4037-4043. Ago. 2000.
- SREEKUMAR, A.; LAXMAN, B.; RHODES, D. R.; BHAGAVATHULA, S.; HARWOOD, J.; GIACHERIO, D.; GHOSH, D.; SANDA, M. G.; RUBIN, M. A.; CHINNAIYAN, A.M. Humoral immune response to alpha-methylacyl-CoA racemase and prostate cancer. **J Natl Cancer Inst**, Oxford. v. 96. n. 11. p. 834–843. Jun. 2004.
- STAMEY, T. A.; MCNEIL, J. E. Adenocarcinoma of the prostate. **Campbell's Urology**. 6 ed. Edited by Walsh P C; Retik AB Stamey T A; Vaughan Jr. E D. Philadelphia Saunders Co.; v. 2, p. 1.159-1.221, 1992.
- 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**. Oxford. v. 248. n. 1. p. 58-78. Abr. 1995.
- STOCKERT, E.; JAGER, E.; CHEN, Y. T.; SCANLAN, M. J.; GOUT, I.; KARBACH, J.; ARAND, M.; KNUTH, A.; OLD, L. J. A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens. **J. Exp. Med**. New York. v. 187. n. 8. p. 1349-54. Abri. 1998.
- STRAUSS, S. K; SCOOT, W. R. P; SYMMOUNS, M. F; MARVIN, D. A, On the structures of filamentous bacteriophage Ff (fd, f1, M13), **Eur Biophys J**, v. 37, p-521-527, 2007.

- SUNDARAM, R.; LYNCH, M .P.; RAWALE, S. V.; SUN, Y.; KAZANJI, M.; KAUMAYA, P. T. P. De Novo Design of Peptide Immunogens That Mimic the Coiled Coil Region of Human T-cell Leukemia Virus Type-1 Glycoprotein 21 Transmembrane Subunit for Induction of Native Protein Reactive Neutralizing Antibodies. **J. Biol. Chem.** Bethesda. v. 279. n. 23. p. 24141-24151. Jun. 2004.
- TAMURA, N.; SUZUKI, K.; IWASE, A.; YAMAMOTO, T.; KIRA, S. Retroviral infection as a putative pathogen for sarcoidosis. **Nippon Rinsho**. Tokyo.v. 52. n. 6. p. 1503–1507. Jun. 1994.
- TAN, E. M. Autoantibodies as reporters identifying aberrant cellular mechanisms in tumorigenesis. **J Clin Invest**, Michigan. v. 108. n. 10. p. 1411-1415. Nov. 2001.
- TONG, Y. Q.; ZHANG, Z. J.; LIU, B.; HUANG, J.; LIU, H.; LIU, Y.; GUO, F. J.; ZHOU, G. H.; XIE, P. L.; LI, Y. H.; ZUO, C. H.; HU, J. Y.; LI G. C. Autoantibodies as potential biomarkers for nasopharyngeal carcinoma. **Proteomics**. Weinheim. v. 8. n. 15. p. 3185-3193. Ago. 2008.
- URISMAN, A.; MOLINARO, R. J; FISCHER, N.; PLUMMER, S. J; CASEY, G.; KLEIN, E. A.; MALATHI, K.; MAGI-GALLUZZI, C.; TUBBS, R. R; GANEM, D.; SILVERMAN, R. H; DERISI, J. Identification of a novel Gammaretrovirus in prostate tumors of patients homozygous for R462Q RNASEL variant. **PLoS pathogens**. San Francisco. v. 2. n. 3. p. 0211-0225. Mar. 2006.
- VON MENSENDORFF-POUILLY, S.; VERSTRAETEN, A. A.; KENEMANS, P.; SNIJDEWINT, F. G.; KOK, A.; VAN KAMP, G. J.; PAUL, M. A.; VAN DIEST, P. J.; MEIJER, S.; HILGERS, J. Survival in early breast cancer patients is favorably influenced by a natural humoral immune response to polymorphic epithelial mucin. **J Clin Oncol**, Baltimore. v. 18. n. 3. p. 574-583. Fev. 2000.
- WANG, K.; XU, X.; NIE, Y.; DAI, L.; WANG, P.; ZHANG, J. Identification of tumor-associated antigens by using SEREX in hepatocellular carcinoma. **Cancer Letters**. Irlanda. v. 281. n. 2. p. 144-150. Ago. 2009.

WANG, X.; YU, J.; SREEKUMAR, A.; VARAMBALLY, S.; SHEN, R.; GIACHERIO, D.; MEHRA, R.; MONTIE, J. E.; PIENTA, K. J.; SANDA, M. G.; KANTOFF, P. W.; RUBIN, M. A.; WEI, J. T.; GHOSH, D.; CHINNAIYAN, A. M. Autoantibody Signatures in Prostate Cancer. **N Engl J Med**. Boston. v. 353. n. 12. p. 1224-1235. Set. 2005.

WANG, X. Autoantibody Biomarkers in Prostate Cancer. **Lab Med**. Nova York. v. 39. n. 3. p. 165-171. Mar. 2008.

WANG-JOHANNING, F.; FROST, A. R.; JOHANNING, G. L.; KHAZAELI, M. B.; LOBUGLIO, A. F.; SHAW, D. R.; STRONG, T. V. Expression of human endogenous retrovirus k envelope transcripts in human breast cancer. **Clin. Cancer Res**. Philadelphia. v. 7. n. 6. p. 1553-1560. Jun. 2001.

WANG-JOHANNING, F.; LIU, J.; RYCAJ, K.; HUANG, M.; TSAI, K.; ROSEN, D. G.; CHEN, D. T.; LU, D. W.; BARNHART, K. F.; JOHANNING, G. L. Expression of multiple human endogenous retrovirus surface envelope proteins in ovarian cancer. **Int. J. Cancer**. New York. v. 120. n. 1. p. 81-90. Jan. 2006.

WENTZENSEN, N.; COY, J. F.; KNAEBEL, H. P.; LINNEBACHER, M.; WILZ, B.; GEBERT, J.; VON KNEBEL DOEBERITZ, M. Expression of an endogenous retroviral sequence from the HERV-H group in gastrointestinal cancers. **Int. J. Cancer**. New York.Irlande. v. 121. n. 7. p. 1417-1423. Out. 2007.

WHEATLEY, J. B.; JR SCHMIDT, D. E.; Salt-induced immobilization of affinity ligands onto epoxide activated supports. **J Chromatography A**. Amsterdam. v. 849. n.1. p- 1–12. Jul. 1999.

WHEATLEY, J. B; LYTTLE, M. H; HOCKER, M. D, SCHMIDT, D. E. JR., Salt-induced immobilizations of DNA oligonucleotides on an epoxide-activated high-performance liquid chromatographic affinity support. **J Chromatography A**. Amsterdam.v. 726. n. 1-2. p. 77-90. Mar. 1996.

- WHEATLEYA, J. B. Effect of antigen size on optimal ligand density of immobilized antibodies for a high-performance liquid chromatographic support, **J Chromatography A**. Amsterdam. v. 548. n. 1-2. p. 243-253. Jul. 1991.
- WHITEAKER, J. R.; ZHAO, L.; ZHANG, H. Y.; FENG, L. C.; PIENING, B. D.; ANDERSON, L.; PAULOVICH, A. G. Antibody-based enrichment of peptides on magnetic *beads* for mass-spectrometry-based quantification of serum biomarkers. **Analytical Biochemistry**. San Diego. v. 362. n. 1. p. 44-54. Mar. 2007.
- WHITEAKER, J. R.; ZHAO, L.; ZHANG, H. Y.; FENG, L.; PIENING, B. D.; ANDERSON, L.; PAULOVICH, A. G. Antibody-based enrichment of peptides on magnetic *beads* for mass-spectrometry-based quantification of serum bioMarkers. **Analytical Biochemistry**. San Diego. v. 362. n. 1. p. 44-54. Mar. 2007.
- WILLATS, W. G. *Phage display*: practicalities and prospects. **Plant Mol Biol**. Dordrecht. v. 50. n. 6. p. 837-54. Dez. 2002.
- WU, P.; ZHU, L.; STENMAN, U. H.; LEINONEN, J. Immunopectidometric assay for enzymatically active prostate-specific antigen. **Clin Chem**. Washington. v. 50. n. 1. p. 125-129. Jan. 2004.
- YAGIHASHI, A.; ASANUMA, K.; KOBAYASHI, D.; TSUJI, N.; SHIJUBO, Y.; ABE, S.; HIROHASHI, Y.; TORIGOE, T.; SATO, N.; WATANABE, N. Detection of autoantibodies to livin and survivin in Sera from lung cancer patients. **Lung Cancer**. Irlanda. v. 48. n. 2. p. 217-221. Maio. 2005b.
- YAGIHASHI, A.; OHMURA, T.; ASANUMA, K.; KOBAYASHI, D.; TSUJI, N.; TORIGOE, T.; SATO, N.; HIRATA, K.; WATANABE, N. Detection of autoantibodies to survivin and livin in sera from patients with breast cancer. **Clin Chim Acta**. Irlanda. v. 362. n. 1-2. p. 125-130. Dez. 2005a.
- YANG, J. C.; PERRY-LALLEY, D. The envelope protein of an endogenous murine retrovirus is a tumor-associated T-cell antigen for multiple murine tumors. **J Immunother**. Hagerstown. v. 23. n. 2. p. 177-183. Abri. 2000.

ZHONG, L.; GE, K.; ZU, J. C.; ZHAO, L. H.; SHEN, W. K.; WANG, J. F.; ZHANG, X. G.; GAO, X.; HU, W.; YEN, Y.; KERNSTINE, K. H. Autoantibodies as potential biomarkers for breast cancer. **Breast Cancer Res.** United Kingdom v. 10. n. 3. p. 2-8. Mai. 2008.

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.** Amesterdan v. 71. n. 25. p. 2939–2959. Nov. 2002.

ZURITA, A. J.; ARAP, W.; PASQUALINI, R. Mapping tumor vascular diversity by screening *phage display* libraries. **J Control Release.** Amsterdan. v. 91. n. 1-2. p. 183-186. Ago. 2003.

Anexo 1 – Estadiamento, classificação TNM para o câncer de próstata.

Estadiamento e classificação TNM para o câncer de próstata (fonte: Brasil.

Ministério da Saúde, 2000).

T - Tumor Primário (a classificação patológica é idêntica à clínica com exceção à inexistência de pT1).

TX O tumor primário não pode ser avaliado.

T0 Não há evidência de tumor primário.

T1 Tumor não diagnosticado clinicamente, não palpável ou visível por meio de exame de imagem.

T1a Achado histológico incidental em 5% ou menos de tecido ressecado.

T1b Achado histológico incidental em mais de 5% de tecido ressecado.

T1c Tumor identificado por biópsia por agulha (p.ex., devido a PSA de rastreamento elevado).

T2 Tumor confinado à próstata.

T2a Tumor que envolve uma metade de um dos lobos ou menos.

T2b Tumor que envolve mais da metade de um dos lobos, mas não ambos os lobos.

T2c Tumor que envolve ambos os lobos.

T3 Tumor que se estende através da cápsula prostática.

T3a Extensão extracapsular (uni- ou bilateral).

T3b Tumor que invade vesícula(s) seminal(ais).

T4 Tumor está fixo ou invade outras estruturas adjacentes, que não as vesículas seminais: colo vesical, esfíncter externo, reto, músculos elevadores do ânus, ou parede pélvica.

N - Linfonodos Regionais.

NX Os linfonodos regionais não podem ser avaliados.

N0 Ausência de metástase em linfonodo regional.

N1 Metástase em linfonodo regional.

M - Metástase à Distância.

MX A presença de metástase à distância não pode ser avaliada.

M0 Ausência de metástase à distância.

M1 Metástase à distância.

M1a Linfonodo(s) não regional(ais).

M1b Osso(s).

M1c Outra(s) localização(ões).

Anexo II

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Termo de Consentimento

O Laboratório de Nanotecnologia 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 tecido normais e tumores 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 em 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 concordam 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_____
