

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

**DESENVOLVIMENTO DE APLICAÇÕES
TECNOLÓGICAS DA METODOLOGIA DE *PHAGE*
DISPLAY NO DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE
PRÓSTATA**

Aluna: ANA PAULA PERES FRESCHI

Orientador: Luiz Ricardo Goulart

**UBERLÂNDIA - MG
2006**



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

**DESENVOLVIMENTO DE APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS
DA METODOLOGIA DE *PHAGE DISPLAY* NO
DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE PRÓSTATA**

Aluna: ANA PAULA PERES FRESCHI

Orientador: Luiz Ricardo Goulart

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

**UBERLÂNDIA-MG
2006**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

F884d Freschi, Ana Paula Peres, 1978-
Desenvolvimento de aplicações tecnológicas da metodologia de phage display no diagnóstico do câncer de próstata / Ana Paula Peres Freschi. - 2006.
136 f. : il.

Orientador: Luiz Ricardo Goulart.

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

Inclui bibliografia.

1. Próstata – Câncer -Teses 2. Phage Display – Teses 3. Nanotecnologia - Teses.
I. Goulart Filho, Luiz Ricardo. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 616.65-006.6

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

**DESENVOLVIMENTO DE APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS DA
METODOLOGIA DE *PHAGE DISPLAY* NO DIAGNÓSTICO DO
CÂNCER DE PRÓSTATA**

Aluna: ANA PAULA PERES FRESCHI

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: **Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart** (Orientador)

Examinadores: **Dra. Etel Rodrigues Pereira Gimba.**
Dr. Marco Antônio Arap
Dra. Ana Graci Brito Madurro
Dr. Danielo Garcia de Freitas

Data da Defesa: 28 / 11 / 2006.

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

Luiz Ricardo Goulart
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado graças à colaboração, direta ou indireta, de pessoas que fizeram parte de minha vida, antes e durante o seu desenvolvimento. Esperando poder expressar sempre com gestos e atitudes, manifesto minha gratidão.

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart, orientador deste trabalho, pelo estímulo, otimismo e confiança em mim depositada em todas as etapas deste trabalho. Agradeço pela postura profissional e dedicação, não poupando esforços para a realização deste trabalho. E principalmente pela amizade, carinho e apoio, em nossa formação científica.

À Direção, Professores e Funcionários do Instituto de Genética e Bioquímica e à Universidade Federal de Uberlândia, pelo apoio.

Às agências de fomento Conselho de Aprendizagem e Ensino Superior (CAPES) e Conselho Nacional Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro.

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, pelo apoio prestado sempre que solicitado.

Aos meus amigos do Laboratório de Genética Molecular da UFU: Juliana Franco, Renata Gatti, Fausto Capparelli, Guilherme Lino, Rone Cardoso, Carlos Prudêncio, Adriana Neves, Karina Marangoni, Fabiana Santos, Paula Souza, Elisângela Cordeiro, Isabella Fontoura, Thaíse Araujo, Tiago Borges, Ana Paula Carneiro, Carolina Reis, Washington Carvalho, Karla Sabba, Alexandra Cardoso, Janaína Lobato, Érica Reis, Thiago Barbosa, Márcia Nunes, Patrícia Tieme, Luciano Caetano, Flavia Messias, Tatiana Anjo

pela amizade e apoio que sempre me proporcionaram. Em especial a Luciana Bueno que participou ativamente desse trabalho

A TODOS os colegas do laboratório de Genética da UFU pelo ambiente amigável e de união que proporcionaram durante este tempo de convívio mútuo.

Em especial a Silvia Ferreira pelas inúmeras demonstrações de companheirismo, apoio em todos os momentos difíceis e principalmente pela amizade.

Aos pacientes, que no momento mais difícil de suas vidas, foram as pessoas mais importantes e a quem dedico esse trabalho.

Neste momento manifesto minha eterna gratidão àqueles que são para mim exemplo de dedicação, carinho e amor, meus pais Jandyra e Osório, por tudo o que fizeram para que eu chegasse até aqui e pelo amor que demonstram ter. A minha querida irmã Camila, por ser tão presente e amiga.

Ao Ricardo que surgiu de repente em minha vida e se tornou tão importante pra mim.

A todos que de alguma forma contribuíram para a elaboração deste trabalho.

A Deus e a Espiritualidade Maior, agradeço, pela companhia, apoio, e oportunidade de aprendizado e evolução.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	ix
Lista de Aminoácidos	xi
Lista de Tabelas	xii
Lista de Figuras	xiii
RESUMO GERAL	xvi
ABSTRACT	xviii
INTRODUÇÃO GERAL	1
1 GLÂNDULA PROSTÁTICA	1
1.1 CARACTERÍSTICAS DA GLÂNDULA	1
1.2 MECANISMOS GERAIS DE REGULAÇÃO DA PRÓSTATA	3
1.3 ANOMALIAS RELACIONADAS À PRÓSTATA	3
1.3.1 Prostatites	4
1.3.2 Hiperplasia Prostática Benigna (HPB)	4
1.3.3. Câncer de Prostata (CaP)	5
1.3.3.1 Diagnóstico do CaP	6
1.3.3.2. Aspectos Epidemiológicos	9
1 3.3.3. Fatores de Risco	10
1.3.3.4. Aspectos moleculares	11
1.3.3.5 Aspectos Imunológicos	12
2 PHAGE DISPLAY	14
3 PLATAFORMAS TECNOLÓGICAS: IMUNOENSAIOS COM MICROESFERAS	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS	26
OBJETIVOS	39

CAPÍTULO I	
<i>“Identificação de Alvos Biológicos no Diagnóstico do Câncer de Próstata e Hiperplasia Prostática Benigna por Phage Display”</i>	40
RESUMO	41
ABSTRACT	42
INTRODUÇÃO	43
MATERIAL E MÉTODOS	45
1 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS IGY ANTI-CAP	45
1.1 Pacientes	45
1.2 Extração de Proteínas Totais	46
1.3 Imunização	46
1.4 Titulação de anticorpos por Ensaio Imuno Enzimático (ELISA)	47
1.5 Purificação cromatográfica de IgY	48
1.6 Diálise	48
2 ELETROFORESE EM SDS-PAGE	48
2.1 Coloração do gel com <i>Coomassie-blue</i>	49
2.2 Coloração do gel com nitrato de prata	49
3 SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS	50
3.1 <i>Biopanning</i> (seleção de fagos)	50
3.1.1 Titulações	51
3.2 <i>Western Blot</i>	52
3.3 Extração de DNA de fagos	52
3.4 Seqüenciamento	53
3.5 <i>Dot Immunoblotting</i> com IgG	53
3.6 <i>Phage</i> ELISA	54
3.7 Purificação de IgG com microesferas magnéticas	55
3.8 Peptídeo <i>Array</i>	55
4 ANÁLISE DE DADOS PELA BIOINFORMÁTICA	56
RESULTADOS	58

1 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E OBTENÇÃO DE IgY ANTI-CAP	58
2 SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS	60
2.1 <i>Biopanning</i>	60
2.2 Extração de DNA e seqüenciamento dos clones de fagos	62
2.3 <i>Dot Immunoblotting</i> com IgY	63
2.4 <i>Phage</i> ELISA	65
3 ANÁLISES POR BIOINFORMÁTICA	66
4 IMUNORREATIVIDADE DOS PEPTÍDEOS COM SORO HUMANO	74
4.1 Peptídeo <i>Array</i>	74
DISCUSSÃO	78
CONCLUSÕES	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
ANEXOS I a IV	93
CAPÍTULO II	
“Desenvolvimento de um Método para Diagnóstico por Imunoaglutinação em Micro e Nanoesferas de Poliestireno”	98
RESUMO	98
ABSTRACT	99
INTRODUÇÃO	99
MATERIAL E MÉTODOS	101
RESULTADOS E DISCUSSÃO	102
OUTRAS APLICAÇÕES	103
NOVO IMUNOSENSOR	112
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115
ANEXO V	117

Lista de Abreviaturas

°C	Graus Celsius
µg	Microgramas
µL	Microlitros
aa	Aminoácido
bp	Par de bases
BSA	Soro albumina bovina
BW	Body weight
DNA	Ácido Desoribonucléico
dsDNA	Double stranded DNA
dsRNA	Double stranded RNA
EDTA	Etileno diamino tetra acetato
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
g	Grama
IgG	Imunoglobulina G
IgY	Imunoglobulina Y
IPTG	Isopropil α-D-tiogalactosise
kDa	Quilodalton
L	Litro
LB	Meio de cultura Luria-Bertania
M	Molar
mAbs	Anticorpos monoclonais
mRNAs	RNA mensageiro
ng	Nanogramas
nm	Nanômetro
OD	Densidade ótica
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS	Tampão fosfato salino
PBST	Tampão fosfato salino com tween 20 a 0,5%
PEG	Polietileno glycol
pfu	Unidades formadoras de colônias
pH	Potencial Hidrogeniônico
Ph.D	Bibliotecas de <i>Phage Display</i> New England Biolabs
Ph.D-12mer	Biblioteca contendo 12 peptídeos randômicos
pIII	Proteína capsídica III de bacteriófagos filamentosos
pIX	Proteína capsídica IX de bacteriófagos filamentosos
pVI	Proteína capsídica VII de bacteriófagos filamentosos
pVII	Proteína capsídica VII de bacteriófagos filamentosos
pVIII	Proteína capsídica VIII de bacteriófagos filamentosos
RELIC	Receptor Ligands Contents
rpm	Revoluções por minuto
scFv	Fv de cadeia única
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SPF	Specific pathogen free
TBS	Tampão Tris-NaCl
TBST	TBS com Tween 20 0,05%
TBSTM	TBST com 5% de leite desnatado
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactosideo

Lista de Aminoácidos

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 Tabelas

Capítulo I

TABELA I: Parâmetros clínicos e laboratoriais dos pacientes utilizados para a extração de proteínas totais e imunização de galos. Os laudos anátomo-patológicos e grau de estadiamento tumoral foram realizados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia. ND: não detectado; PR: prostatectomia radical; RTU: ressecção transuretral.

TABELA II. Seleção dos fagos com peptídeos ligantes a anticorpos policlonais anti-CaP. Título obtido (pfu) no processo de seleção dos fagos por imunoafinidade.

TABELA III. Seqüência traduzida de aminoácidos dos peptídeos expressos nos clones de fagos selecionados e suas respectivas frequências.

TABELA IV. Frequência dos aminoácidos individuais dos peptídeos expressos nos fagos selecionados pelas IgYs e a frequência esperada dos aminoácidos na construção da biblioteca realizado pelo AADIV.

TABELA V. Alinhamentos das seqüências de aminoácidos dos 29 peptídeos selecionados pelos programas CLUSTAL W (v. 1.83), MUSCLE (v. 1.0), T-COFFEE (v. 1.14) e MAFFT (v. 5.860) mostrando a divergência entre os alinhamentos nos diferentes programas.

TABELA VI. Alinhamento das seqüências protéicas dos peptídeos selecionados mostrando as homologias encontradas com as proteínas anotadas no banco de dados do *GeneBank* pelo BLAST, com os números de acesso no NCBI e UniProt e suas prováveis funções.

Capítulo II

TABELA I. Comparação dos resultados da tipagem dos pacientes por MEIA e por imunoaglutinação em biossensor.

Lista de Figuras

Introdução Geral

FIGURA 1: Localização anatômica da glândula prostática na pelve (disponível em: http://www.institutouroandrologico.com/servicios/enfermedades_prostata.php).

FIGURA 2: Divisão anatômica da glândula prostática, onde: CZ (zona central), PZ (zona periférica), TZ (zona de transição) (WALSH; WORTHINGTON, 1998).

FIGURA 3. (A) Esquema representativo de um bacteriófago de classe Ff ilustrando as proteínas do capsídeo viral e três modelos de exposição de peptídeos respectivamente nas proteínas pIII, pVIII e simultaneamente nas proteínas pVII e pIX; em (B) Esquema representativo do genoma viral (disponível em: <http://www.molgen.mpg.de/~in-vitro/technology.html>).

FIGURA 4. Esquema representativo do processo de *Biopanning*. Imobilização do alvo e incubação da biblioteca de fagos, retirada dos fagos não ligados por lavagens sucessivas, eluição dos fagos ligados e infecção de *E. coli*, amplificação dos fagos eluídos e seqüenciamento da população de fagos com maior afinidade pelo alvo (disponível em: <http://www.molgen.mpg.de/~in-vitro/technology.html>).

Capítulo I

FIGURA 1.1. Esquema representativo das regiões de leitura nos *dots* das membranas dos ensaios de peptídeo *array*, os números de 1 a 5 indicam os locais de leitura e o 6 indica a leitura de toda a área de um *dot* por inteiro.

FIGURA 1.2. Eletroforese SDS-PAGE (16%) proteínas totais extraídas de amostras de tecido de próstata de pacientes com CaP e HPB observadas em gel de acrilamida corado com nitrato de prata, M= marcador de peso molecular.

FIGURA 1.3. Curva de titulação dos soros feita a partir das médias das absorbâncias das duplicatas versus as diluições dos soros pré e pós-imune dos galos 1 e 2 e controle. O

ponto de inflexão foi estimado traçando-se uma linha a partir da posição mediana do eixo Y até o polinômio da linha pós-imune interpolando-se até o eixo X.

FIGURA 1.4. Eletroforese em SDS-PAGE (16%) corado com coomassie blue das preparações de IgY purificadas por cromatografia. M- marcador de peso molecular; 1 a 5 alíquotas de IgY; S - amostra de soro total dos galos.

FIGURA 1.5. *Western blot* dos fagos dos 1°, 2° e 3° ciclos de seleção, revelados com IgY anti-CaP como anticorpo primário e detecção com anticorpo secundário anti IgY conjugado com fosfatase alcalina. No gel foram aplicadas 1×10^{10} partículas virais para cada amostra.

FIGURA 1.6. Eletroforese em gel de agarose 1% de 10 amostras de DNA extraído de fagos (1-10) aleatoriamente escolhidos e de 200ng de DNA controle (C) com 7249 pb.

FIGURA 1.7. Membranas de *Dot immunoblotting* dos clones de fago selecionados (1-29), e dos controles Selv. fago selvagem e Ctr. proteínas de Cap, com as imunoglobulinas tipo Y anti-CaP em A e irrelevantes em B.

FIGURA 1.8. Gráfico representativo das leituras a 492nm do ensaio de ELISA mostrando a reatividade dos clones de fagos capturados por anticorpo anti-M13 contra as IgY anti-CaP e irrelevantes.

FIGURA 1.9. Gráfico construído pelo programa DIVAA que ilustra a diversidade de sucessão dos aminoácidos em cada posição nos peptídeos.

FIGURA 1.10. Eletroforese em SDS-PAGE (Gel 16%) corado com coomassie blue. Preparações de IgG obtidas por imunoprecipitação com microesferas magnéticas. M- marcador de peso molecular; CaP- câncer de próstata, HPB, hiperplasia prostática benigna.

FIGURA 1.11. *Phage Peptide Arrays* em membranas com 29 clones de fago selecionados por *Phage Display*. As membranas foram sondadas com IgGs purificadas de *pools* de pacientes com CaP, HPB e controles sadios. Selv= fago selvagem.

FIGURA 1.12. Gráfico representativo das densidades óticas relativas obtidas para cada um dos 29 clones recombinantes e para o fago selvagem (30) nos ensaios com *phage* peptídeo *array* sondados com IgGs purificadas de pacientes com CaP, HPB e controles sadios (Neg).

Capítulo II

FIGURA 2.1. Fotografia digital do teste utilizando o biossensor em cartão Liss/Coombs com soro dos pacientes 29, 33, 15, 20, 36 e Crtl como controle negativo para toxoplasmose.

FIGURA 2.2. Fotografia digital do teste utilizando o biossensor em DC-Screening I (DiaMed A/G) para detecção de IgG e IgM no soro dos pacientes 29, 33, 15, 20 e 36 positivos para toxoplasmose.

FIGURA 2.3. Fotografia digital do teste utilizando o biossensor em cartão Liss/Coombs com soro dos pacientes com hanseníase com as formas clínicas virchoviana (V), dimorfa-dimorfa (DD) e tuberculóide, detectados com peptídeos miméticos de PGL-1.

FIGURA 2.4 Teste para o antígeno eritrocitário Duffy A utilizando o biossensor em cartão Liss/Coombs com soro dos pacientes: Fya – Duffy A, Fyb – Duffy B, Jka –Kidd A, Jkb – Kidd B e Controle respectivamente.

FIGURA 2.5. Resultado fornecido pela leitora de cartões ID-Reader (DiaMed) com três peptídeos diferentes com soros de : Fya–Duffy A, Fyb–Duffy B, Jka–Kidd A, Jkb–Kidd B e Ctr- como controle negativo.

FIGURA 2.6. Fotografia digital do Cartão de NaCl Teste Enzimático (DiaMed A/G) onde foi realizado o teste do biossensor com o soro de pacientes com CaP, pacientes com HPB e indivíduos normais . As microesferas foram sensibilizadas com estreptavidina e ligadas com anti-IgG humana biotinizada, formando um complexo com IgG específicas e fagos recombinantes para CaP.

FIGURA 2.7. Fotografia digital do teste realizado no Cartão de NaCl Teste Enzimático (DiaMed A/G) com o microesferas de látex acopladas a fago imunorreativo com o soro de pacientes com leishmaniose visceral - LV, tegumentar - LT, normal - N e sem soro – Ctrl.

FIGURA 2.8. Fotografia digital do teste utilizando o biossensor em cartão Liss/Coombs com soro dos pacientes V03 – *P. vivax*, V16 – *P. vivax*, F19 – *P. falciparum*, F21 – *P. falciparum* e Fya – Duffy Fya como controle negativo para malária.

RESUMO GERAL

O câncer de próstata é a segunda causa de óbitos por câncer em homens, sendo superado apenas pelo câncer de pulmão. A ocorrência estimada é de 51 casos novos para cada 100 mil homens por ano para este tipo de câncer. O aumento observado nas taxas de incidência pode ser parcialmente justificado pela evolução dos métodos diagnósticos, pela melhoria na qualidade dos sistemas de informação do país e pelo aumento na expectativa de vida do brasileiro. 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. A tecnologia de *Phage Display* é capaz de selecionar peptídeos com diversas finalidades, como mimetizar antígenos reconhecidos por anticorpos. Peptídeos selecionados por esta técnica são potenciais marcadores tumorais para o diagnóstico do câncer de próstata. Por meio desta metodologia pode ser possível identificar proteínas capazes de detectar a resposta imune contra o tumor mais precocemente do que os métodos tradicionais, prever o estadió atual do tumor, além de permitir o desenvolvimento de tratamentos mais eficientes.

Pela imunização de galos SPF (livre de patógenos específicos) com proteínas totais de tecidos tumorais da próstata, foram obtidas IgY policlonais específicas que foram utilizadas no *biopanning* contra uma biblioteca de peptídeos recombinantes randômicos. Os fagos selecionados foram caracterizados por seqüenciamento e subsequentemente testados por *dot immunoblotting* e ELISA para validar a especificidade dos mesmos. Selecionou-se peptídeos que mimetizam proteínas prostáticas, possivelmente proteínas envolvidas no processo de tumorigênese. Esses peptídeos foram testados quanto a sua possível utilização no diagnóstico da resposta imune associada a processos tumorais.

Neste trabalho, também foi desenvolvido com sucesso um imunossensor para diagnóstico que tem como base de detecção um sistema de cromatografia líquida por exclusão em micro colunas cromatográficas com bacteriófagos filamentosos carreadores de antígeno(s) e/ou anticorpo(s), selecionados por *phage display*, acoplados microesferas de látex coloridas, ativadas com diferentes grupamentos químicos. A presença do fago é de grande importância no processo, pois favorece a formação dos complexos antígeno-anticorpo, peptídeo-proteína ou peptídeo-substrato, ampliando a detecção ótica durante a separação por cromatografia ou por microaglutinação em microscopia ótica. A nova tecnologia pode também ser usada para a detecção de biomoléculas ou substâncias químicas associados a doenças infecciosas, parasitárias e genéticas, com rapidez, precisão, sensibilidade e reprodutibilidade, utilizando-se pequenos volumes de amostras e reagentes, apresentando praticidade e baixos custos.

Palavras-chave: Câncer de Próstata, Hiperplasia Prostática Benigna, marcadores tumorais, microesferas, biossensores, imunoaglutinação, imunocromatografia, *Phage display*.

ABSTRACT

Prostate cancer is the second cause of death in men by tumor, surpassed only by lung cancer. Its occurrence is estimated to be 51 to 100,000 cases per year. The increasing incidence levels observed may be partially explained by the evolution of diagnostic methods, quality of information systems and longer life expectancy. The identification of new cancer specific antigens and genes may provide important biomarkers for diagnosis and instruments for the development of new treatment strategies. The Phage Display technology may be able to select peptides with different aims, such as the discovery of mimetic antigens that are recognized by specific antibodies. Selected peptides may become potential tumor biomarkers for prostate cancer diagnosis. It could be possible to use this technology to identify proteins that are able to detect cancer earlier than the conventional methods, to predict disease staging, and to develop new treatment strategies based on more efficient biological targets.

The immunization of SPF (specific pathogen free) male chickens with total proteins of tissues of prostate cancer has generated polyclonal specific IgY sera, which were used in biopanning procedures against random peptide libraries. Selected phages were characterized by sequencing and bioinformatics, and subsequently by dot immunoblotting and ELISA to validate their specificity. Selected peptides were mimotopes of putative proteins involved in the carcinogenesis process. These peptides were further tested for their possible use in the immune response diagnostics associated with tumor processes.

In this work, we have also successfully developed a general immunosensor for diagnostics, performed on an exclusion liquid chromatography system based on a micro column resin separation, using the selected bacteriophages as carriers of antigens and antibodies. These phage are coupled to colored latex beads, which are activated with different chemical groups. The presence of phage in the process is of fundamental importance, once they favor the formation of the

antigen-antibody complex, peptide-protein or peptide-substrate, amplifying the optical detection during chromatographic separation or by micro-agglutination in slides for optical microscopy detection. The new technology is practical and simple, and may also be used for detection of other biomolecules or chemical substances associated with infectious and genetic diseases, with high precision, sensitivity, specificity, and rapidity, using low sample volumes and presenting a low cost.

Key-words: prostate cancer, benign prostatic hyperplasia, tumor markers marcadores tumorais, microspheres, biosensors, immunoagglutination, immunochromatography, *Phage display*.

INTRODUÇÃO GERAL

1 GLÂNDULA PROSTÁTICA

1.1 CARACTERÍSTICAS DA GLÂNDULA

A próstata, medindo cerca de 3 cm de comprimento, é a maior glândula acessória do sistema genital masculino. A parte glandular compreende aproximadamente dois terços da próstata; o outro terço é fibromuscular (MOORE; DALLEY, 2001). Está localizada imediatamente abaixo da bexiga urinária onde envolve a porção inicial da uretra (FIGURA 1) (SMITH, 1979; VAN DE GRAAFF, 2003).

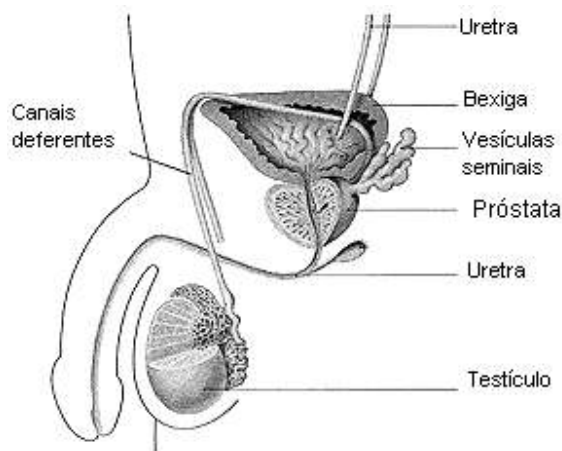


FIGURA 1: Localização anatômica da glândula prostática na pelve (disponível em: http://www.institutouroandrologico.com/servicios/enfermedades_prostata.php).

A próstata é composta por ácinos e um complexo sistema de ductos ramificados, cujos produtos de excreção são lançados dentro da uretra prostática (ROHR, BARTSCH, 1980). Os ácinos e ductos prostáticos, exceto nos segmentos periuretrais imediatos, são revestidos por uma dupla população de células, representada por uma camada interna colunar secretora e uma camada externa formada por células basais (ALMEIDA, 2003).

A fina secreção prostática, leitosa, ajuda na mobilidade dos espermatozoides como agente de liquefação, e sua alcalinidade protege o espermatozoides em sua passagem pelo meio ácido da vagina. A descarga prostática ocupa, aproximadamente, 20% do volume do sêmen (VAN DE GRAAFF, 2003). Ramos viscerais das artérias retais média e inferior suprem a próstata com sangue. O retorno venoso forma o plexo venoso prostático, juntamente com o sangue que drena o pênis. O plexo prostático drena nas veias ilíacas internas. A próstata tem inervação simpática e parassimpática originária do plexo pélvico (VAN DE GRAAFF, 2003).

McNeal (1968, 1980, 1981, 1988) propôs uma organização anatômica da próstata, amplamente aceita nos dias atuais, dividindo-a em zonas que representam características morfológicas, funcionais e patológicas da glândula: o estroma fibromuscular anterior, que é constituído basicamente de musculatura lisa, correspondendo a 30% do volume total da próstata; a zona periférica, que é a maior das subdivisões anatômicas, contendo três quartos de todo o tecido glandular e onde se encontra a maioria dos casos de câncer de próstata (CaP); a zona central, que detém a maior parte das glândulas remanescentes; o tecido pré-prostático, que impede o refluxo do sêmen para a bexiga durante a ejaculação e a zona de transição que circunda a uretra e é o local de ocorrência da hiperplasia prostática benigna (HPB) (FIGURA 2) (COFFEY, 1992; WALSH; WORTHINGTON, 1998).

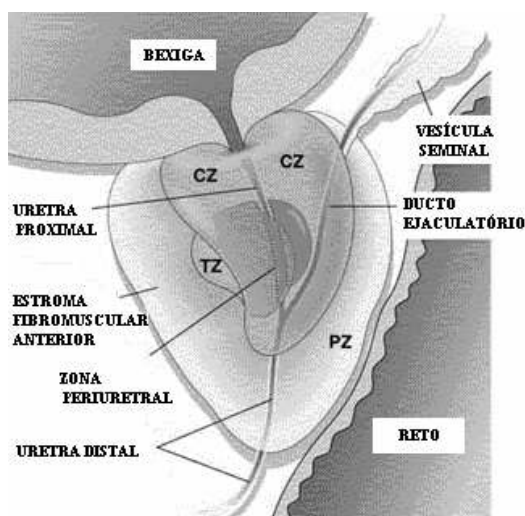


FIGURA 2: Divisão anatômica da glândula prostática, onde: CZ (zona central), PZ (zona periférica), TZ (zona de transição) (WALSH; WORTHINGTON, 1998).

1.2 MECANISMOS GERAIS DE REGULAÇÃO DA PRÓSTATA

A próstata é regulada, principalmente, por hormônios sexuais chamados andrógenos, que provêm dos testículos, sendo a testosterona o mais importante deles. Após ser liberada pelos testículos, a testosterona circula no sangue, entra nas células prostáticas por difusão e é transformada, no citoplasma, em diidrotestosterona (DHT) pela enzima 5-alfa-redutase. A DHT se liga a seu receptor específico e é transportada ao núcleo celular, onde participa da transcrição de genes responsáveis pelo crescimento da glândula (COFFEY, 1992; WALSH; WORTHINGTON, 1998).

A homeostase da glândula prostática é mantida pelo balanço entre as ações dos fatores que estimulam e dos que restringem o crescimento, e a falta de controle entre esses mecanismos pode resultar de instabilidade genética com alterações nos processos que regulam o crescimento (GRIFFITHS; MORTON, 1999).

Os fatores extrínsecos, como os hormônios esteróides, modulam a produção e ação de fatores intrínsecos, como os fatores de crescimento. Estes podem agir favorecendo ou inibindo a proliferação celular por efeitos parácrinos nos diferentes tipos de células adjacentes, de forma autócrina agindo no mesmo tipo celular onde foi produzido ou por uma ação intrácrina intracelular, atuando dentro da mesma célula de origem (WALSH, 1992; GRIFFITHS; MORTON, 1999).

1.3 ANOMALIAS RELACIONADAS À PRÓSTATA

Algumas doenças clinicamente importantes podem afetar a próstata nos homens adultos, como as prostatites, a hiperplasia prostática benigna e o câncer de próstata. Estas apresentam grande significado clínico, não só por suas conseqüências, mas também pela freqüência com que se manifestam (SROUGI; CURY, 1998).

1.3.1 Prostatites

As prostatites são subdivididas em quatro categorias de doenças que afligem a próstata: tipo I) Prostatite bacteriana aguda: quadros infecciosos de instalação abrupta causados por bactérias intestinais, identificadas no exame de urina, que respondem eficientemente ao tratamento com antibióticos; tipo II) Prostatite bacteriana crônica: quadros infecciosos insidiosos e recorrentes, causados por bactérias intestinais que são isoladas no esperma, raramente na urina. As manifestações clínicas são menos dramáticas que nos casos agudos e respondem de forma completa ou parcial ao tratamento com antibióticos; tipo III) Prostatite não bacteriana: quadros que se manifestam com dor ou com sintomas urinários, nos quais não são encontradas bactérias na urina ou no esperma; tipo IV) Prostatite assintomática: quadros de inflamação da próstata, sem manifestações clínicas, que são descobertos porque os níveis do antígeno prostático específico (PSA) elevam-se no sangue, na ausência do câncer (SROUGI, 2003).

1.3.2 Hiperplasia Prostática Benigna (HPB)

O aumento prostático, conhecido como Hiperplasia Prostática Benigna (HPB), é uma das principais patologias urológicas; atinge grande parcela dos homens, podendo acometer até 90% daqueles com idade superior a 80 anos (DAMIÃO; CARRERETE, 2003). Corresponde a um aumento do volume da próstata, resultante do crescimento das glândulas periuretrais e não de uma simples hipertrofia (aumento do número de células) (LAPIDES, 1979; WALSH; WORTHINGTON, 1998). O aumento da idade e a presença de testículos funcionais representam os determinantes mais importantes para o desenvolvimento da HPB. Além disso, outros fatores como, por exemplo, raça, obesidade, tabagismo, cirrose hepática, atividade sexual e hereditariedade têm sido implicados com a doença (CURY; NARDOZZA-JUNIOR, 2003). Como consequência do crescimento prostático, ocorre um bloqueio do canal uretral, causando no paciente certos transtornos urinários, sob a forma de enfraquecimento progressivo do jato urinário, gotejamento de urina após cada

micção e aumento do número de micções, principalmente durante a noite. Felizmente, a maioria dos homens com HPB apresentam manifestações discretas que são bem toleradas, entre 25% e 40% apresentam queixas persistentes que exigem algum tratamento e em apenas 10% torna-se necessária uma intervenção cirúrgica (SROUGI, 2003).

1.3.3. Câncer de Próstata (CaP)

O câncer de próstata (CaP), como várias outras formas de câncer, é uma doença multi-focal e multi-causal, correspondendo a uma alteração no balanço entre a proliferação e a morte celular. Durante os estágios iniciais do surgimento do câncer, as células respondem aos mesmos fatores regulatórios (hormônio-dependente), embora as taxas de proliferação celular sejam maiores do que as de morte celular. A disfunção no processo regulatório, associada a mutações genéticas, reflete graus de respostas anormais dos fatores de crescimento, gerando um processo que leva à formação de clones autônomos de células malignas, com crescimento promovido por via autócrina que passa a não responder ao controle androgênico (hormônio-independente) (GRIFFITHS; MORTON, 1999).

Mais de 95% das neoplasias da próstata são representadas pelos adenocarcinomas e o restante compreende casos de sarcoma, carcinoma epidermóide e carcinoma de células transicionais. Os adenocarcinomas localizam-se na zona periférica da glândula prostática em cerca de 75% dos casos, na zona transicional em aproximadamente 25% dos pacientes e na zona central em menos de 5% dos casos (STAMEY; McNEAL, 1992; SROUGI, 1998; BOSTWICK, 1999; JARMULOWICZ, 1999).

A organização anatômica da glândula inclui um tecido fibromuscular entre a zona central e a zona periférica, que de certo modo limita a expansão de carcinomas da zona de transição para os feixes neurovasculares e ductos ejaculatórios, as duas maiores rotas para a expansão extraglandular (BOSTWICK, 1999; JARMULOWICZ, 1999).

Tem sido sugerido que a atrofia inflamatória da próstata (ASAP) e a neoplasia intraepitelial prostática (NIP) de alto grau sejam precursores para

muitos carcinomas prostáticos, por serem altamente freqüentes nas próstatas com adenocarcinoma e por apresentarem alterações genéticas em comum. Por essas e outras características, a NIP tem sido hipotetizada como uma 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).

1.3.3.1 Diagnóstico do CaP

O antígeno prostático específico, uma glicoproteína de peso molecular de 34 KDa que pertence à família das calicreínas, é secretado no fluido prostático (COFFEEY, 1993) e elevações nos níveis séricos desse marcador são amplamente utilizadas para o diagnóstico e monitoramento de pacientes com CaP (MIKOLAJCZYK *et al.* 2004). Todavia, o PSA, apesar de indicar alterações na próstata, possui baixo valor preditivo, pois não é um marcador apenas para o câncer, usualmente apresentando níveis elevados em prostatites e HPB (DILLIOGLUGIL *et al.* 1997; CATALONA; SMITH, 1998; RIFFENBURGH; AMLING, 2003; MIKOLAJCZYK *et al.* 2004).

Os níveis séricos do PSA, no câncer da próstata, normalmente aumentam progressivamente à medida que aumenta o estágio da doença, mas nem sempre (LANGE; ERCOLE; VERSSELA, 1986). Porém sua baixa especificidade torna-o, isoladamente, pouco relevante como método de diagnóstico precoce da neoplasia.

Catalona *et al.* (1994) mostraram que o valor positivo mais alto, de 55%, foi encontrado quando o paciente apresentava simultaneamente, alterações no toque retal e no PSA. No PSA sozinho, houve valor preditivo positivo de apenas 32%, pouco mais alto do que o valor preditivo positivo da alteração do toque retal isolada, que foi de 21%.

Os níveis de PSA tornam-se indetectáveis (PSA igual ou menor que 0,04 ng/ml) em mais de 91% dos pacientes, após prostatectomia radical. Este comportamento tem grande valor prognóstico, sendo utilizado nos controles pós-operatórios (OESTERLING *et al.* 1988; STAMEY; KABALIM, 1989).

Algumas alternativas para melhorar a performance do PSA, com aumento de sensibilidade e especificidade, são rotineiramente utilizadas. Dentre estas, a análise do PSA em diferentes níveis de corte, o emprego da densidade e velocidade de crescimento do PSA e ainda a relação PSA livre / PSA total (CATALONA, *et al.* 2003; D'AMICO *et al.* 2004) compondo o que hoje é aceito como raciocínio crítico e particularizado do PSA.

As alterações do PSA em condições benignas e malignas não oferecem especificidade total para nenhuma das duas condições. A análise da sua variação, a velocidade e demais parâmetros podem indicar a maior ou menor chance de detecção de malignidade ou não. Porém somente o diagnóstico anátomo-patológico pode elucidar com maior clareza o diagnóstico.

Além da dosagem do PSA, compõem ainda o rastreamento das anomalias prostáticas o exame físico da próstata (toque retal). Tanto o câncer da próstata quanto a hiperplasia prostática benigna são diagnosticados pelo exame patológico de material obtido pela biópsia da próstata. A biópsia é recomendada para todo paciente com toque retal duvidoso, independentemente do valor do PSA, pois 25% dos homens com CaP apresentam níveis de PSA abaixo do suspeito (ARAGÃO, 2003). No entanto, a biópsia é um exame invasivo, com riscos de infecção e extremamente desagradável para o paciente. São retirados pelo menos seis fragmentos de cada lobo da próstata, incluindo fragmentos de áreas suspeitas ao ultra-som.

A evolução dos pacientes com adenocarcinoma da próstata está intimamente relacionada com a extensão da neoplasia e, por isso, Whitmore, em 1956, introduziu um sistema de estadiamento com a finalidade de caracterizar a extensão do tumor. Esta classificação dividia os tumores em 4 grupos: A, B, C e D e foi, posteriormente, modificada por Jewett, com a introdução de subgrupos A1 e A2, B1 e B2, C1 e C2, D1 e D2. Mais recentemente, a União Internacional Contra o Câncer (UICC), em 1992, propôs a utilização do Sistema TNM 92 (T-Tumor, N-Linfonodo, M-Metástase), em adenocarcinoma da próstata, de modo a padronizar a classificação dos pacientes com a doença e permitir estudos comparativos mais precisos (ANEXO I), sendo o grau da neoplasia definido pela escala de Gleason (ANEXO II) (GLEASON, 1977; STAMEY; McNEAL, 1992, SROUGI, 1998, SCHRÖDER *et al.* 1992).

O sistema de graduação histológico mais utilizado é Escala de Gleason (ANEXO II), que valoriza, principalmente, o padrão glandular e a relação entre as glândulas e o estroma prostático. Nesse sistema, os tumores são classificados em 5 graus, denominando-se grau 1 as lesões mais diferenciadas e grau 5 as mais indiferenciadas. Como os adenocarcinomas da próstata apresentam mais de um padrão histológico, o diagnóstico final na escore de Gleason é dado pela soma dos graus do padrão primário (predominante) e do padrão secundário (segunda maior área representada) (STAMEY; McNEAL, 1992; ISAACS, 1997; SROUGI, 1998).

Como o câncer da próstata é uma doença multifocal, ocorre, muitas vezes sub-estadiamento dos escores das biópsias em relação aos das peças cirúrgicas (STEINBERG *et al.* 1997). Também pela subjetividade da leitura da lâmina, pelos achados no tumor de áreas limítrofes entre um escore e outro e pela amostragem, uma vez que a quantidade de tecido disponível para exame na biópsia é menor em relação à quantidade disponível nas peças cirúrgicas.

O uso de nomogramas “Partin Tables”, utilizando como parâmetros alterações do toque retal, Gleason da biópsia e o resultado do PSA pré-operatório fornece as probabilidades do estadiamento patológico em termos de probabilidade de doença confinada à próstata, extensão extraprostática, invasão de vesículas seminais, metástases em gânglios linfáticos (PARTIN *et al.* 2001).

Em relação ao estadiamento patológico pela classificação TNM 92, 50% dos pacientes são clinicamente sub-estadiados. Sabendo-se que a maior chance de cura ocorre com o estágio inicial T1N0M0 (CATALONA; DRESNER, 1985; VOGES *et al.* 1992).

Com tantas variáveis em questão, existe real necessidade de diferenciação entre a hiperplasia benigna e o câncer de próstata realmente inicial ou T1. Atualmente, estudos sobre o diagnóstico molecular do câncer da próstata e outras afecções prostáticas representam uma nova possibilidade de auxílio ao PSA. Esses estudos demonstram tentativas de melhoria da segurança no diagnóstico, no controle pós-tratamento e no acompanhamento clínico dos pacientes, representando promessas de incorporação na prática clínica (BUSSEMAKERS *et al.* 1999; HIROYOSHI *et al.* 2004; ROGERS *et al.* 2004; ORNSTEIN *et al.* 2004).

1.3.3.2 Aspectos Epidemiológicos do Câncer de Próstata

Nas últimas décadas, o câncer de próstata tem emergido como uma das doenças mais comuns entre os homens idosos. No Brasil e nos Estados Unidos é o segundo mais comumente diagnosticado após o câncer de pele não melanoma (GRIFFITHS; MORTON, 1999; CHANG *et al.* 2001). É a segunda causa de óbitos por câncer em homens, sendo superado apenas pelo de pulmão. O número de casos novos de câncer de próstata estimados para o Brasil em 2006 é de 47.280. Estes valores correspondem a um risco estimado de 51 casos novos a cada 100 mil homens. O câncer de próstata é o mais freqüente em todas as regiões entre o total de tumores, exceto pele não melanoma, com risco estimado de 68/100.000 na região Sul, 63/100.000 na região Sudeste, 46/100.000 na região Centro-Oeste, 34/100.000 na região Nordeste e, 22/100.000 na região Norte (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, INCA, 2006)

A incidência do câncer de próstata aumenta com a idade, mais do que em diversos outros tipos de cânceres (COFFEY, 1993; ISAACS, 1997; CHAN *et al.* 1998; INCA, 2006). Na maioria dos casos, o tumor apresenta um crescimento lento, de longo tempo de duplicação, levando cerca de 15 anos para atingir 1 cm³ e acometendo homens acima de 50 anos de idade. Enquanto sua incidência para homens entre 45 e 49 anos de idade é de sete novos casos /100 mil homens /ano, para aqueles com mais de 80 anos, o número é de 1200/ 100 mil homens/ ano (BENDHACK; SOBREIRO, 2003).

A incidência varia de acordo com a raça e localização geográfica. Os países escandinavos e o Canadá apresentam a maior incidência mundial do câncer de próstata, ao passo que nos países orientais a freqüência é até 25 vezes menor (a incidência na China é de 0,8 / 100 mil e nos EUA é de 100 / 100 mil) (HERING, 2003).

Segundo as estatísticas americanas, a incidência em negros é maior que em brancos (proporção 2:1). De acordo com Thomas e colaboradores (2002 *apud* HERING, 2003, p. 423), quanto à incidência de CaP em homens mais jovens, os negros têm 60% mais que os homens brancos. Esse tipo de câncer manifesta-se

também de forma mais agressiva em negros, cuja chance de morrer pelo mal é o dobro da observada em brancos (SROUGI, 1998).

1.3.3.3 Fatores de Risco

Entre todos os tipos de câncer, este é considerado o câncer da terceira idade, uma vez que cerca de 75 % dos casos – no mundo – ocorrem a partir dos 65 anos. O aumento acentuado nas taxas de incidência tem sido influenciado pelo diagnóstico de casos latentes em indivíduos assintomáticos. As taxas aumentaram especialmente em regiões onde o rastreamento através do teste Antígeno Prostático Específico (PSA) é comum (INCA 2006).

O câncer de próstata é uma doença multifatorial, com componentes genéticos e ambientais envolvidos em sua etiologia (NWOSU *et al.* 2001). Dentre os fatores de risco mais amplamente associados ao CaP estão a idade, a etnia e a história familiar da doença (PIENTA; ESPER, 1993; ALLEN *et al.* 2004). No entanto, um grande progresso tem sido observado no que concerne às descobertas que relacionam fatores nutricionais e hormonais ao câncer de próstata (CHAN *et al.* 1998).

A idade é um forte fator de risco para o CaP. Sabe-se que homens americanos com idade entre 75-79 anos têm cerca de 130 vezes mais risco de desenvolver a doença do que os homens com idade entre 45-49 anos. Numerosas alterações genéticas têm sido demonstradas em tecidos com câncer prostático, sugerindo que danos cumulativos no DNA com a idade, podem parcialmente explicar essa tendência (CHAN *et al.* 1998).

A raça também é um fator de risco bem estabelecido para a incidência e mortalidade desse tipo de câncer. Negros apresentam um risco 60% maior de desenvolver o CaP e uma mortalidade duas vezes maior que a população caucasiana da mesma idade (MACHADO; CINTRA, 2003).

Alguns estudos sugerem que dieta rica em gorduras e carne vermelha aumentaria o risco de desenvolver o câncer de próstata, enquanto a ingestão de frutas e vegetais e exercício físico regular ofereceriam alguma proteção (INCA 2006), porém ainda não foram comprovados.

Homens que têm parentes em primeiro grau (pai, irmão ou filho) com câncer de próstata apresentam um risco de desenvolvê-lo três vezes maior. O risco ainda aumenta se a idade de aparecimento da doença for precoce e se o acometimento familiar for múltiplo (CARTER *et al.* 1992; MACHADO; CINTRA, 2003). A penetrância dos genes do câncer de próstata familiar não é conhecida, mas é possível que eles se relacionem em apenas 10% dos casos (MACHADO; CINTRA, 2003).

1.3.3.4 Aspectos moleculares

Modificações moleculares e presença de moléculas alvo interessantes têm sido, recentemente, associadas à progressão do tumor prostático e ao desenvolvimento de resistência à terapia (CAVARRETTA *et al.* 2005).

O câncer é uma doença originada por aberrações genéticas que inativam genes supressores de tumor e ativam proto-oncogenes (PORKKA; VISAKORPI, 2004). Essas alterações desorganizam a homeostase tissular, ou por aumento desgovernado da divisão celular, ou pela diminuição da apoptose, causando o aparecimento dos tumores (GATTÁS, 2003). A maioria das mutações é adquirida ao longo do desenvolvimento do tumor, sendo assim consideradas mecanismos da tumorigênese. Contudo, algumas podem ser herdadas, resultando em predisposição ao câncer (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 geneticamente, sendo em 10% dos casos por transmissão hereditária e os demais por alterações genéticas esporádicas (GATTÁS, 2003).

Muitos esforços têm sido destinados ao melhor entendimento dos complexos mecanismos moleculares envolvidos na oncogênese e progressão do CaP (GIMBA; BARCINSKI, 2003). Os métodos que têm sido 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 há mais de 50 anos, 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 biomarcadoras presente no soro oferecem grande promessa para detecção não invasiva, classificação e estadiamento do câncer de próstata. *Arrays* 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).

1.3.3.5 Aspectos Imunológicos

Uma característica comum, se não intrínseca, da autoimunidade humoral é o desenvolvimento de autoanticorpos endereçados contra proteínas celulares próprias do indivíduo e ácidos nucleicos (TAM, 1989). Evidências consideráveis têm mostrado que autoanticorpos é uma forma de resposta imune para ao tumor vários antígenos tumorais desenvolvida por muitos pacientes (BRADFORD; WANG; CHINNAIYAN, 2006). O estudo da auto-imunidade 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. Mudanças na estrutura ou expressão de proteínas próprias, ocorridas durante a tumorigênese, sugerem mecanismos pelos quais o sistema imune pode iniciar ou permitir o reconhecimento de epítomos associados a tumores como estranhos (TAM, 2001).

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

O perfil da resposta imunológica no câncer pode fornecer informações valiosas sobre proteínas expressas pelo tumor que induzem a produção de anticorpos. Atualmente, há muitos estudos sobre a resposta imune humoral de

pacientes com diversos tipos de cânceres: 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; GOLD; BLACHERE, 2001), cânceres ginecológicos (KORNEEVA *et al.* 2000)

A resposta imune humoral ao câncer tem direcionado à especificidade antigênica de anticorpos do soro. Têm sido relatados vários trabalhos com autoanticorpos contra diferentes proteínas tumorais em diversos tipos de cânceres: p53 (CRAWFORD; PIM; BULBROOK, 1982; COOMBER; WARD, 2001), fator de crescimento de fibroblasto (ZIMERING; THAKKER-VARIA, 2002), proteínas ribossomais (SCHEURLE *et al.* 2000), proteínas *heat shock* (KORNEEVA *et al.* 2000), α -metilacetil CoA (SREEKUMAR *et al.* 2004), mucina (VON MENSENDORF-POUILLY *et al.* 2000), proteína HER2 (DISIS *et al.* 1997), estas duas últimas envolvidas na inibição da progressão tumoral.

Não são apenas proteínas que induzem a resposta imune humoral em diversas doenças. Lv *et al.* (2005) demonstraram a origem de autoanticorpos anti-dsDNA com efeitos anti-tumor por indução da apoptose em pacientes e ratos com câncer.

A presença de autoanticorpos no soro de pacientes com câncer de próstata tem sido relatada em uma infinidade de trabalhos (MINTZ *et al.* 2003; FOSSA *et al.* 2004; WANG *et al.* 2005; BRADFORD; WANG; DUNPHY *et al.* 2006; LARSON *et al.* 2006). A detecção desses autoanticorpos no soro de pacientes com CaP pode fornecer uma forma menos invasiva e mais precisa de diagnóstico e novas abordagens terapêuticas. Casiano, Mediavilla-Varela, Tan, (2006) propõem o uso de *screening* de autoanticorpos como diagnóstico para o CaP. Bradford *et al.* (2006) após uma seleção de 22 peptídeos sintéticos imunorreativos contra autoanticorpos do soro de pacientes com câncer de próstata, apresentou um perfil protéico aparentemente superior ao PSA.

Através de tecnologias proteômicas pode-se identificar antígenos e anticorpos presentes durante a tumorigênese. Várias tecnologias vêm sendo utilizadas na identificação e detecção desses biomarcadores: eletroforese em gel bi-dimensional (CANELLE *et al.* 2005), *microarrays* (BRADFORD; WANG;

CHINNAIYAN, 2006), ELISA (KORNEEVA *et al.* 2000; YAGIHASHI *et al.* 2005 a e b; LARSON *et al.* 2006), *western-blot* (CANELLE *et al.* 2005), espectrometria de massa (CANELLE *et al.* 2005), modelamento computacional (CASTIGLIONE *et al.* 2005), SEREX (BRADFORD; WANG; CHINNAIYAN, 2006; DUNPHY *et al.* 2006), imunohistoquímica (COOMBER; WARD, 2001), cromatografia (ZIMERING; THAKKER-VARIA, 2002), biossensores (HUANG *et al.* 2006), e *phage display* (HANSEN; OSTENSTAD; SIOUD, 2001a; HANSEN; OSTENSTAD; SIOUD, 2001b; DYBWAD; SIOUD; ZOULI, 2003; MINTZ *et al.* 2003; FOSSA *et al.* 2004; BRADFORD; WANG; CHINNAIYAN, 2006; DUNPHY *et al.* 2006).

Antígenos e anticorpos anti-tumor, mono ou policlonais, também podem ser utilizados no tratamento do câncer por imunoterapia (HAANRD; HENDRIX; HOOGENBOOM, 1998; PINTHUS *et al.* 2004; DU *et al.* 2006; JÄGER; KNUTH, 2005; DUNPHY *et al.* 2006).

A imunoterapia para diversos tipos de câncer, incluindo o câncer de próstata, tem sido considerada uma modalidade adicional para a manutenção do tratamento, utilizando, basicamente duas estratégias: passiva, pela aplicação de anticorpos anti-antígenos tumorais, e a ativa com a administração de vacinas anti-tumor. Estas últimas representam uma modalidade de tratamento capaz de induzir a resposta imune anti-tumor mediada por células efectoras do sistema imunológico, tais como linfócitos CD4, linfócitos-T CD8 e células NK (JÄGER; KNUTH, 2005; DUNPHY *et al.* 2006).

2 PHAGE DISPLAY

Há grande necessidade de descobertas de biomarcadores para detecção não invasiva, classificação e estadiamento do câncer de próstata. Proteínas prostáticas câncer-específicas podem ser identificadas para a utilização como marcadores em diagnóstico e prognóstico na terapia efetiva do câncer de próstata (LEINONEN *et al.* 2000; ROMANOV; DURAND; PETRENKO, 2001). A tecnologia de bibliotecas de peptídeos apresentadas em fagos, conhecida como "*phage display*", tem sido extremamente importante para a identificação e

caracterização de novos ligantes de alta afinidade e seus receptores de uma infinidade de doenças, incluindo câncer, doenças infecciosas, cardiovasculares e autoimunes.

A possibilidade de expressão de uma proteína de fusão no capsídeo de fagos, de maneira acessível ao reconhecimento por um ligante, demonstrada em 1985 por Smith, abriu o caminho para a construção de bibliotecas conformacionais apresentadas na superfície destas partículas virais.

Phage display é uma técnica eficiente para identificar peptídeos ou proteínas que se ligam a outras moléculas com diversas finalidades, como mapeamento de epítomos reconhecidos por anticorpos. A tecnologia é baseada no princípio de que polipeptídeos podem ser expressos na superfície de fagos filamentosos pela inserção de um segmento de DNA codificante no genoma dos mesmos, de modo que o peptídeo ou proteína expressado fica exposto na superfície da partícula fusionado a uma proteína endógena.

Bibliotecas de peptídeos geradas por *phage display* são extensivamente aplicadas na descoberta de uma grande variedade de polipeptídeos incluindo anticorpos, receptores e enzimas (HAARD *et al.* 1998). Epítomos ou determinantes antigênicos, regiões de reconhecimento do antígeno pelos anticorpos, podem também ser identificados através da metodologia de *phage display* (STEPHEN; HELMINEN; LANE, 1995).

A metodologia de bibliotecas mais amplamente utilizada é baseada no uso de fago filamentosos (SMITH, 1985), um bacteriófago que infecta *Escherichia coli* do gênero masculino (BENHAR, 2001).

Bacteriófagos, ou simplesmente fagos, são vírus que infectam uma variedade de bactérias Gram-negativas usando *pili* como receptores. Partículas de fagos filamentosos (Ff-cepas M13, f1 e fd) que infectam *E. coli* via F *pili*, consiste em uma fita simples de DNA que é envolvida em uma cápsula protéica.

A classe Ff de bacteriófagos filamentosos (f1, fd, e M13) tem sido amplamente estudada. Esses fagos são formados por uma fita simples de DNA envolta por uma capa protéica constituída por cinco proteínas (pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX) (FIGURA 3A). Das cinco proteínas presentes no capsídeo viral existem aproximadamente 2800 cópias de 50 aminoácidos da pVIII. Os monômeros da proteína pVIII estão presentes na partícula como uma α -hélice, exceto 5 resíduos

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

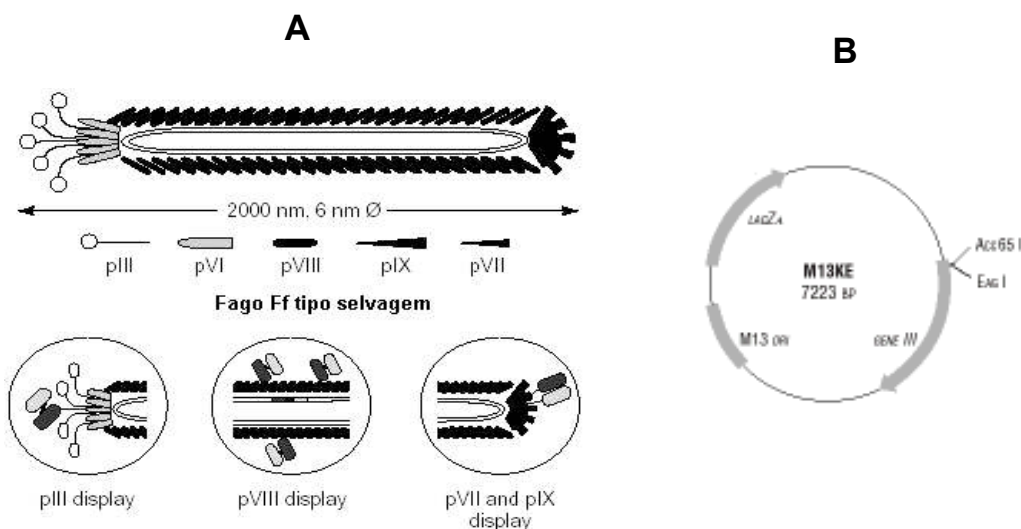


FIGURA 3. (A) Esquema representativo de um bacteriófago de classe Ff ilustrando as proteínas do capsídeo viral e três modelos de exposição de peptídeos respectivamente nas proteínas pIII, pVIII e simultaneamente nas proteínas pVII e pIX; em (B) Esquema representativo do genoma viral (disponível em: <http://www.molgen.mpg.de/~in-vitro/technology.html>).

Em uma extremidade da partícula existem 5 cópias, (33 resíduos de aminoácidos da pVII e 32 da pIX) de cada uma das proteínas hidrofóbicas pVII e pIX. Estas proteínas não são bem conhecidas, porém estudos sugerem que uma interaja com o DNA e a outra esteja exposta na superfície. A outra extremidade contem aproximadamente 5 moléculas de 112 resíduos de aminoácidos na pVI e 406 resíduos na pIII. Não se sabe muito sobre a estrutura da pVI, porém sabe-se que ela interage com a pIII. A pIII está relacionada com a infectividade do fago pela ligação ao *pilus F* da célula bacteriana. Ela apresenta três domínios ricos em glicina (D1, D2 e D3). O domínio D1 contém 68 resíduos de aminoácidos da extremidade amino-terminal, sendo necessário durante a infecção por

translocação de DNA e inserção de proteínas do capsídeo dentro da membrana. O domínio D2 estende-se do resíduo 87 ao 217 e é responsável pela ligação do pilus F. Ambos os domínios contêm moléculas de cisteína que formam pontes dissulfeto dentro de cada domínio. Estudos cristalográficos estruturais dos domínios D1 e D2 mostraram uma conformação semelhante à ferradura de cavalo. A extremidade carboxi-terminal é constituída de 150 resíduos de aminoácidos formando o domínio D3 que dá estabilidade à proteína e interage com a pVI formando uma das extremidades da partícula (BARBAS *et al.* 2001).

Phage display é baseado em clonagem de fragmentos de DNA codificante de milhares de variantes de certos ligantes (ex: peptídeos, proteínas ou fragmentos destas) no interior do genoma de fagos, fusionado ao gene codificante de uma das proteínas do capsídeo deste fago (geralmente pIII, como dito anteriormente, mas também pIV, pVI ou pVIII) (FIGURA 3B). A fusão com a proteína do capsídeo é incorporada às novas partículas de fago que são montadas no espaço periplasmático da bactéria. Expressão do produto do gene fusionado e sua subsequente incorporação à proteína capsidial já madura resulta na exposição do ligante na superfície do fago, enquanto seu material genético reside no interior do fago (BENHAR, 2001). Devido a baixa representatividade da pIII em relação a pVIII as bibliotecas de peptídeos sintéticos fusionados na pIII são mais indicadas para descoberta de ligantes com alta afinidade, quando comparadas com as bibliotecas pVIII ligadas (BRÍGIDO; MARANHÃO, 2002).

Uma das vantagens do uso do bacteriófago é que fagos filamentosos não geram uma infecção lítica em *E. coli*, mas preferencialmente induz um estado na qual a bactéria infectada produz e secreta partículas de fago sem sofrer lise. A infecção é iniciada pelo acoplamento da pIII do fago ao f *pilus* de uma *E. coli* do gênero masculino. Somente o DNA de fita simples e circular do fago penetra na bactéria onde é convertido pela maquinaria de replicação do DNA bacteriano em uma forma replicativa de plasmídeo de fita dupla. Esta forma replicativa sofre constantes replicações do DNA circular para gerar DNA de fita simples e ainda servir como molde para expressão das proteínas de fago pIII e pVIII. A progênie do fago é montada por empacotamento do DNA de fita simples em capsídeos protéicos e expulsos da bactéria através da membrana no meio (AZZAZY; HIGHSMITH, 2002).

O vetor M13KE, derivado do vetor de fagos m13mp19 possui uma rápida propagação e não necessita de seleção por antibiótico ou superinfecção por fago *helper*. Além disto, o gene *lacZ*, presente neste vetor, facilita a distinção entre colônias bacterianas infectadas com fagos de bibliotecas (colônias azuis) e colônias não infectadas ou infectadas com fagos selvagens (colônias brancas) (MESSING *et al.* 1977; MESSING, 1983). O vetor M13KE permite a construção e propagação de bibliotecas de *phage display* pelo uso de técnicas padronizadas para fagos M13 (BARBAS *et al.* 2001).

O sistema *phage display* foi criado para a exposição de pequenos peptídeos na biblioteca (no máximo 30 aminoácidos) (PHIZICKY; FIELDS, 1995). Isto porque o tamanho da proteína inserida no vetor deve ser limitado, pois grandes proteínas interferem nas funções das proteínas do capsídeo, tornando o fago pouco infectivo.

A exposição em fagos apresenta vantagens sobre outras tecnologias pela facilidade de mapear grande número de clones simultaneamente. Bibliotecas de cDNA, tal como as expressas em fagos lambda, é limitada pelo número de colônias com o qual podem ser detectadas por hibridização, tipicamente na ordem de 10^4 . Tecnologias baseadas em síntese química (química combinatorial) apresentam um limite máximo de peptídeos randômicos que podem ser mapeados com 10^3 a 10^4 seqüências diferentes (NOREN; NOREN, 2001).

A apresentação de fragmentos de anticorpos na superfície de fagos torna possível, dentre outras coisas, mimetizar a seleção que ocorre em nível do sistema imune, através da randomização de seqüências nas regiões codificadoras das CDRs (Regiões Determinantes de Complementaridade) ou da construção de bibliotecas combinatórias de VH e de VL de animais imunizados ou de pacientes. Esse tipo de biblioteca pode ser obtida a partir de amplificações, via PCR, de cDNA de tecidos que apresentam as regiões variáveis das cadeias leve e pesada de todo o repertório imune dos pacientes ou animais imunizados. Assim é possível se obter o repertório de cadeias variáveis leves e pesadas. A construção de bibliotecas combinatoriais do repertório de anticorpos Fv de cadeia única (scFv) ou Fab provaram ser uma ferramenta importante para a produção de anticorpos-combinatoriais altamente específicos que podem ser prontamente convertido em mAbs. Bibliotecas de anticorpos usadas são geralmente

construídas em vetores de fagomídeos que em média expressam apenas uma única molécula de scFv em cada partícula viral. Liu *et al.* (2004) construiu uma biblioteca de anticorpos de câncer de próstata onde três a cinco moléculas de scFv idênticas são exibidas por phage. Críticas ao *phage display* sugerem que a geração de bibliotecas combinatoriais de anticorpos gera Fabs com especificidade que não está presente no tecido original. Vários estudos têm demonstrado que esses anticorpos reagem semelhantemente aos originais (COOMBER; WARD, 2001).

O sucesso de seleção por *phage display* depende da complexidade da biblioteca: a maior diversidade de clones dentro da biblioteca aumenta a probabilidade de conter seqüências que ligarão a um determinado alvo com maior afinidade (NOREN; NOREN, 2001).

Bibliotecas de peptídeos randômicos compreendem um vasto número de peptídeos de um dado tamanho (10^7 - 10^9), onde suas seqüências são geradas aleatoriamente por uma variedade de resíduos de aminoácidos em cada posição. Os peptídeos expressos, em forma linear ou circular, são capazes de mimetizar estruturas conformacionais e epítomos contínuos ou descontínuos. A construção dessas bibliotecas é feita principalmente pela inserção de oligonucleotídeos degenerados aleatoriamente sintetizados quimicamente no gene que codifica a proteína do capsídeo (ROMANOV; DURAND; PETRENKO, 2001; AZZAZY; HIGHSMITH, 2002; DYBWAD; SIOUD; ZOUALI, 2003). Essas bibliotecas podem ser adquiridas comercialmente o que garante melhor a manutenção da variabilidade.

As bibliotecas de peptídeos comerciais de 7 e 12-mer apresentam uma complexidade de 2 bilhões de clones independentes, que contém muitas se não todas as $1,28 \times 10^9$ possíveis seqüências heptapeptídicas nas bibliotecas de 7-mer e C7C-mer e $4,1 \times 10^{15}$ seqüências possíveis nas bibliotecas 12-mer (http://www.neb.com/nebecomm/tech_reference/drug_discovery/phdFaq.asp#3.1).

A seleção de seqüências baseada na afinidade de ligação do fago a uma molécula alvo é feita por um processo de seleção *in vitro* denominado *biopanning* (PARMLEY; SMITH, 1988). A seleção, ou *biopanning*, é realizada pela incubação da biblioteca de peptídeos expostos em fagos contra o alvo. O alvo é imobilizado em um suporte sólido tais como placas de ELISA, microesferas magnéticas ou de

afinidade, resinas e membranas. Os fagos não ligantes ao alvo são eliminados por lavagens sucessivas, e os fagos específicos permanecem ligados para posterior eluição. O *pool* de fagos específicos é amplificado para os ciclos posteriores de seleção biológica ou *biopanning* (ciclos de ligação, eluição e amplificação) para o enriquecimento do conjunto de fagos com seqüências específicas contra o alvo. Após três ou quatro passagens, os clones individuais são caracterizados por seqüenciamento de DNA, *western blotting* ou ELISA (SMITH, 1985). Para melhor entender o processo de seleção é apresentado na Figura 4 um esquema ilustrativo do processo de *biopanning*.

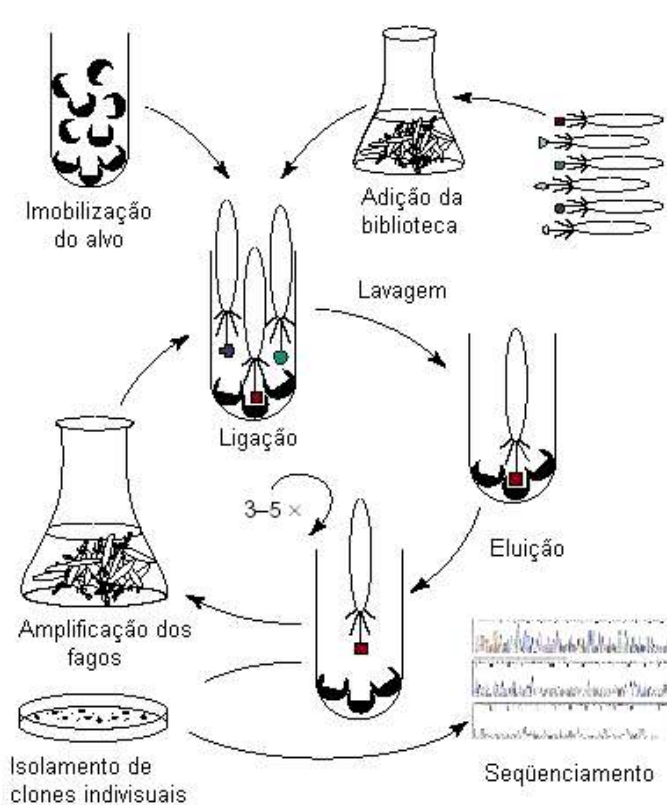


FIGURA 4. Esquema representativo do processo de *Biopanning*. Imobilização do alvo e incubação da biblioteca de fagos, retirada dos fagos não ligados por lavagens sucessivas, eluição dos fagos ligados e infecção de *E. coli*, amplificação dos fagos eluídos e seqüenciamento da população de fagos com maior afinidade pelo alvo (disponível em: <http://www.molgen.mpg.de/~in-vitro/technology.html>).

A tecnologia de *phage display* pode levar à produção de uma enorme gama de ligantes, incluindo anticorpos recombinantes e peptídeos, com especificidades predefinidas. Além disso, tecnologias emergentes baseadas em *phage display* pode beneficiar diagnósticos através da produção de moléculas que de outras formas seria impossível obter por métodos tradicionais. Foram expressos na superfície viral anticorpos (BARBAS *et al.* 1992; LIU *et al.* 2004; HOOGENBOOM, 1997; RADER; BARBAS, 1997), peptídeos (NOREN; NOREN, 2001), enzimas (SOUMILLION, 1994), receptores de superfície celular (ROBERTSON, 1993), entre outras estruturas.

Phage display pode ser utilizado também *in vivo* para identificar peptídeos que se ligam em órgãos específicos. Neste caso, a biblioteca de fagos é injetada por via intravenosa, geralmente em roedores, e após o período de incubação os órgãos de interesse são removidos e os fagos ligados por afinidade são eluídos e analisados (ARAP, 2005). Embora essa abordagem venha sendo utilizada apenas em animais, Arap *et al.* (2002) utilizaram o *biopanning in vivo* em humanos para o mapeamento de receptores ligantes de vasos sanguíneos de um paciente com câncer. Comparado com a abordagem *in vivo*, a tecnologia de *phage display in vitro*, é mais rápida e simples, pois não são necessários construção de modelos em camundongos e *screening* contra a complicada vasculatura e muitos tipos de tecidos normais (DU *et al.* 2006).

Um moderno planejamento de diagnóstico seria um anticorpo recombinante fusionado na superfície de um biossensor capaz de gerar detecção em tempo real de antígenos-alvo (AZZAZY; HIGHSMITH, 2002).

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

conjugados com moléculas que induzem diferentes efeitos antigênicos (BORYSOWSKI; GORSKI, 2004).

Vários trabalhos têm relatado a identificação, pela tecnologia de *phage display*, de peptídeos que mimetizam biomoléculas específicas em diversos tipo de câncer, como por exemplo: mama (HANSEN; OSTENSTAD; SIOUD, 2001a; HANSEN; OSTENSTAD; SIOUD, 2001b), hepatocarcinoma (DU *et al.* 2006), mieloma (DYBWAD; SIOUD; ZOUALI, 2003), fibrosarcoma (POPKOV *et al.* 2000), coloretal (COOMER; WARD, 2001), câncer gástrico (HU *et al.* 2006), próstata e testículo (FOSSA *et al.* 2004), entre outras. As aplicações dos peptídeos expressos em fagos no câncer têm sido as mais variadas, dentre elas: mapeamento da diversidade tumoral (HANSEN; OSTENSTAD; SIOUD, 2001b; DYBWAD; SIOUD; ZOUALI, 2003; LIU *et al.* 2004) a seleção de peptídeos que inibem metástase (HU *et al.* 2006), peptídeos miméticos de oncogenes (STEPHEN; HELMINEN; LANE, 1995; COOMER; WARD, 2001), receptores vasculares (ZURITA; ARAP; PASQUALINI, 2003; ARAP *et al.* 2002) e muitos peptídeos relacionados a fatores de crescimento (CAMPA; SERLIN; PATZ Jr, 2002, HETIAN *et al.* 2002). Os peptídeos selecionados podem ser utilizados de diversas maneiras, inclusive no tratamento do câncer através do endereçamento vascular dos peptídeos (NILSSON *et al.* 2000) e de alvos em imunoterapia (POPKOV *et al.* 2000).

Proteínas prostáticas câncer-específicas podem ser identificadas para a utilização como marcadores em diagnóstico e prognóstico na terapia efetiva do câncer de próstata (LEINONEN *et al.* 2000; ROMANOV; DURAND; PETRENKO, 2001). A tecnologia de *phage display* tem sido largamente empregada no estudo do câncer de próstata (ROMANOV; DURAND; PETRENKO, 2001; ZURITA *et al.* 2004; LIU *et al.* 2004; DYBWAD; SIOUD; ZOUALI, 2003; MINTZ, *et al.* 2003; FOSSA *et al.* 2004; BRADFORD; WANG; CHINNAIYAN, 2006; DUNPHY *et al.* 2006, HEKIN *et al.* 2006). Esses trabalhos têm identificado peptídeos relacionados com marcadores e proteínas prostáticas, como receptor de andrógeno AR (HSU *et al.* 2003), PSA (COREY *et al.* 1997; MICHEL *et al.* 1999; WU *et al.* 2000; WU *et al.* 2004; FERRIEU-WEISBUCH *et al.* 2006) calicreína 2 (HEKIM *et al.* 2006), receptor α da interleucina 11 (ZURITA *et al.* 2004).

3 PLATAFORMAS TECNOLÓGICAS: IMUNOENSAIOS COM MICROESFERAS

O desenvolvimento de novas metodologias favorecendo o diagnóstico mais efetivo, rápido e confiável de doenças infecciosas, autoimunes ou genéticas faz-se necessário.

Com acurácia e alta sensibilidade os biossensores são capazes de detectar com precisão, biomoléculas em quantidades ínfimas de forma rápida e específica (ROBINSON, 1995).

Os tipos mais comuns de biossensores são baseados em: (1) interações de antígeno/anticorpo, (2) interações de ácidos nucleicos, (3) interações enzimáticas, (4) interações celulares e (5) interações que usam materiais de biométricos (por exemplo, bioreceptores sintéticos). Os métodos mais prevalentes de sinal de transdução incluem: (1) medidas óticas (por exemplo, luminescente, absorção, etc.), (2) eletroquímica (potenciométrica, amperométrica, etc.) e (3) medidas massa-sensíveis (superfície onda acústica, microbalança, etc.). Uma classe especial de biossensores, tipicamente conhecido como biochips, tem elementos de transdução múltiplos e é baseado em microchips de circuito integrado. O termo “biochip” vem da palavra “chip” de computador que é um substrato baseado em silicone usado na fabricação de circuitos eletrônicos miniaturizados (VO-DINH; CULLUM; STOKES, 2001).

Muitos testes e ensaios utilizam partículas de tamanho micrométricas, ou microesferas, como substrato ou suporte para reações imunológicas e separação de micromoléculas e partículas subcelulares. Microesferas são partículas de polímeros esféricos de diferentes tamanhos e compostos por diversos materiais, dependendo da utilização, tais como poliestireno, sílica e magnéticas. Microesferas menores que 1µm são denominadas nanoesferas e sua utilização depende do teste a ser realizado. Estas partículas podem ter sua superfície ativada com diversos grupamentos químicos para a ligação de uma infinidade de substâncias. Após as microesferas terem sido ativadas, elas podem ser preparadas para a ligação (acoplamento) de ligantes, normalmente proteínas. Microesferas magnéticas são utilizadas para a detecção e purificação de proteínas e anticorpos, sendo comumente utilizadas também para purificação de ácidos nucleicos.

O teste de aglutinação em látex (LAT) tem sido considerado um teste muito útil para descoberta de anticorpos em microbiologia clínica (BHASKAR; BANAVALLIKER; HANIF, 2003). Sensores baseados em nanoesferas de látex para ensaios de imunoaglutinação e separação em colunas cromatográficas ou visualizados em microscópio são também extremamente rápidos e sensíveis, sendo superiores aos métodos convencionais (ELISA e *Western blot*), por serem altamente ativados em toda sua superfície, que servem de suporte sólido para as sondas moleculares ou imunológicas, não necessitando de substratos enzimáticos. Além disso, grandes instalações e equipamentos, como leitores de ELISA podem não estar disponíveis em muitos centros (BHASKAR; BANAVALLIKER; HANIF, 2003; XU *et al.* 2005). Descoberta de anticorpo baseado em aglutinação de látex é um procedimento bem estabelecido e kits comerciais estão disponíveis para diagnósticos de muitas doenças bacterianas e virais (MADHUSUDANA; SARASWATI, 2003).

Dentre as variações dos testes de aglutinação “originais”, que consistem basicamente do uso de esferas de látex recobertas de antígenos específicos que reagem com os anticorpos presentes na amostra, provocando uma reação de aglutinação proporcional à concentração de anticorpos existentes, as mais recentes envolvem captura de partículas, imunoensaios, testes sanduíche com partículas ativadas e ensaios de fase sólida com esferas de sílica ou microesferas magnéticas.

Os testes de aglutinação com partículas de látex são utilizados há muito tempo para diagnóstico de diversas patologias, humanas e animais: descoberta de IgM para *Toxoplasma gondii* usando partículas de látex sensibilizadas com antígenos do parasito (REMYINGTON; EIMSTAD; ARAUJO, 1983), descoberta de anticorpos contra raiva, usando partículas de látex cobertas com vírus inteiro purificado (PERRIN; VERSMISSE; SUREAU, 1988), diagnóstico de tuberculose pulmonar e extrapulmonar em larga escala (BHASKAR; BANAVALLIKER; HANIF, 2003); monitoramento de anticorpos para vacinas contra o vírus da gripe aviária H5N1 (XU *et al.* 2005), acoplamento de microesferas a peptídeos sintéticos que contêm epítomos de *Mycobacterium bovis*, para o diagnóstico de bovinos contaminados (KOO *et al.* 2004). Uma vantagem adicional desse último teste é a sua utilização com várias espécies, não sendo necessária adição de nenhum reagente adicional.

Recentemente têm sido desenvolvidos sensores biológicos para diagnóstico do câncer de próstata pela detecção do PSA. Huang *et al.* (2005) desenvolveram um sensor baseado em um ensaio sanduíche envolvendo anticorpos monoclonais PSA-específicos biotinilados e ouro coloidal conjugado com estreptavidina para diminuir o limite de detecção de PSA, possibilitando a detecção de níveis de PSA total de cerca de 1ng/mL em concentrações clínicas relevantes. Sarkar *et al.* (2002) tentaram utilizar o procedimento de ELISA em um eletrodo amperométrico com bons resultados na detecção de PSA. O sensor pode ser produzido a um custo muito baixo e a detecção do PSA é feita dentro pouco tempo.

A metodologia de *phage display* pode fornecer antígenos que podem ser utilizados em biossensores. Marik *et al.* (2003) descrevem um método simples para preparar microesferas magnéticas de poliestireno acopladas a um peptídeo ligante, cNGRGEQc. Estas microesferas magnéticas são utilizadas para uma seletiva e eficiente recuperação de células de câncer de fluidos do corpo. Os fagos podem ser usados como elemento de reconhecimento nos biossensores usando a adsorção física em uma superfície de ouro de um sensor em microbalança de cristal de quartzo (QCM) com alta especificidade quando analisados por ELISA. O método de adsorção física é simples e econômico, o sensor demonstra especificidade e afinidade (SAROKULOVA *et al.* 2006). Imunoensaios em gel teste (PaGIAs) são métodos estabelecidos em sorologia de grupos sanguíneos e foi introduzido para descoberta de doenças infecciosas (RABELLO *et al.* 1999). Fagos M13 com 12 resíduos de aminoácidos fusionados na proteína pIII, são provavelmente os mais indicados para a ligação à microesferas ativadas com aldeídos, pois provavelmente estas se ligam aos fagos pelas extremidades amino-terminais da proteína pVIII, que é mais abundante na molécula, não interferindo na reatividade do peptídeo recombinante com as imunoglobulinas de interesse.

Apesar de importantes avanços no entendimento de vários aspectos da resposta imune em diversas moléstias e da existência de diversas modalidades terapêuticas, o número de pacientes ainda sem diagnóstico ou com tratamento ineficaz é alarmante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

ALLEN, N. E., SAUVAGET, C., RODDAM, A. W., APPLEBY, P., NAGANO, J., SUZUKI, G., KEY, T. J., KOYAMA, K. A prospective study of diet and prostate cancer in Japanese men. *Cancer Causes and Control*, v. 15, p. 911-920, 2004.

ALMEIDA, J. C. O estudo histopatológico da biópsia prostática. In: WROCLAWSKI, E. R., BENDHACK, D. A., DAMIÃO, R., ORTIZ, V. *Guia Prático de Urologia*. São Paulo: Segmento, 2003. cap. 133, p. 447-449.

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, 2003. cap. 130, p. 437-438.

ARAP, M.A. Phage display technology: applications and innovations. *Genet Mol Biol*, v.28, n.1, p.1-9, 2005.

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

AZZAZY, H.M., HIGHSMITH, W.E. Jr. *Phage display* technology: clinical applications and recent innovations. *Clin Biochem*, v. 35, p. 425-445, 2002.

BARBAS III C.F., BAIN J.D., HOEKSTRA D.M., LERNER R.A. Semisynthetic combinatorial antibody libraries: a chemical solution to the diversity problem. *Proc Natl Acad Sci*, v. 89, p. 4457, 1992.

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*, v. 44, p. 193-198, 2004.

BENDHACK, M. L., SOBREIRO, B. Repercussão socioeconômica da câncer de próstata. In: WROCLAWSKI, E. R., BENDHACK, D. A., DAMIÃO, R., ORTIZ, V. *Guia Prático de Urologia*. São Paulo: Segmento, 2003. cap. 124, p. 421-422.

BENHAR, I. Biotechnological applications of phage and cell display. *Biotechnol Adv*, v. 19, 1-33, 2001.

BHASKAR, S., BANAVALLIKER, J.N., HANIF, M. Large-scale validation of a latex agglutination test for diagnosis of tuberculosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 39, p. 235-239, 2003.

BOK, R.A., SMALL, E.J. Bloodborne biomolecular markers in prostate cancer development and progression. *Nature Reviews*, v. 2, p. 918-926, 2002.

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

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*, v. 24, p. 237-242, 2006.

BRÍGIDO, M.M., MARANHÃO, A.Q. Bibliotecas Apresentadas em FAGOS *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, n. 26, 2002.

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

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

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*, v. 27, p. 1609-1616, 2006.

CARTER, B. S., BEATY, T. H., STEINBERG, G. D., CHILDS, B., WALSH, P.C. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc Natl Acad Science*, v. 89, p. 3367-3371, 1992.

CASIANO, C.A., MEDIAVILLA-VARELA, M., TAN, E.M. Tumor-associated antigen arrays for the serological diagnosis of cancer. *Mol Cell Proteomics*. 2006 (in press).

CASTIGLIONE, F., TOSCHI, F., BERNASCHI, M., SUCCI, S., BENEDETTI, R., FALINI, B., LISO, A. Computational modeling of the immune response to tumor antigens. *J Theor Biol*, v. 237, n. 4, p. 390-400, 2005.

CATALONA, W. J., BARTSCH, G., RITTENHOUSE, H.G., EVANS, C.L., LINTON, H.J., AMIRKHAN, A., HORNINGER, W., KLOCKER, H., MIKOLAJCZYK, S.D. Serum pro prostate specific antigen improves cancer detection compared to free and complexed prostate specific antigen in men with prostate specific antigen 2 to 4 ng/ml. *The Journal Of Urology*, Baltimore, v. 170, n. 6, p. 2181-2185, 2003.

CATALONA, W. J., DRESNER, S. M. Nerve-sparing radical prostatectomy: extraprostatic tumor extension and preservation of erectile function. *The Journal of Urology*, Baltimore, v 134, p 1.149, 1.985.

CATALONA, W. J., RICHIE, J. P., AHMANN, F. R. Comparison of DRE and serum PSA in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. *The Journal of Urology*, Baltimore, v 151, p 1.283-1.290, 1994.

CATALONA, W. J., SMITH, D. S. Cancer recurrence and survival rates after anatomic radical retropubic prostatectomy for prostate cancer intermediate-term results. *The Journal of Urology*, v. 160, p. 2428-2434, 1998.

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

CHAN, J. M., STAMPFER, M. J., GIOVANNUCCI, E. L. What causes prostate cancer? A brief summary of the epidemiology. *Seminars in Cancer Biology*, v. 8, p. 263-273, 1998.

CHANG, G. T. G., STEENBEEK, M., SCHIPPERS, E., BLOK, L. J., VAN WEERDEN, W. M., VAN ALEWIJK, D. C. J. G., EUSSEN, B. H. J., VAN STEENBRUGGE, G. J., BRINKMANN, A. O. A novel gene on human chromosome 2p24 is differentially expressed between androgen-dependet and androgen-independent prostate cancer cells. *European Journal of Cancer*, v. 37, p. 2129-2134, 2001.

COFFEEY, D. S. Prostate cancer: an overview of an increasing dilemma. *Cancer (Suppl.)*, v. 71, p.880-886, 1993.

COFFEY, D. S. The molecular biology, endocrinology, and physiology of the prostate and seminal vesicles. In: WALSH, P. C., RETIK, A. B., STAMEY, T. A., VAUGHAN, E. D. *Campbell's Urology*. vol.1. 6^a ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, cap. 6, p. 221-251, 1992.

COOMBER, D.W., WARD, R.L. Isolation of human antibodies against the central DNA binding domain of p53 from an individual with colorectal cancer using antibody phage display. *Clin Cancer Res*, v. 7, n. 9, p- 2802-2808, 2001.

COREY E, WEGNER SK, COREY MJ, VESSELLA RL. Prostate-specific antigen: characterization of epitopes by synthetic peptide mapping and inhibition studies. *Clin Chem*, v. 43, n. 4, p. 575-584, 1997.

COVINI, G., VON MTIHLEN, C.A., PACCHETTI, S., COLOMBO, M., GHAN, E.K.L., Diversity of antinuclear antibody responses in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, v. 26, n. 6, p.1255-1265, 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*, v. 30, n. 4, p. 403-408, 1982.

CURY, J., NARDOZZA-JUNIOR, A. Epidemiologia e história natural. In: WROCLAWSKI, E. R., BENDHACK, D. A., DAMIÃO, R., ORTIZ, V. *Guia Prático de Urologia*. São Paulo: Segmento, cap. 75, p. 265-269, 2003.

DAMIÃO, R., CARRERETE, F. B. Por que a próstata cresce? In: WROCLAWSKI, E. R., BENDHACK, D. A., DAMIÃO, R., ORTIZ, V. *Guia Prático de Urologia*. São Paulo: Segmento, cap. 74, p. 261-263, 2003.

D'AMICO, A. V., CHEN, M. H., COX, M.C., DAHUT, W., FIGG, W.D. Preoperative PSA velocity and the risk of death from prostate cancer after radical prostatectomy. *New England Journal of Medicine*, Waltham, v 351, n 2, p 125-135, 2004.

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.

DILLIOGLUGIL O., LEIBMAN, B. D., KATTAN, M. W., SEALE-HAWKINS, C., WHEELER, T. M., SCARDINO, P. T. Hazard rates for progression after radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer. *Urology*. v. 50, p. 93-99. 1997.

DISIS ML, PUPA SM, GRALOW JR, DITTADI R, MENARD S, CHEEVER MA. High-titer HER-2/neu protein-specific antibody can be detected in patients with early-stage breast cancer. *J Clin Oncol*, v. 15, n. 11, p. 3363-3367, 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*, v. 342, n. 3, p. 956-962, 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, v. 1, n. 2, p. 273-284, 2006.

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

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

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

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

GIMBA, E. R. P., BARCINSKI, M. A. Molecular aspects of prostate câncer: implications for future directions. *International Braz. J. Urol*, v. 29, p. 401-411. 2003.

GLEASON, D. F. Histologic grading and clinical staging of prostatic carcinoma. In: Tannenbaum, M (Ed). *Urologic Pathology: The prostate*. Philadelphia: Lea e Febiger, 1977, 121 p.

GRIFFITHS, K., MORTON, M. S. Aspects of the cell biology 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, cap. 4, p. 51-74.

HAARD, H., HENDERIKX, P., HOOGENBOOM, H.R. Creating and engineering human antibodies for immunotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 31, p. 5-31, 1998.

HANSEN, M.H., OSTENSTAD, B., SIOUD, M. Antigen-specific IgG antibodies in stage IV long-time survival breast cancer patients. *Molecular Medicine*. v. 7, n. 4, p. 230-239, 2001a.

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

HEKIM, C., LEINONEN, J., NÄRVÄNEN, A., KOISTINEN, N., ZHU, L., KOIVUNEN, E., VAISÄNEN, V., STENMAN, U.H. Novel Peptide Inhibitors of Human Kallikrein 2. *The Journal Of Biological Chemistry*, v. 281, n. 18, p. 12555–12560, 2006.

HERING, F. L. Epidemiologia e história natural. In: WROCLAWSKI, E. R., BENDHACK, D. A., DAMIÃO, R., ORTIZ, V. *Guia Prático de Urologia*. São Paulo: Segmento, 2003. cap. 125, p. 423-424.

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

HOOGENBOOM, H.R. Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies. *Trends Biotechnol*, v.15, p. 62-70, 1997.

HOUGHTON, A.N., GOLD, J.S., BLACHER, N.E. Immunity against cancer: lessons learned from melanoma. *Current Opinion in Immunology*, v. 13, p.134–140, 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*, v. 278, n. 26, p. 23691-23698, 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*, v. 341, n. 4, p. 964-972, 2006.

HUANG, L., REEKMANS, G., SAERENS, D., FRIEDT, J.M., FREDERIX, F., FRANCIS, L., MUYLDERMANS, S., CAMPITELLI, A., VAN HOOFF, C. Prostate-specific antigen immunosensing based on mixed self-assembled monolayers, camel antibodies and colloidal gold enhanced sandwich assays. *Biosens Bioelectron*, v. 21, n. 3, p. 483-490, 2005.

HYROYOSHI, S., AKAKURA, K., IGARASHI, T. et al, Clinical usefulness of serum Anti-p53 antibodies for prostate cancer detection: A comparative study with prostate specific antigen parameters. *The Journal of Urology*, Baltimore, v 171, n 1, p 182-186, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Câncer de Próstata. Disponível em: <<http://www.inca.org.br/cancer/tipos/próstata>>. Acesso em: 23 ago. 2006.

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

JÄGER, D., KNUTH A. Antibodies and vaccines—hope or illusion?. *The Breast*, v. 14, n. 6, p. 631-635, 2005.

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. cap.

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

KOO, H.C., PARK, Y.H., AHN, J., WATERS, W. R., HAMILTON, M.J., BARRINGTON, G., MOSAAD, A.A., PALMER, M.V., SHIN, S., DAVIS, W.C. New Latex Bead Agglutination Assay for Differential Diagnosis of Cattle Infected with *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. *Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 11, n. 6, p. 1070–1074, 2004.

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*, v. 183, n. 1, p. 18-21, 2000.

LANGE, P. H., ERCOLE, C. J., VESSELA, R. Tumor markers in the follow-up of initial therapy of prostate cancer. In Lange, P H: Tumor markers in prostate cancer. Amsterdam, *Excerpta Medica*, 1986, 125 p.

LAPIDES, J. *Urologia*. Rio de Janeiro: Intramericana, 1979. 376 p.

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*, v. 24, n. 3, p. 195-200, 2006.

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*, v. 2, p. 70-78. 2001.

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

LV, S., ZHANG, J., WU, J., ZHENG, X., CHU, Y., XIONG, S. Origin and anti-tumor effects of anti-dsDNA autoantibodies in cancer patients and tumor-bearing mice. *Immunol Lett*, v. 99, n. 2, p. 217-227, 2005.

MACHADO, M. T., CINTRA, C. C. Prevenção do câncer de próstata. In: WROCLAWSKI, E. R., BENDHACK, D. A., DAMIÃO, R., ORTIZ, V. *Guia Prático de Urologia*. São Paulo: Segmento, 2003. cap. 126, p. 425-427.

MADHUSUDANA, S.N. SARASWATI, S. Development and evaluation of a latex agglutination test for rabies antibodies. *Journal of Clinical Virology*, v. 27, p. 129-135, 2003.

MADRID, F.F. Autoantibodies in breast cancer sera: candidate biomarkers and reporters of tumorigenesis. *Cancer Letters*, v. 230, n. 2, p. 187-198, 2005.

MARIK, J., LAU, D.H., SONG, A., WANG, X., LIU, R. LAM, K.S. Magnetization of large polystyrene peptide beads for capturing and expanding cancer cells. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 264, p. 153–157, 2003.

McNEAL, J. E. Regional morphology and pathology of the prostate. *Am J Clin Pathol*, v. 49, p. 347. 1968.

McNEAL, J. E. *Anatomy of the prostate*: An historical survey of divergent views. *Prostate*. v. 1, p. 3. 1980.

McNEAL, J. E. The zonal anatomy of the prostate. *Prostate*. v. 1, p. 35. 1981.

McNEAL, J. E. Normal histology of the prostate . *Am J Surg Pathol*, v. 12, p. 619. 1988.

MESSING, J., GRONENBORN, B., MULLER, H.B., HANS, H.P. Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle: Insertion of a *HindIII* fragment of the lac regulatory region in M13 replicative form in vitro. *Proc Natl Acad Sci*, v. 74, p. 3642-3646, 1977.

MESSING, J. New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol*. v. 101, p. 20-78, 1983.

MICHEL, S., DELEAGE, G., CHARRIER, J.P., PASSAGOT, J., BATTAIL-POIRO,T.N., SIBAI, G., JOLIVET, M., JOLIVET-REYNAUD, C. Anti-free prostate-specific antigen monoclonal antibody epitopes defined by mimotopes and molecular modeling. *Clin Chem*, v. 45, n. 5, p. 638-650, 1999.

MIKOLAJCZYK, S. D., SONG, Y., WONG, J. R., MATSON, R. S., RITTENHOUSE, H. G. Are multiple markers the future of prostate cancer diagnostics? *Clinical Biochemistry*. v. 37, p. 519-528, 2004.

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

MOORE, K. L., DALLEY, A. F. Pelve e Peíneo. In:_____. *Anatomia orientada para a clínica*. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap. 3, p. 294-376.

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

NOREN, K.A., NOREN, C.J. Construction of High-Complexity Combinatorial Phage Display Peptide Libraries. *METHODS*, v. 23, p.169–178, 2001.

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*, v. 10, p. 2313-2318. 2001.

OESTERLING, J. E., CHAN, D. W., EPSTEIN, J.I., EPSTEIN J.I., KIMBALL, A.W. JR, BRUZEK, D.J., ROCK, R.C., BRENDLER, C.B., WALSH, P.C. Prostate specific antigen in the preoperative and postoperative evaluation of localized prostatic cancer treated with radical prostatectomy. *The Journal of Urology*, Baltimore, v 139, p 766, 1988.

ORNSTEIN, D. K., RAYFORD, V. A., FUSARO, V. A., CONRADS, T.P., ROSS, S.J., HITT, B.A., WIGGINS, W.W., VEENSTRA, T.D., LIOTTA, L.A., PETRICIOIN, E.F. III. Serum proteomic profiling can discriminate prostate cancer from benign prostates in men with total specific antigen levels between 2.5 and 25 ng/ml. *The Journal of Urology*, Baltimore, v 172, n 4, p 1.302-1.305, 2004

PARMLEY, S., SMITH, G. Antibody-selectable filamentous fd phagevectors: affinity purification of target genes. *Gene*, v. 73, p. 305–318, 1988.

PARTIN, W.A., MANGOLD, D.L., WALSH, P.C., LAMM, D.M., WALSH, P.C., EPSTEIN, J.I., PEARSON, J.D. Contemporary update of prostate cancer staging nomograms (Partin Tables) for the new millennium. *Urology*, Secaucus, v 59, p 843-848, 2001.

PERRIN, P., VERSMISSE, P., SUREAU, P. A rabies agglutination test (RAT) for rabies antibodies. *J Biol Stand*, v. 16, p. 281-286, 1988.

PHIZICKY, E.M., FIELDS, S. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol*, v. 59, p. 94-123, 1995.

PIENTA, K.J., ESPER, P.S. Risk factors for prostate cancer. *Ann Intern Med*, v. 118, p. 793-803. 1993.

PINTHUS, J.H., WAKS, T., MALINA, V., KAUFMAN-FRANCIS, K., HARMELIN, A., AIZENBERG, I., KANETY, H., RAMON, J., ESHHAR, Z. Adoptive immunotherapy of prostate cancer bone lesions using redirected effector lymphocytes. *J Clin Invest*, v. 114, n. 12, p. 1774-1781, 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*, v. 6, n. 9, p. 3629-35, 2000.

PORKKA, K. P., VISAKORPI, T. Molecular mechanisms of prostate cancer. *European Urology*. p. 1-9, 2004.

RABELLO, A., A. O. LUQUETTI, E. F. MOREIRA, M. F. GADELHA, J. A. DOS SANTOS, L. DE MELO, AND P. SCHWIND. Serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection using the new particle gel immunoassay-ID-PaGIA Chagas. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 94, p. 77-82, 1999.

RADER, C., BARBAS III, C.F. Phage display of combinatorial antibody libraries. *Current Opinion in Biotechnology*. v. 8, p.503-508, 1997.

REMINGTON, J.S., EIMSTAD, W.M., ARAUJO, F.G. Detection of immunoglobulin M antibodies with antigen-tagged latex particles in an immunosorbent Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, v.17, n.5, p. 939-941, 1983.

RIFFENBURG, R., AMLING, C. L. Use of early PSA velocity to predict eventual abnormal PSA values in man at risk for prostate cancer. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*. v. 6, p. 39-44. 2003.

ROBERTSON, M. W. Phage and *Escherichia coli* expression of the human high affinity immunoglobulin E receptor alpha-subunit ectodomain. *J Biol Chem*, v.268, p.12736-12743, 1993.

ROBINSON, G. The commercial development of planar optical biosensors. *Sens. Actuators*, B 29, 31-36, 1995.

ROGERS, C.G., YAN, G., ZHA, S., GONZALGO, M.L., ISAACS, W.B., LUO, J., DE MARZO, A.M., NELSON, W.G., PAVLOVICH, C.P. Prostate cancer detection on uroanalysis for α -methylacyl coenzyme A racemase protein. *The Journal of Urology*, Baltimore, v 172, n 4, p 1.501-1.503, 2004.

ROHR, H. P., BARTSCH, G. Human benign prostatic hyperplasia: a stromal disease? New perspectives by quantitative morphology. *Urology*. v. 16, p. 625-633. 1980.

ROMANOV, V.I., DURAND, D.B., PETRENKO, V.A. Phage display selection of peptides that affect prostate carcinoma cells attachment and invasion, *The Prostate*, v. 47, p. 239-251, 2001.

SARKAR, P., PAL, P.S., GHOSH, D., SETFORD, S.J., TOTHILL, I.E. Amperometric biosensors for detection of the prostate cancer marker (PSA). *International Journal of Pharmaceutics*, v. 238, p. 1–9, 2002.

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

SCHRÖDER, F. H., HERMANEK, P., FAIR, W. R. DENIS, L., GOSPODAROWICZ, M.K., PAVONE-MACALUSO, M. The TNM classification of prostate cancer. *Prostate*, New York, v 4, p 129-138, 1992.

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

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

SOROKULOVA, I.B., SAMOYLOV, A.M., SIMONIAN, A.L., PETRENKO, V.A., VODYANOY, V. Phage as a molecular recognition element in biosensors immobilized by physical adsorption. *Biosensors and Bioelectronics*, In Press, Corrected Proof, Available online 30 May 2006.

SOUMILLION, P., JESPERS, L., BOUCHET, M., MARCHAND-BRYNAERT, J., WINTER G., FASTREZ, J. Selection of β -lactamase on filamentous bacteriophage by catalytic activity. *J Mol Biol*, v.237, p. 415-422, 1994.

SREEKUMAR, A., LAXMAN, B., RHODES, D.R., BHAGAVATHULA, S., HARWOOD, 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*, v. 96, p. 834–843. 2004

SROUGI, M. Câncer da Próstata. In: SCHOR, N., SROUGI, M. *Nefrologia, Urologia, Clínica*. São Paulo: Sarvier, 1998. cap. 40, p. 225-240.

SROUGI, M. *Próstata: isso é com você*. São Paulo: Publifolha, 2003. 125 p.

SROUGI, M., CURY, J. Hiperplasia Benigna da Próstata. In: SCHOR, N., SROUGI, M. *Nefrologia, Urologia, Clínica*. São Paulo: Sarvier, 1998, cap. 6, p. 501-506.

STAMEY, T. A., McNEAL, J. E. Adenocarcinoma of the prostate. In: WALSH, P. C., RETIK, A. B., STAMEY, T. A., VAUGHAN, E. D. *Campbell's Urology*. vol. 2. 6ª ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1992. cap. 29, p. 1159-1221.

STAMEY, T.A., KABALIN, J.N. Prostate specific antigen in the diagnoses and treatment of adenocarcinoma of the prostate: I. Untreated patients. *The Journal of Urology*, Baltimore, v 141, p 1.070-1.075, 1989.

STEINBERG, D.M., SAUVAGEOT, J., PIATANDOSI, S., EPTEIN, J.I. Correlation between needle biopsy and radical prostatectomy Gleason grade in academic and community settings. *American Journal of Surgery Pathology*, Philadelphia, v 21, p 566-576, 1997.

STEPHEN, C.W., HELMINEN, P., LANE, D.P. Characterisation of epitopes on human p53 using phage-displayed peptide libraries: insights into antibody-peptide interactions. *J Mol Biol*, v. 248, n. 1, p. 58-78, 1995.

TAM, E.M. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv Immunol*, v. 44, p. 93-151, 1989.

TAN, E.M. Diversity of antinuclear antibody responses in hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, v.26, p. 1255-1265, 1997.

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

VAN DE GRAAFF, K. M. Sistema genital masculino. In: *Anatomia humana*. 6ª ed. São Paulo: Manole, 2003. cap. 20, p. 697-723.

VO-DINH, T., CULLUM, B.M., STOKES, D.L.. Nanosensors and biochips: frontiers in biomolecular diagnostics. *Sensors and Actuators*, B 74, p. 2-11, 2001.

VOGES, G. E., MCNEIL, J. E., REDWINE, E.A., FREIHA, F.S., STAMEY, T.A. Morphologic analysis of surgical margins with positive findings in prostatectomy for adenocarcinoma of the prostate. *Cancer*, Philadelphia, v 69, p 520, 1992.

VON MENSCHDORFF-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*, v. 18, n. 3, p. 574-583, 2000.

WALSH, P. C. Benign Prostatic Hyperplasia. In: WALSH, P. C., RETIK, A. B., STAMEY, T. A., VAUGHAN, E. D. *Campbell's Urology*. vol. 1. 6ª ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1992. cap. 25, p. 1007-1027.

WALSH, P. C., WORTHINGTON, J. F. *Doenças da Próstata: um guia para os homens e para as mulheres que os amam*. São Paulo: Martins Fontes, 1998. 240p.

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*, v. 353, n. 12, p. 1224-1235, 2005.

WU P, LEINONEN J, KOIVUNEN E, LANKINEN H, STENMAN UH. Identification of novel prostate-specific antigen-binding peptides modulating its enzyme activity. *Eur J Biochem*, v. 267, n. 20, p. 6212-6220, 2000.

WU, P., ZHU, L., STENMAN, U.H., LEINONEN, J. Immunoassay for enzymatically active prostate-specific antigen. *Clin Chem*, v. 50, n. 1, p. 125-129, 2004.

XU, X., JIN, M. YU, Z., LI, H., QIU, D. , TAN, Y., CHEN, H. Latex Agglutination Test for Monitoring Antibodies to Avian Influenza Virus Subtype H5N1. *Journal Of Clinical Microbiology*, v. 43, n.4, p. 1953–1955, 2005.

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*. v. 362, n. 1-2, p. 125-130, 2005a.

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*, v. 48, n. 2, p. 217-221, 2005b.

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

ZURITA, A. J., TRONCOSO, P., CARDO-VILA, M., LOGOTHETIS, C.J., PASQUALINI, R., ARAP, W. Combinatorial Screenings in Patients: The Interleukin-11 Receptor _ as a Candidate Target in the Progression of Human Prostate Cancer. *Cancer Research*, v. 64, p. 435–439, 2004.

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

OBJETIVOS

Esse trabalho tem como objetivos:

1. Selecionar e caracterizar peptídeos ligantes de IgY específicas geradas por meio de imunização com proteínas totais de tecidos com câncer de próstata humano.
2. Desenvolver um biossensor por meio de microaglutinação de microesferas de látex em cromatografia líquida de exclusão a partir de fagos recombinantes selecionados.

CAPITULO I

Identificação de Alvos Biológicos no Diagnóstico do Câncer de Próstata e Hiperplasia Prostática Benigna por *Phage Display*

RESUMO

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. A tecnologia de Phage Display é capaz de selecionar peptídeos com diversas finalidades, como o mapeamento de epítomos reconhecidos por anticorpos, que podem se tornar potenciais marcadores tumorais para o diagnóstico do câncer de próstata. Esta investigação objetivou identificar proteínas capazes de discriminar o câncer de próstata e a hiperplasia prostática benigna. Por meio da imunização de galos SPF com proteínas totais de tecidos prostáticos tumorais humanos produziu-se IgY específicas que foram purificadas em colunas HyTrap. As IgY foram utilizadas na seleção de peptídeos recombinantes por *biopanning*, que foram subsequentemente caracterizados por seqüenciamento e bioinformática. Dos 484 clones, apenas 29 clones diferentes foram identificados. A reatividade e especificidade dos clones isolados foram determinadas por *dot immunoblotting* e ELISA. Encontrou-se similaridades entre as seqüências dos peptídeos e proteínas depositadas no *GenBank* tais como transportadores de membrana, receptores celulares, proteínas envolvidas na regulação gênica e antígenos tumorais. A tecnologia de *phage display* possibilitou a identificação de alvos biológicos com reatividade diferenciada entre soros de pacientes com hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata. Dentre os 29 peptídeos isolados, seis peptídeos apresentaram reatividades específicas, sendo dois clones para o câncer de próstata e quatro clones para a hiperplasia prostática benigna, com implicações importantes em relação à resposta imune associada ao processo tumoral.

Palavras-chave: Câncer de Próstata, Hiperplasia Prostática Benigna, marcadores tumorais, *Phage display*.

ABSTRACT

The identification of new antigens or specific genes associated with prostate cancer may provide new biomarkers and novel tools for the development of specific treatment modalities. Phage Display technology has been capable of selecting peptides with several purposes, such as epitope mapping recognized by antibodies, which may become potential tumor markers for prostate cancer diagnosis. This investigation aimed the identification of recombinant peptides that are able to discriminate prostate cancer from benign prostatic hyperplasia. Specific pathogen-free chickens were immunized with total proteins of tumor human prostatic tissues, and produced specific IgY that were purified by HyTrap chromatographic columns and later used for peptides' selection. Among 484 clones, 29 specific peptides were generated. The selected clones were characterized by sequencing and bioinformatics, with subsequent dot immunoblotting and ELISA assays in order to verify their reactivity and specificity. Similarities were found between peptides' sequences and proteins deposited in GeneBank, such as membrane transporters, cellular receptors, proteins involved in the transcriptional regulation and cancer antigens. The phage display technology was able to identify biological targets that were differently expressed in serum of patients with benign prostatic hyperplasia and in prostate cancer. Among the 29 peptides, six clones presented specific reactivity, with four clones associated with BPH and two clones with PCa, with important implications for the immune response associated with the tumor process.

Word-key: Prostate Cancer, Benign Prostatic Hyperplasia, Markers Tumoral, Phage Display.

INTRODUÇÃO

Atualmente, o câncer de próstata é a segunda causa de morte masculina no Brasil e está entre as principais causas de mortalidade entre os homens ocidentais (INCA, 2006), causada principalmente pelo retardo no diagnóstico, favorecendo tumores com alta capacidade de invasão local e disseminação (WALSH; WORTHINGTON, 1998). A investigação clínica desta doença baseia-se no toque retal e PSA sérico (SROUGI, 1998).

A Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) caracteriza-se por um aumento notório do componente acinar prostático em relação aos componentes intersticial e capsular, acarretando, por consequência, 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)

Essas duas patologias conferem risco e prognóstico bastante diferentes aos pacientes. Contudo, incidem sobre a mesma faixa etária. A neoplasia prostática, em estágios iniciais, apresenta alterações semelhantes à hiperplasia benigna, além do fato de ambas poderem co-existir, complicando ainda mais o diagnóstico preciso. Que podem dificultar sensivelmente a diferenciação dessas patologias (KRUMHOLTZ *et al.* 2002; CATALONA 2004).

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. Bibliotecas de peptídeos geradas por *phage display* são extensamente aplicadas na descoberta de uma grande variedade de polipeptídeos incluindo anticorpos, receptores e enzimas (HAARD *et al.* 1998). Através desta metodologia é possível identificar proteínas capazes de detectar o câncer mais precocemente do que os métodos tradicionais, predizer o estadio atual do tumor, além de permitir o desenvolvimento de tratamentos mais eficientes. Peptídeos selecionados por esta técnica a partir de

proteínas prostáticas câncer-específicas podem ser utilizados como marcadores tumorais no diagnóstico, prognóstico e terapia do câncer de próstata (LEINONEN *et al.* 2000; ROMANOV; DURAND; PETRENKO, 2001).

Com o objetivo de caracterizar alvos biológicos específicos, por *phage display*, associados com a resposta imune durante ao desenvolvimento dos tumores prostáticos realizou-se a identificação, purificação e caracterização de novos alvos biológicos, com possível utilização como biomarcadores no diagnóstico imunológico do câncer de próstata e da hiperplasia prostática benigna, a partir de imunoglobulinas Y de galos imunizados com proteínas totais de tecidos prostáticos tumorais.

MATERIAL E MÉTODOS

1 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS IgY ANTI-CAP

1.1 Pacientes

Neste estudo foram utilizados fragmentos macrodissecados manualmente provenientes de prostatectomia radical (PR) e ressecção transuretral (RTU) de 20 pacientes com adenocarcinoma de próstata em diversos estádios (TABELA I).

TABELA I: Parâmetros clínicos e laboratoriais dos pacientes utilizados para a extração de proteínas totais e imunização de galos. ND: não detectado; PR: prostatectomia radical; RTU: ressecção transuretral.

Paciente	Idade	Psa Pré-Cirúrgico	Gleason	TNM	Tipo de cirurgia
01	71	9.6	7	pT2cNoMo	PR
02	62	ND	7	pT3cN1Mx	PR
03	66	22.2	6	pT2cNoMo	PR
04	47	1.1	-	NIP I	PR
05	68	6.0	6	ND	PR
06	71	6.5	5	pT1aNoMx	PR
07	80	13.7	7	pT3cNoMx	PR
08	66	5.52	7	pT2cNoMx	PR
09	75	5.0	-	NIP III	PR
10	64	5.52	6	ND	PR
11	71	5.5	5	pT3cN1Mo	PR
12	69	ND	8	pT4	RTU
13	54	ND	7	ND	RTU
14	70	202.2	10	ND	RTU
15	77	maior 100	9	ND	RTU
16	77	79.2	7	ND	RTU
17	58	12.2	6	T2cNoMx	PR
18	77	47	7	ND	PR
19	72	5.9	7	pT2aNoMx	PR
20	66	elevado	6	pT2aNoMx	RTU

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

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

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

1.2 Extração de Proteínas Totais

Amostras de cerca de 20mg de próstatas de cada paciente, foram trituradas com um homogeneizador elétrico em tampão (400mM NaCl; 25mM EDTA pH 8,0; 50mM Tris pH 7,5; 2% SDS), para preservação da integridade das proteínas foram adicionados os inibidores de protease benzamidina (10 μL a 100mM) e PMSF (3 μL a 150 mM). As amostras foram então incubadas a 37°C por 15 minutos e em seguida adicionou-se 300 μL de solução saturada de NaCl, e novamente incubou-se por 15 minutos agora a -20°C . Após o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas a 15000rpm a 4°C por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e as proteínas precipitadas foram ressuspendidas em tampão fosfato salino (PBS). Após a extração, as proteínas extraídas dos 20 pacientes individualmente foram reunidas em quantidades iguais, quantificadas e visualizadas em gel SDS-PAGE para verificação de sua integridade.

1.3 Imunização

Utilizou-se 3 galos *SPF* (*Specific Pathogen Free*) de três semanas de idade, da raça *White-Leghorn* cedidos pela Sadia S/A de Uberlândia-MG, sendo 2 galos testes e 1 galo controle.

Antes do início da Imunização, coletou-se aproximadamente 10 mL de sangue dos animais, retirado da parte interna da asa de cada um. O esquema de imunização foi o descrito por Barbas *et al.* (2001), com algumas modificações, sendo a primeira dose de 200 µg de proteínas totais de CaP e as três doses subseqüentes de 100 µg, por via intramuscular, em intervalos de 14 dias para cada dose. A primeira dose foi administrada com adjuvante completo de Freund (Sigma Chemical Co, USA), e as doses subseqüentes com adjuvante incompleto de Freund (Sigma). Os animais imunizados foram sangrados a partir da terceira dose e avaliados quanto à produção de anticorpos pelo teste de ELISA.

1.4 Titulação de anticorpos por Ensaio Imuno Enzimático (ELISA)

Para o teste de ELISA foram utilizadas placas de microtitulação de alta afinidade (Nunc-Maxisorp) sensibilizadas com 50 µL/poço por 12-16 horas a 4°C com 10ng das proteínas totais de tecidos prostáticos tumorais em tampão Carbonato/Bicarbonato 0,06M pH 9,6 (1,0M Na HCO₃ e 1,0M Na₂CO₃ anidro). Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com PBST, e bloqueadas com 250µL de Solução de Bloqueio (PBST 0,05%-leite desnatado 5%) incubando-as por 1 hora a temperatura ambiente e lavadas novamente. Foram adicionas as diluições de soro, em solução de bloqueio (100µL/poço), de 1:300, 1:600, 1:1200, 1:2400, 1:4800, 1:9600 e 1:19200 realizadas em duplicata dos soros dos 3 animais pré e pós-imunização, incubando a placa por 1 hora a 37°C. Após esse período, as placas foram lavadas seis vezes e foi adicionado anticorpo secundário (IgG de coelho anti IgY de galinhas conjugado à peroxidase) diluído em solução de bloqueio em concentração de 1:5000, permanecendo por 1 hora. A ligação específica foi revelada pela adição de substrato enzimático contendo o-fenilenodiamino (OPD). Após 15 minutos, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 30% e efetuada a leitura a 492 nm em leitor de microplaca (Flow Titertek Multiskan Plus - USA). Após a observação de título satisfatório, o sangue foi coletado para obtenção de soro policlonal.

1.5 Purificação cromatográfica de IgY

A purificação de IgY realizou-se em colunas *HiTrap IgY Purification HP* (Amersham Biosciences) segundo o manual do fabricante. Com o auxílio de uma bomba peristáltica, a coluna foi lavada a velocidade de 5 mL/minuto com 5 volumes (25mL) de cada tampão: Ligação (20mM Na₂HPO₄, 0,5M K₂SO₄ pH 7,5), Eluição (20mM Na₂HPO₄ pH 7,5) e Limpeza (20mM Na₂HPO₄ pH 7,5 com 30% de Álcool isopropílico), e equilibrada com 5 volumes de tampão de Ligação. A amostra (10mL de soro) foi aplicada e em seguida a coluna foi lavada com 10 volumes (50mL) de tampão de ligação.

As IgY foram eluídas com 10 volumes de Tampão de Eluição coletando em tubos para imediata quantificação no espectrofotômetro (280nm). Após a eluição, a coluna foi regenerada com 8 volumes de Tampão de Limpeza e reequilibrada com 5 volumes de Tampão de Ligação.

1.6 Diálise

Na diálise das amostras saídas da coluna de purificação, utilizou-se tubos de diálise de celulose *Fisherbrand®* (*regenerated cellulose-DYALYSIS tubing*). As extremidades inferiores dos tubos foram amarradas e após aplicação do soro purificado amarrou-se a outra extremidade, emergindo-os em sacarose por 1 hora para concentração das amostras.

Devido à diminuição no volume de amostra, prendendo-se novamente os tubos, reduzindo seu tamanho, colocando-os em TBS1X por 12-16 horas, trocando o tampão pelo menos três vezes.

Retirou-se o purificado do interior das membranas armazenando-os em microtubos estéreis, para posterior análise de pureza e quantificação espectrofotométrica.

2 ELETROFORESE EM SDS-PAGE

A eletroforese foi realizada segundo Barbas *et al.* (2001), a concentração do gel foi de 16% (p/v). As amostras foram diluídas em 10µL de tampão de

amostra (12mL de SDS a 10%, 6 mL de Glicerol 1mL de Tris-HCl 1M pH 6,8), desnaturadas a 100°C por dois minutos e aplicadas em cada poço do gel. Foi utilizado um marcador de peso molecular (*SIGMAMARKER™, Wide Molecular Weight Range*) para determinar o tamanho das proteínas no gel. Foram utilizados dois tampões de corrida: ânodo (Tris-HCl 0,2M pH 8,9) e cátodo (Glicina 0,1M; Tris 0,1M; 0,1% de SDS). A corrente foi fixada em 120V e a corrida realizou-se por 4 horas.

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

2.1 Coloração de gel com *Coomassie-blue*

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

2.2 Coloração de gel com *nitrato de prata*

Após a corrida, o gel foi corado com prata (SAMBROOK *et al.* 1989). Inicialmente incubou-se o gel durante 12hs com solução de Etanol:Ácido acético glacial:Água (30:10:60) para fixar as proteínas no gel. A solução fixadora foi então descartada e o gel incubado por 30 minutos, a temperatura ambiente, sob leve agitação com uma solução de Etanol 30%. Este passo foi repetido, a solução de etanol foi descartada e o gel incubado duas vezes com Água Deionizada, durante 10 minutos, à temperatura ambiente e sob leve agitação. A água foi removida e uma solução de AgNO₃ 0,1% adicionada e descartada após 30 minutos. Após este processo os dois lados do gel foram lavados com Água Deionizada. Em seguida, uma solução aquosa de Carbonato de Sódio 2,5% e Formaldeído 0,02% foi acrescentada ao gel e mantida a temperatura ambiente, sob suave agitação.

Com o surgimento das bandas a reação foi parada por Ácido Acético 1% e o gel foi lavado 3 vezes com Água Deionizada.

3 SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS

3.1 *Biopanning* (seleção de fagos)

Foram utilizadas 5µL (1×10^{11} partículas virais) de cada uma das 3 bibliotecas de peptídeos randômicos fusionados em fagos (Ph.D.-7, Ph.D.-C7C, e Ph.D.-12 da *NEW ENGLAND BioLabs® Inc.*). As bibliotecas eram compostas de 7, 9 ou 12 aminoácidos randômicos seguidos por uma curta seqüência espaçadora Gly-Gly-Gly fusionada à região N-terminal da Proteína III de bacteriófagos filamentosos M13. Todas as cinco cópias da Proteína III dos fagos continham peptídeos amino-terminais.

Foram realizados 3 ciclos de seleção, onde em cada um deles, um poço em uma placa de microtitulação (*Corning Incorporated Costar®* 3591) foi previamente adsorvido com 150µL de IgY purificada (100µg/mL em 0,1 M NaHCO₃, pH 8,6) por 12-16 horas (*overnight*) a 4°C sob agitação leve; bloqueada com 250µL de um tampão de bloqueio (0,1M NaHCO₃, pH 8,6, 5mg/mL BSA) por uma hora, a 4°C; e lavada seis vezes com TBST (TBS contendo 0,1% Tween-20). Acrescentou-se, no mesmo orifício da placa, 5µL de cada biblioteca diluídos em 100 µL de TBST agitando-se por uma hora à temperatura ambiente. Fagos não ligantes foram removidos por dez lavagens com TBST (0,1% Tween-20) no primeiro ciclo seleção e nos 2 ciclos subseqüentes de TBST (0,5% Tween-20). Os fagos ligantes foram eluídos por afinidade com 10 µg proteínas totais de CaP diluídas em 90 µL de TBS por 60 minutos sob agitação, à temperatura ambiente. Pequenas alíquotas do eluato de fagos foram utilizadas para a titulação.

O eluato remanescente foi amplificado da seguinte maneira: inicialmente retirou-se uma colônia (isolada) de *Escherichia coli* linhagem ER2738 previamente crescida em meio LB (0,2g LB +20mL de água destilada e posterior esterilização) com tetraciclina, sob agitação a 37°C até a fase *early-log* ($OD_{600} \sim 0,3$) e incubou-se a 37°C por 4-5 horas sob forte agitação. A cultura foi submetida

à centrifugação a 10000 RPM por 10 minutos a 4°C e recentrifugada para total separação das bactérias. Logo após, 80% do sobrenadante foi transferido para um tubo esterilizado e adicionou-se 1/6 do volume de PEG/NaCl (20% de Polietilenoglicol 8000 e 2,5 M de NaCl – solução estéril) incubando-se por 12-16 horas a 4°C. Decorrida a precipitação, centrifugou-se a solução a 10000 rpm por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e centrifugou-se, brevemente, outra vez para remoção de sobrenadante residual com uma pipeta. O precipitado foi suspenso em 1mL de TBS e precipitou-se novamente com 1/6 do volume de PEG/NaCl incubado em gelo por 1 hora. Centrifugou-se a 14000rpm por 10 minutos a 4°C descartando o sobrenadante e repetiu-se a centrifugação brevemente para remoção de sobrenadante residual com a pipeta. O precipitado foi ressuspenso em 200µL TBS, 0.02% NaN₃, obtendo-se então o eluato amplificado, que foi posteriormente titulado e armazenado a 4°C.

3.1.1 Titulações

A titulação é um procedimento necessário para determinar o número de entrada e saída das partículas virais durante os ciclos do “Biopanning”.

A solução de fagos a ser titulada foi submetida a diluições seriais de 10 vezes em meio LB. Para eluatos não amplificados foram utilizadas as diluições de 10⁻¹ até 10⁻⁴; no caso de soluções com fagos amplificados a faixa de diluição utilizada foi de 10⁻⁸ a 10⁻¹¹. Cada diluição foi acrescida de 200µL da cultura de ER2738 na fase *mid-log* (OD₆₀₀ ~0,5). Esta mistura foi agitada brevemente e incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. As células, agora infectadas, foram transferidas para tubos de cultura contendo 3mL de Agarose Top a 45°C e espalhadas sobre uma placa de Petri contendo meio LB sólido, com IPTG/Xgal e tetracilina. Para cada diluição foi confeccionada uma placa.

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

3.2 Western Blot

A técnica de *western blot* foi realizada para assegurar que os clones selecionados tinham afinidade pelo anticorpo gerado pela imunização dos animais com proteínas de CaP. As amostras referentes ao *pool* de clones dos três ciclos de seleção foram submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE e eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond ECL – GE Healthcare) com poros de 0,22 μm . Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com tampão TBS-Tween 20 a 0,05% (TBST) e suplementada com leite desnatado, e em seguida, incubadas com as IgY purificadas. A detecção da ligação dos anticorpos aos peptídeos imobilizados em nitrocelulose pôde ser verificada pela subsequente incubação das membranas com o anticorpo anti-IgY complexado com a enzima fosfatase alcalina e revelação com o substrato NBT/BCIP.

3.3 Extração de DNA de fagos

Para a extração do DNA dos fagos, colônias isoladas de uma placa oriunda do 3º ciclo de *Biopanning* foram transferidas para poços de 2mL de placas de cultura tipo *Deepwell*, contendo 1mL de cultura de ER2738 em fase *early-log* ($\text{OD}_{600} \sim 0,3$); a cada poço foi adicionada apenas uma colônia de fago. A placa foi, vedada com um adesivo próprio 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 10 minutos. Apenas 800 μL do sobrenadante da centrifugação foram transferidos para outra placa e incubados, por 10 minutos, com 350 μL de PEG/NaCl. Após o período de incubação, os tubos foram centrifugados a 3700 rpm, a 20°C, durante 40 minutos para precipitação dos fagos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 100 μL de Tampão iodeto (10mM de Tris-HCl pH 8,0, 1mM de EDTA e 4M de NaI) foi adicionado ao precipitado de fagos.

As placas foram agitadas vigorosamente e, em seguida, 250 μL 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 precipitado de fagos foi lavado com 500 μ L de Etanol 70% e recentrifugado. Finalmente, o precipitado remanescente foi diluído em 20 μ L de água Milli-Q. A qualidade do DNA fita simples foi verificada pela corrida eletroforética em gel de Agarose 1% corado com solução de brometo de etídeo.

3.4 Seqüenciamento

Na reação de seqüenciamento, 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 58°C por 15 segundos) e extensão (a 60°C por um minuto). O DNA seqüenciado foi precipitado com 1 μ L de Acetato de Amônio e Etanol, homogeneizando a placa com leves batimentos. Então foram acrescentados 27,5 μ L de Etanol absoluto, em seguida, a placa foi centrifugada por 45 minutos, a 4000 rpm e o sobrenadante descartado. Adicionou-se 150 μ L de Etanol 70% ao DNA precipitado e centrifugou-se por 10 minutos, a 4000 rpm. A solução de Etanol foi descartada, a placa permaneceu invertida sobre um papel toalha e nesta posição foi pulsada a 800 rpm, durante um segundo. A placa foi coberta por um papel alumínio e assim ficou durante cinco minutos para evaporar o Etanol remanescente. Os precipitados resultantes foram ressuspensos no tampão de diluição (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit. – Amersham Biosciences).

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

3.5 Dot Immunoblotting com IgY

Para a identificação dos clones imunorreativos foi utilizado o método de *Dot Immunoblotting*, no qual 5 μ L dos clones a 10¹⁰ pfu, foram plotados em uma membrana de Nitrocelulose (Hybond ECL – GE Healthcare) com poros de 0,45

µm. Após a plotagem dos clones, foi adicionada a solução de bloqueio TBSTM (TBST, 0,05% de Tween 20 com 5% de leite desnatado) por 1 hora, a temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes com TBST e incubada com o anticorpo IgY purificado, diluído em TBSTM por 1 hora, a temperatura ambiente e lavada três vezes. A detecção da ligação dos anticorpos aos peptídeos imobilizados em nitrocelulose pôde ser verificada pela subsequente incubação das membranas com o anticorpo anti-IgY complexado com a enzima fosfatase alcalina e revelação com o substrato NBT/BCIP. Como controle negativo utilizou-se o fago selvagem, que não apresenta nenhum peptídeo conjugado.

3.6 Phage ELISA

Para quantificação da reatividade dos clones às IgY anti-CaP, foi realizado o ensaio de ELISA onde placas de microtitulação de alta afinidade foram sensibilizadas, em duplicata, para todas as amostras, com os 1 µg de anticorpo anti-M13 por 16 horas a 4°C. Decorrido o tempo de incubação as placas foram bloqueadas com TBST Caseína a 2,5% e lavadas três vezes com TBST. Os clones amplificados foram diluídos a 10^{11} /mL em TBST Caseína a 2,5% e incubados 1 hora a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas novamente e as IgY anti-CaP e irrelevantes foram adicionadas na concentração de 1:100, diluídos em Caseína a 2,5% 1:25 e incubados durante 1 hora à 37°C. Após este período, as placas foram lavadas e incubadas com anti-IgY conjugado com peroxidase diluído 1:5000 em Caseína a 2,5%, durante 1 hora à 37°C, lavadas novamente e a ligação antígeno/anticorpo foi revelada com solução de OPD. Após 15 minutos, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico e efetuada a leitura a 492 nm em leitor de microplacas

O índice ELISA (IE) para os soros testados foi calculado realizando a divisão da média das densidades óticas (DO) das duplicatas pelo valor de *cut off*. O *cut off* foi calculado somando-se 2 desvios padrão à média das DOs dos controles negativos (fago selvagem) mais a média das DOs de todos os clones com os anticorpos irrelevantes ($cutoff = [\bar{X} \times 2s(selvagem)] + \bar{X}(irrelevantes)$). Os IEs

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

3.7 Purificação de IgG com microesferas magnéticas

Soros de 10 pacientes com câncer de próstata, 10 pacientes com HPB e 10 pacientes controles (homens entre 20 e 30 anos) devidamente identificados e caracterizados por urologistas do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, foram purificados com microesferas magnéticas ativadas com proteína G para obtenção de IgG, da seguinte forma: 2×10^9 microesferas foram lavadas três vezes com 500 μ L de tampão MES (1M, pH 5,0), em seguida, adicionou-se 100 μ L de soro e incubou-se por 40 minutos a temperatura ambiente sobre forte agitação. Decorrido o tempo de incubação, as microesferas foram precipitadas por captura magnética em separador próprio, o sobrenadante foi descartado e lavou-se três vezes com tampão MES (1M, pH 5,0). Ao retirar o campo magnético, as IgG foram eluídas com tampão citrato de Na (1M pH 2-3) e o pH neutralizado com Tris (1M pH 9,1), separando as IgGs das microesferas magnéticas após introdução dos tubos no separador magnético.

3.8 Peptídeo Array

Para verificação da especificidade dos clones a anticorpos tipo IgG específicos purificados com microesferas magnéticas do soro de 10 pacientes de cada grupo (CaP, HPB e controle) desenvolveu-se um teste de peptídeo *array*.

As IgGs purificadas foram utilizadas contra os 29 clones selecionados e um fago selvagem (controle negativo sem inserto) imobilizados em uma membrana de nitrocelulose (Hybond ECL – GE Healthcare) com poros de 0,45 μ m. Para a imobilização, utilizou-se o volume de 5 μ L de cada clone a 10^{10} pfu, em cada uma das três membranas que foram posteriormente bloqueadas com TBSTM (0,05% de Tween 20 com 5% de leite desnatado) por 1 hora, à temperatura ambiente, sob agitação. Após três lavagens com TBST, adicionou-se as IgGs dos pacientes, previamente purificadas por microesferas magnéticas, diluídas em TBSTM e incubados durante 1 hora à temperatura ambiente com agitação constante. Após

este período, as membranas foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG humana conjugado com fosfatase alcalina diluído em TBSTM na concentração de 1:5000, durante 1 hora, e reveladas com o substrato NBT/BCIP até que os *dots* começassem a aparecer. Após a revelação, as membranas foram escaneadas e os *dots* foram quantificados quanto a suas densidades óticas (DO) pelo programa *Image Master-VDS Software*, versão 2.0 (*Pharmacia Bioscience*). Para o cálculo das DOs relativas e descontar as diferenças de coloração entre cada membrana e possibilitar a comparação entre elas, foi estimada a média das DO de 3 regiões “brancas” que foi utilizada na normalização dos resultados através da sua subtração de cada uma das DOs dos clones testados. Foram realizadas leituras em 5 pontos diferentes e uma de toda a área em cada um dos *dots* como exemplificado na Figura 1.1.

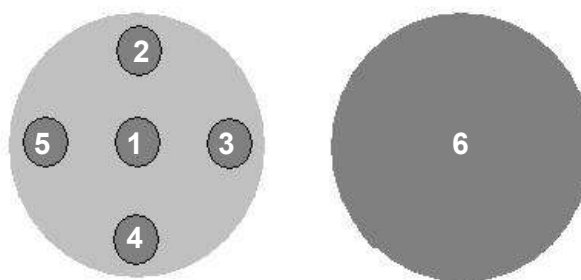


FIGURA 1.1. Esquema representativo das regiões de leitura nos *dots* das membranas dos ensaios de peptídeo *array*, os números de 1 a 5 indicam os locais de leitura e o 6 indica a leitura de toda a área de um *dot* por inteiro.

4 ANÁLISE DE DADOS PELA BIOINFORMÁTICA

Após seqüenciamento, 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>)).

DIVAA (<http://relic.bio.anl.gov/divaa.aspx>) foi utilizado para o cálculo da diversidade e derivação padrão dos aminoácidos em cada posição nos peptídeos. O cálculo da frequência, diversidade de aminoácidos dentro da população de peptídeos foi realizado pelo programa AADIV (<http://relic.bio.anl.gov/aafreqs3.aspx>).

As homologias entre os 29 peptídeos selecionados, foram testadas utilizando os programas CLUSTAL W versão 1.83 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>), T-Coffee versão 1.41 (<http://www.ch.embnet.org/software/TCoffee.html>), MUSCLE versão 1.0 (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/muscle.pl>), MAFFT versão 5.860 (<http://timpani.genome.ad.jp/~mafft/server/>). O programa CLUSTAL W inclui ainda na análise o pareamento entre os peptídeos recombinantes selecionados.

As homologias entre os peptídeos selecionados e com proteínas depositadas foram realizadas utilizando a ferramenta BLASTp (Basic Local Alignment Search Tool), um conjunto de programas que buscam similaridades entre seqüências e são designados para comparar (alinhar) 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/>).Com). As proteínas que apresentaram similaridade 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.

RESULTADOS

1 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E OBTENÇÃO DE IgY ANTI-CAP

As proteínas totais de próstata extraídas foram de boa qualidade e puderam ser utilizadas como imunógenos para a produção de anticorpos policlonais de galinhas (IgY). Após a resolução das proteínas em gel de acrilamida SDS-PAGE observou-se que estas mantiveram-se preservadas (FIGURA 1.2), o que permitiu a imunização das galinhas.

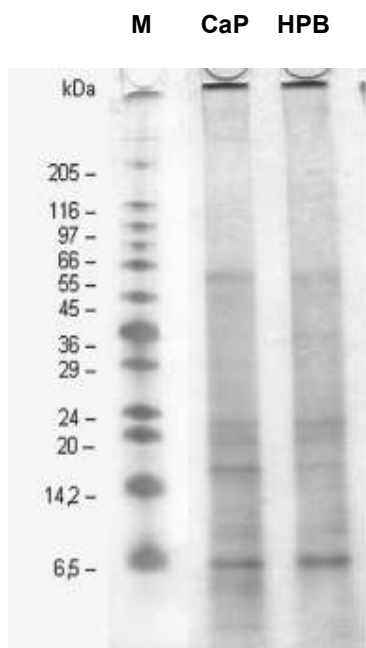


FIGURA 1.2. Eletroforese SDS-PAGE (16%) proteínas totais extraídas de amostras de tecido de próstata de pacientes com CaP e HPB observadas em gel de acrilamida corado com nitrato de prata, M= marcador de peso molecular.

Os animais imunizados apresentaram reação imunológica contra proteínas totais de CaP produzindo anticorpos policlonais anti-CaP, como esperado. Para verificar a especificidade às proteínas de CaP e se a quantidade de anticorpos seria suficiente para os procedimentos de seleção, após a 4^a imunização, foi realizado o teste de ELISA com os soros dos galos controle, 1 e 2. Os títulos de

anticorpos foram estimados a partir do ponto de inflexão no gráfico pós-imune na curva de titulação (FIGURA 1.3). Obteve-se o título de 1:1200 para ambos os animais. O galo controle não apresentou anticorpos anti-CaP.

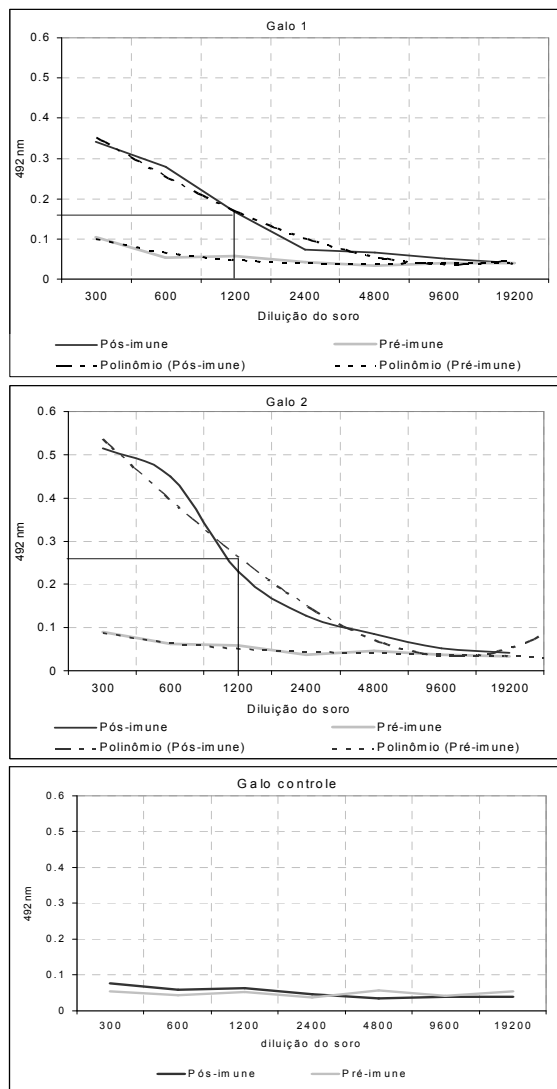


FIGURA 1.3. Curva de titulação dos soros feita a partir das médias das absorbâncias das duplicatas versus as diluições dos soros pré e pós-imune dos galos 1 e 2 e controle. O ponto de inflexão foi estimado traçando-se uma linha a partir da posição mediana do eixo Y até o polinômio da linha pós-imune interpolando-se até o eixo X.

Após constatar a eficiência das imunizações, as imunoglobulinas tipo Y dos soros dos galos foram purificadas por cromatografia em colunas. Coletou-se cinco alíquotas de anticorpos durante a purificação que foram quantificadas em espectrofotômetro e visualizadas em SDS-PAGE em condições não redutoras

(FIGURA 1.4). As amostras foram de boa qualidade não apresentando impurezas em excesso, apenas a amostra 1 apresentou proteínas contaminantes provavelmente por ter sido a primeira a ser coletada. Todas as amostras continham uma banda de aproximadamente 180 kDa, correspondente ao peso molecular da IgY. A quantidade de anticorpo variou entre as amostras 1 a 6 (respectivamente 6,9mg/mL, 0,4 mg/mL, 1,0mg/mL, 3,0mg/mL e 0,3mg/mL) sendo a amostra 3 utilizada nos procedimentos de seleção.

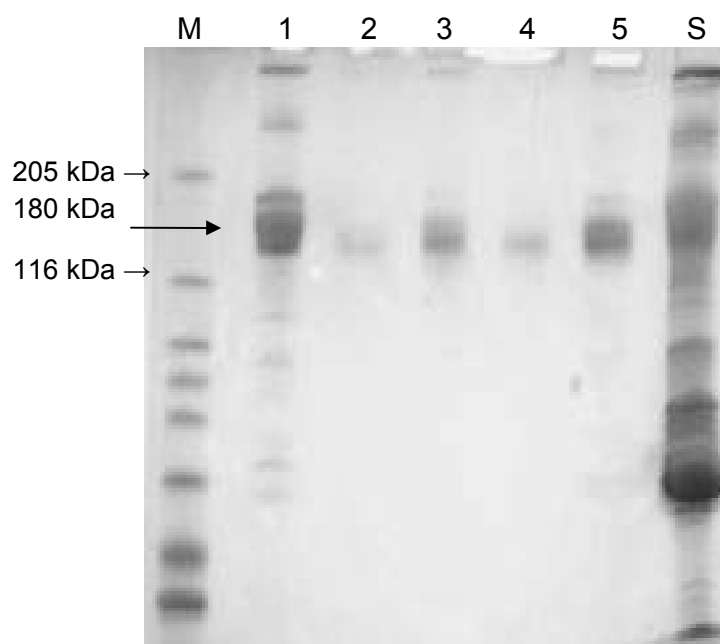


FIGURA 1.4. Eletroforese em SDS-PAGE (16%) corado com coomassie blue das preparações de IgY purificadas por cromatografia. M- marcador de peso molecular; 1 a 5 alíquotas de IgY; S - amostra de soro total dos galos.

2 SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS

2.1 *Biopanning*

A seleção dos peptídeos ligantes aos anticorpos policlonais anti-proteínas totais de câncer de próstata, foi realizada com três bibliotecas de peptídeos

expressos em fagos M13. A especificidade dos peptídeos foi assegurada pela eluição com proteínas totais de CaP.

O enriquecimento dos peptídeos específicos presentes no conjunto para os anticorpos IgY antiCaP durante o processo da seleção pode ser verificado na Figura 1.5, que mostra o resultado de um *Western Blotting* realizado com os fagos eluídos amplificados provenientes dos três ciclos de seleção, mostrando o reconhecimento pelos anticorpos policlonais anti-CaP na região representativa da proteína pIII, a qual carrega o peptídeo sintético. A intensidade de marcação na membrana aumenta do primeiro para o terceiro ciclo, sendo a quantidade de fagos idêntica em todas as amostras.

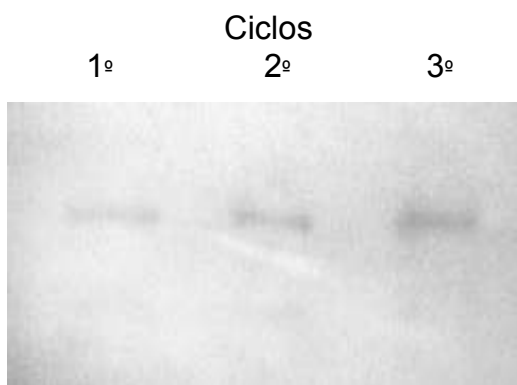


FIGURA 1.5. *Western blot* dos fagos dos 1º, 2º e 3º ciclos de seleção, revelados com IgY anti-CaP como anticorpo primário e detecção com anticorpo secundário anti IgY conjugado com fosfatase alcalina. No gel foram aplicadas 1×10^{10} partículas virais para cada amostra.

A quantidade de fagos selecionados durante os três ciclos de seleção foi estimada pela titulação dos eluatos amplificado e não amplificado de cada ciclo (TABELA II). Os títulos de entrada dos fagos no *Biopanning* são sempre maiores que os títulos de saída, pois os fagos com maior afinidade aos anticorpos imobilizados na placa ficam ligados a estes pela interação parátopo/mimetopo e o restante dos fagos com baixa ou sem afinidade ao anticorpo são removidos durante as lavagens.

TABELA II. Seleção dos fagos com peptídeos ligantes a anticorpos policlonais anti-CaP. Título obtido (pfu) no processo de seleção dos fagos por imunoafinidade.

	Número de partículas de fagos	
	Entrada	Saída
1º Ciclo de Seleção	$3,0 \times 10^{11}$	$6,5 \times 10^6$
2º Ciclo de Seleção	$1,0 \times 10^{11}$	$6,3 \times 10^5$
3º Ciclo de Seleção	$1,7 \times 10^{11}$	$1,6 \times 10^6$

2.2 Extração de DNA e seqüenciamento dos clones de fagos

Clones de fagos foram obtidos pelo crescimento, em meio de cultura, de 480 colônias individuais, isoladas das placas de titulação do 3º ciclo de seleção, os quais tiveram seu DNA extraído.

O DNA extraído dos clones foi submetido à eletroforese em gel de Agarose 1%, para verificação da qualidade e quantidade (FIGURA 1.6). Em seguida o DNA foi seqüenciado e analisado.

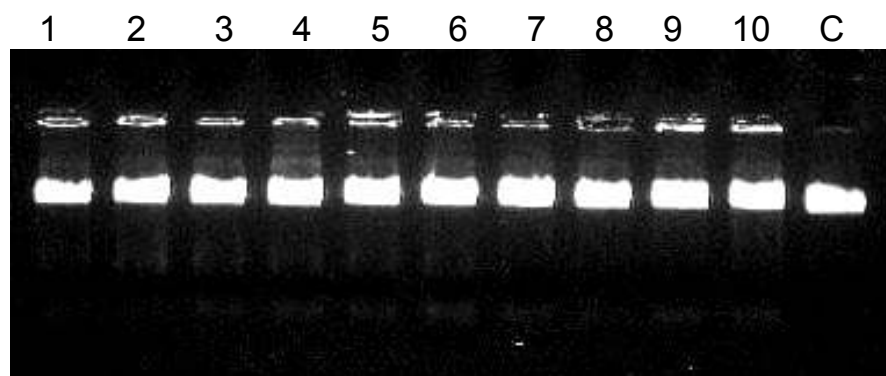


FIGURA 1.6. Eletroforese em gel de agarose 1% de 10 amostras de DNA extraído de fagos (1-10) aleatoriamente escolhidos e de 200ng de DNA controle (C) com 7249 pb.

Dos 480 clones seqüenciados, apenas 323 apresentaram seqüências válidas (sem erros de seqüenciamento), onde foram identificadas 29 seqüências diferentes e as demais ocorrendo repetidas vezes. A Tabela III mostra a freqüência de cada clone, bem como a estrutura primária de cada um.

TABELA III. Seqüência traduzida de aminoácidos dos peptídeos expressos nos clones de fagos selecionados e suas respectivas freqüências.

Clone	Seqüência	323/480	Freqüência
1	STWPAFRLFTKI	3/323	0,92%
2	MVSMDSSPRDRL	1/323	0,31%
3	DRMLLPFNLRAL	15/323	4,64%
4	LLADTTHHRPWT	263/323	81,4%
5	MFAPNMHYRPSH	2/323	0,62%
6	VLPPKPMRQPVA	2/323	0,62%
7	EYHLASTPAHHY	3/323	0,92%
8	ATWSHHLSSAGL	1/323	0,31%
9	GDSKVSWGITYS	5/323	1,55%
10	RGSVPNAPQFQF	1/323	0,31%
11	TFESNTWSALH	3/323	0,92%
12	NFMESLPRLRMH	1/323	0,31%
13	SPTSFPRAPSLY	1/323	0,31%
14	TVAQMPPHWQLT	1/323	0,31%
15	YSEIRDSSDTAI	1/323	0,31%
16	MHRSDLMSAAVR	1/323	0,31%
17	SQNTVLVHGTSS	1/323	0,31%
18	GGMTPGSLGLKQ	3/323	0,92%
19	C-LSGPLAD-C *	1/323	0,31%
20	TMGFTAPRFPHY	2/323	0,62%
21	WSLNGSGFSMRF	1/323	0,31%
22	SIFPYPHAAFT	2/323	0,62%
23	HPRSPSPHYWS	3/323	0,92%
24	SNTAQANWAEPF	1/323	0,31%
25	SVSVGMKPSRP	1/323	0,31%
26	AHENSIKPTQLH	1/323	0,31%
27	NPLIPENVPLRH	1/323	0,31%
28	HARINPSFPLPI	1/323	0,31%
29	TNWRVEPSGIPI	1/323	0,31%

*Peptídeo conformacional

2.3 Dot Immunoblotting com IgY

A análise policlonal por ensaios de *Dot Immunoblotting* permitiu uma abordagem rápida da eficiência de seleção e especificidade dos clones aos

anticorpos alvo. Após o isolamento e amplificação dos clones de fagos, estes foram imobilizados em duas membranas e testados separadamente contra as IgY anti-CaP, utilizadas no processo de seleção, e com anticorpos IgY irrelevantes, purificados de animais não imunizados com proteínas de CaP (FIGURA 1.7). Neste teste, todos os clones mostraram reatividade diferencial entre si e não apresentaram reatividade aos anticorpos irrelevantes e nem ao fago selvagem, que não apresenta inserto, utilizado como controle negativo de reação.

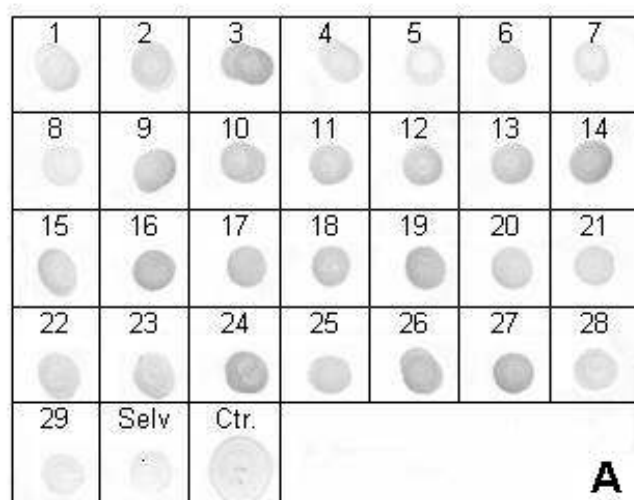


FIGURA 1.7. Membranas de *Dot immunoblotting* dos clones de fago selecionados (1-29), e dos controles Selv. fago selvagem e Ctr. proteínas de Cap, com as imunoglobulinas tipo Y anti-CaP em A e irrelevantes em B.

Essa primeira avaliação abrangeu todos os clones e permitiu a confirmação da imunorreatividade dos clones selecionados aos anticorpos alvo e verificar a presença de peptídeos que reconheçam antígenos naturais comuns em galinhas ou a existência de reação cruzada desses peptídeos com as regiões constantes da IgY ou outras imunoglobulinas específicas de proteínas de CaP.

2.4 Phage ELISA

Uma vez confirmada a eficiência de seleção, os fagos foram submetidos a ensaios de ELISA para quantificação da reatividade ao alvo. Para a normalização da quantidade de partículas virais entre os clones a serem testados, placas de microtitulação foram sensibilizadas com as mesmas quantidades de anticorpo anti-M13. Novamente aqui utilizou-se o fago selvagem como controle negativo de reação e anticorpos IgY irrelevantes para confirmar a ausência de reação cruzada com outros anticorpos.

A Figura 1.8 apresenta um gráfico representativo da reatividade dos clones selecionados aos anticorpos IgY anti-CaP e irrelevante, o *cut off* foi calculado somando-se à média das leituras das réplicas do fago selvagem (controle negativo) dois desvios padrões e a média das leituras das IgY irrelevante com todos os clones. Observa-se que mesmo com um *cut off* estrigente os clones apresentaram alta reatividade aos anticorpos testados. Não se observou reação cruzada com os anticorpos irrelevantes nem com o fago selvagem que mostraram reatividade semelhante entre si.

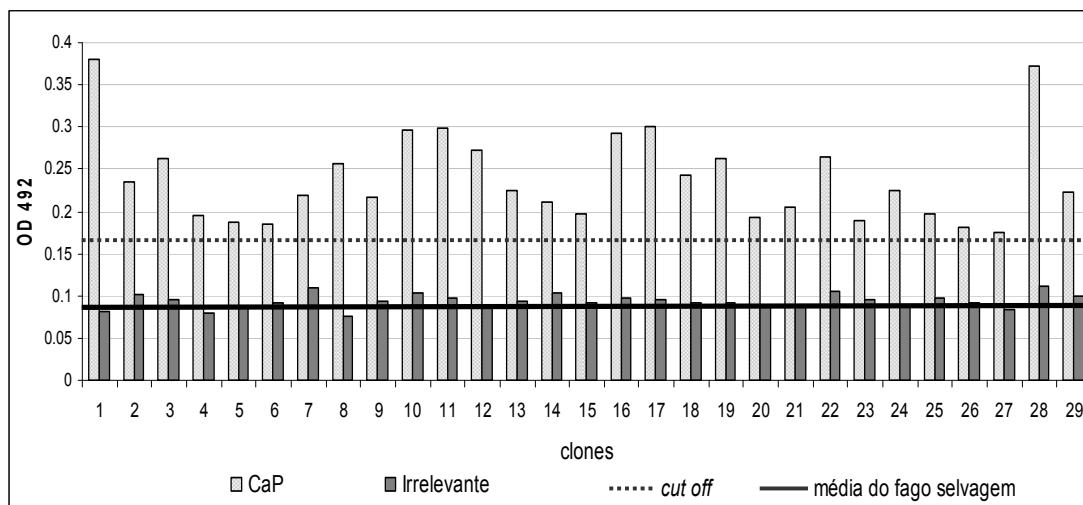


FIGURA 1.8. Gráfico representativo das leituras a 492nm do ensaio de ELISA mostrando a reatividade dos clones de fagos capturados por anticorpo anti-M13 contra as IgY anti-CaP e irrelevantes.

A reatividade dos anticorpos irrelevantes aos clones se manteve uniforme entre si e praticamente a mesma do fago selvagem, o que pode ser considerada apenas um ruído da reação normal do substrato. A partir desses resultados todos os clones foram considerados imunorreativos contra anticorpos anti-proteínas de câncer de próstata e nenhum foi descartado para os testes posteriores.

3 ANÁLISES POR BIOINFORMÁTICA

Após a tradução das seqüências de DNA pelo programa DNA2PRO12, o cálculo da freqüência de cada aminoácido nos peptídeos seqüenciados foi realizado pelo programa AADIV. A Tabela IV apresenta a comparação entre a freqüência dos vinte aminoácidos presentes nos peptídeos ligantes e a freqüência esperada dos aminoácidos na biblioteca original. Mais uma vez observa-se que a seleção foi eficiente principalmente pelos aminoácidos Cis, Lys e Gln que foram selecionados negativamente apresentando freqüência bem abaixo do esperado, e pela seleção positiva dos aminoácidos His, Pro e Fen.

TABELA IV. Freqüência dos aminoácidos individuais dos peptídeos expressos nos fagos selecionados pelas IgYs e a freqüência esperada dos aminoácidos na construção da biblioteca realizado pelo AADIV.

Aminoácidos		Freqüência	
		Esperada	Observada
a (alanina)	Ala	6,2%	7,3%
c (Cisteína)	Cis	3,1%	0,0%
d (Aspartato)	Asp	3,1%	2,6%
e (Glutâmato)	Glu	3,1%	2,3%
f (Fenilalanina)	Fen	3,1%	5,0%
g (Glicina)	Gly	6,2%	4,4%
h (Histidina)	His	3,1%	6,4%
i (Isoleucina)	Ile	3,1%	3,2%
k (Lisina)	Lys	3,1%	1,7%
l (Leucina)	Leu	9,4%	8,2%
m (Metionina)	Met	3,1%	4,4%
n (Asparagina)	Asn	3,1%	4,1%
p (Prolina)	Pro	6,2%	12,3%
q (Glutamina)	Gln	6,2%	2,6%
r (Arginina)	Arg	9,4%	6,4%
s (Serina)	Ser	9,4%	12,6%
t (Treonina)	Thr	6,2%	7,0%
v (Valina)	Val	6,2%	3,8%
w (Tryptofano)	Trp	3,1%	2,9%
y (Tirosina)	Tyr	3,1%	2,6%

DIVAA é uma medida quantitativa de diversidade de sucessão dos aminoácidos, e gera hipóteses relativas à contribuição de resíduos individuais para as relações funcionais e evolutivas entre proteínas. A Figura 1.9 apresenta um gráfico realizado pelo programa DIVAA que calcula a diversidade de aminoácidos em cada uma das 12 posições nos peptídeos e a derivação padrão, mostrando as posições onde ocorreu a maior diversidade de aminoácidos, o gráfico mostra que nas posições 2 e 5 houve a maior diversidade de aminoácidos enquanto que as

diversidade nas posições 6, 8 e na última posição a diversidade foi reduzida, ficando abaixo de 0,6.

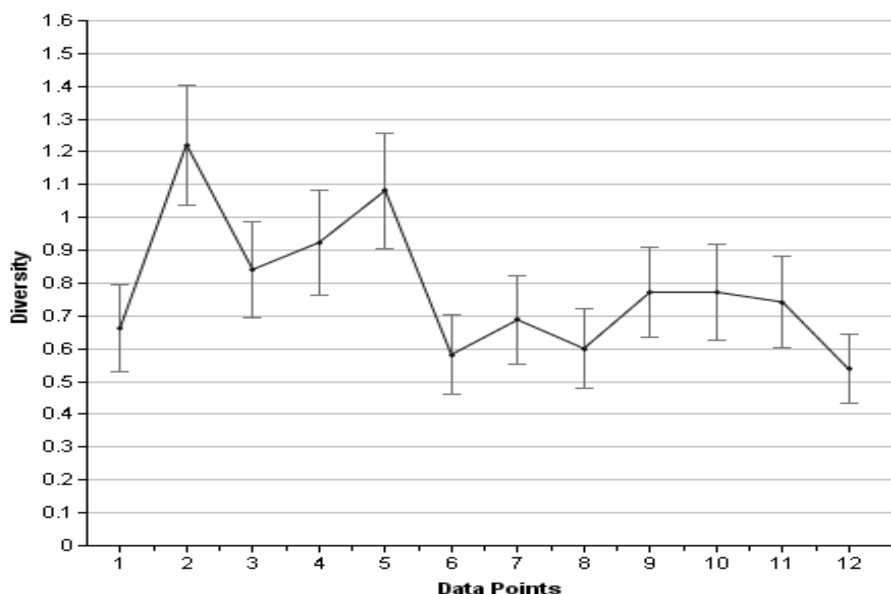


FIGURA 1.9. Gráfico construído pelo programa DIVAA que ilustra a diversidade de sucessão dos aminoácidos em cada posição nos peptídeos.

As seqüências protéicas dos peptídeos selecionados foram alinhadas entre si por quatro programas computacionais independentes, CLUSTAL W (v. 1.83), MUSCLE (v. 1.0), T-COFFEE (v. 1.14) e MAFFT (v. 5.860) (TABELA V). Não foi observada concordância nos alinhamentos entre os programas e optou-se pela não formação de motivos o que poderia induzir a identificações errôneas de proteínas, A possibilidade de cada seqüência mimetizar proteínas diferentes é grande, pois a seleção foi realizada contra anticorpos policlonais de proteínas totais de CaP.

Não foram encontradas homologias completas nas buscas realizadas nas seqüências de proteínas humanas do *GeneBank* pelo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>). Os alinhamentos revelaram similaridade entre os peptídeos selecionados e proteínas relacionadas a receptores de membranas, antígenos tumorais, transportadores, proteínas relacionadas a regulação gênica, componentes do sistema imune e um supressor de tumor (TABELA VI).

TABELA V. Alinhamentos das seqüências de aminoácidos dos 29 peptídeos selecionados pelos programas CLUSTAL W (v. 1.83), MUSCLE (v. 1.0), T-COFFEE (v. 1.14) e MAFFT (v. 5.860) mostrando a divergência entre os alinhamentos nos diferentes programas.

PROGRAMAS			
CLUSTAL W (v. 1.83)	MUSCLE (v. 1.0)	T-COFFEE (v. 1.14)	MAFFT (v. 5.860)
seq2 --MVSMDS-SPRDRL-	seq17 s-qntvlvhgtss-	seq1 -----S---T----W-----P---AF-RLFTKI---	seq1 STWPAFRLFTKI
seq12 ---NFMES-LPRLRMH	seq1 sTwpafrlftki--	seq2 ---MV--S-----MD-S---S-PR-D-RL---	seq8 ATWSHHLSSAGL
seq25 --SVSVG-MKPSRP-	seq3 d-rmllpfnlral-	seq3 -DRM-LL-----P-----FNL--R-AL-	seq15 YSEIRDSSDTAI
seq4 LLADTTHH-RPWT---	seq27 --nplipenvplr-	seq4 -----LLA-DTT---HH-R--P-----WT-----	seq28 HARINPSFPLPI
seq5 MFAPNMHY-RPSH---	seq24 s-ntaqanwaepf-	seq5 ---M-F-A---P--NMHY-R--P---SH-----	seq29 TNWRVEPSGIPI
seq10 --RGSVPN-APQFQF-	seq11 t-tfesntwsalh-	seq6 -----VLP-PKP---MR-Q--P-----V--A----	seq2 MVSMDS-SPRDRL
seq13 -SPTSFPN-APSL-Y-	seq12 n-fmeslprlrhm-	seq7 EYHLA--S--T-----P---AH-HY-----	seq25 SVSVG-MKPSRP-
seq23 --HPRSP--SPHYWS-	seq22 --sifpyphpaaft-	seq8 ---ATW-S-----HHL--S---S-AG---L---	seq10 RGSVPNAPQFQF-
seq22 ---SIFPYPHPAFT-	seq29 tnwrvepsgipl-	seq9 --G--DS-----KV--S-WG-IT--YS-	seq13 SPTSFPNAPSLY-
seq28 --HARINPSFPLPI--	seq28 --harinpsfplpi	seq10 ---RG--S--VP--N----A-P---QF-Q-F-----	seq12 NFMESLPRLRMH
seq14 -TVAQMP---PHWQLT	seq6 v-lppkpmrpqva-	seq11 ---TTFES-----NT--WS-----ALH--	seq20 TMGFTAPRFPHY
seq20 TMGFTAPR-FPHY---	seq14 t-vaqmpphwqlt-	seq12 -NFM--ES-L-----P-----RL--RMH--	seq11 TTFESNTWSALH
seq19 ----CLSG--PLADC-	seq4 --lladtthhrpwt	seq13 --SPT--S-----F---PR-AP--S-----LY--	seq26 AHENSIKPTQLH
seq7 --EYHLAS-TPAHHY-	seq5 --mfapnmhyrpsh	seq14 --TV---A-QMP-----P-----HWQL--T----	seq7 EYHLASTPAHHY
seq26 ---AHENSIKPTQLH-	seq20 t-mgftaprfphy-	seq15 -----Y-SE-----IRDS---S---DTAI---	seq22 SIFPYPHPAFT
seq27 --NPLIPENVPLRH--	seq13 s-ptsfprapsly-	seq16 ---MHR-S-----DLM-S---AA-VR-----	seq23 HPR-SPSPHYWS
seq6 -VLPPKPMRQPVA---	seq9 g-dskvswgitys-	seq17 -----SQNTV--LVHGT--S---S-----	seq4 LLADTTHHRPWT
seq3 -DRMLLPFNLRAL---	seq23 ---hprspshyws	seq18 ---GGMT-----PG--S-LGL--KQ---	seq5 MFAPNMHYRPSH
seq18 --GGMTPGSLGLKQ--	seq16 m-hrsdlmsaavr-	seq19 -----CLS-G-----P-----L---ADC	seq6 VLPPKPMRQPVA
seq9 -GDSKVSWGITYS---	seq10 --rgsvpnappqf	seq20 --TMGFTA---P-----R-FP---HY-----	seq16 MHRSDLMSAAVR
seq1 ---STWPAFRLFTKI-	seq19 ----clsgpladc	seq21 -----W-S-----LNGSG--FS-MR---F---	seq14 TVAQMPPHWQLT
seq11 ---TTFES-NTWSALH	seq18 g--gmtpgslglkq	seq22 -----S-----IFPYPH--P-AA-FT-----	seq21 WSLNGSGFSMRF
seq8 ---ATWSHHLSSAGL-	seq26 --ahensikptqlh	seq23 --HPR--S-----P--SPHYWS-----	seq18 GGMTPGSLGLKQ
seq17 --SQNTVLVHGTSS--	seq15 --yseirdssdtai	seq24 -----S-NTAQANW---AEP--F-----	seq27 NPLIPENVPLRH
seq16 --MHRSDLMSAAVR--	seq7 --eyhlastpahhy	seq25 --S---VS-----V-GMKPSRP--P-----	seq24 SNTAQANWAEPF
seq21 ---WSLNGSGFSMRF--	seq8 aTwsHhlssagL-	seq26 -AHE--NS-IK-----P-----TQL---H---	seq19 CLSGPLAD---C
seq29 TNWRVEPSGIPI----	seq21 --wslngsgfsmrf	seq27 -----NP-LIP----EN-V--P-----L--R-H--	seq3 DRMLLPFNLRAL
seq24 --SNTAQANWAEPF--	seq2 --mvsmdssprdl	seq28 -----HA-RINP---S-FPL--PI---	seq9 GDSKVSWGITYS
seq15 --YSEIRDSSDTAI--	seq25 --svsvgmkpsrp	seq29 -----T-----N--W-RVEP---S--GI--PI---	seq17 SQNTVLVHGTSS

TABELA VI. Alinhamento das seqüências protéicas dos peptídeos selecionados mostrando as homologias encontradas com as proteínas anotadas no banco de dados do *GeneBank* pelo BLAST, com os números de acesso no NCBI e UniProt e suas prováveis funções.

	Peptídeo	NCBI	UniProt	Alvos Potenciais
01	STWPAFRLFTKI	AAH12372.2	Q96EG2	Componente C4do sistema complemento
02	MVSMDSPPRDL	NP_001398.1	Q9NYQ7	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3 [Precursor] ou Multiple epidermal growth factor-like domains 2 Caderinas são glicoproteínas envolvidas em adesão celular Ca ²⁺ -mediada; estes domínios ocorrem como repetições nas regiões extracelulares que é mediado contato de célula-célula quando ligado ao cálcio; tem um papel na morte celular, sinalização, proliferação, diferenciação, e migração. Receptor que pode ter um papel importante em célula/célula que sinaliza durante formação de sistema nervoso. Localização subcelular: Membrana; proteína transmembrana.
03	DRMLLPFNLRAL	AAH98390.1	Q9UP95	Carregador de soluto (transportador de sódio/potássio) Transporte eletroneural de potássio-cloro quando ativado pelo turgimento da célula. Pode contribuir para a homeostase do volume celular em células únicas. Pode estar envolvido na regulação da saída de Cl (-) basolateral na absorção do NaCl pelos epitélios (Por similaridade). Onipresente. Níveis são muito mais altos em eritrócitos de pacientes com o Hb SC e Hb SS comparou a eritrócitos AA normal. Localização subcelular: Membrana; proteína transmembrana.
04	LLADTTHHRPWT	AAG23170.1	O15015	Proteína Zinc finger 646 Pode estar envolvida na regulação do sinal de transdução. Localização subcelular: núcleo
05	MFAPNMHYRPSH	CAH71015.1	Q5VT29	Proteína ativadora de GTPase e domínio VPS9 1
06	VLPPKPMRQPVA	CAI12344.1	Q5VWF2	Proteína quinase deficiente de lisina 2; mitogen-activated protein kinase; sorologicamente definida como antígeno 43 de câncer de cólon
07	EYHLASTPAHHY	NP_001026857	O14986	Fosfatidilinositol-4-fosfato-5-quinase Media a reorganização RAC1-dependente de filamentos de actina (por similaridade). Participa da biossíntese de phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. Localização subcelular: membrana intracitoplasmática; associada com membranas
08	ATWSHHLSSAGL	NP_001367.2	Q14204	Dineína citoplasmática, polipeptídeo pesado 1 A dineína é um conjunto de proteínas responsável pelo transporte de materiais dentro de uma

				célula. Ela está envolvida no movimento dos cromossomos durante a divisão celular, na organização do fuso durante a mitose ou na regulação da formação de microtúbulos . Dineína tem atividade de ATPase. Localização subcelular: Citoplasma.
09	GDSKVSWGITYS	AB036829	Q9BT40	SKIP (Skeletal muscle and kidney-enriched inositol phosphatase) Inositol 5-fosfatase que atua no inositol 1,4,5-trisfosfato, inositol 1,3,4,5-teraquifosfato, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato e fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato. Tem 6 vezes mais afinidade por fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato que para inositol 1,4,5-trisfosfato. Pode regular negativamente o conjunto de actinas do citoesqueleto. Localização subcelular: retículo endoplasmático, estimulado com EGF e translocado para dobras da membrana
10	RGSVPNAPQFQF	CAI42614.1	-	SWI/SNF relacionada, matriz associada regulador da cromatina actina dependente Componente de transdução de energia dos complexos NURF (fator de remodelamento do nucleossomo) e CERF (CECR2- fator de contenção do remodelamento). Ambos os complexos facilitam a perturbação de estrutura da cromatina de uma forma ATP-dependente. Pode estar envolvido no desenvolvimento do cérebro regulando a expressão de En-1 e En-2. Pode ser envolvido no desenvolvimento de células luteas. Localização subcelular:: núcleo.
11	TTFESNTWSALH	P10721	P10721	Precursor do receptor de crescimento celular Mast/stem (SCFR) (Proto-oncogene quinase proteína-tirosina Kit) (c-kit) (antígeno CD117) Este é o receptor para fator de célula tronco (fator de crescimento células mast). tem uma atividade de tirosina-proteína quinase. Ligação a ligantes leva a autofosforilação do KIT, e em associação com substratos como fosfatidilinositol 3-quinase (Pi3K). Localização subcelular: Membrana.
12	NFMESLPRLRMH	NP_068776.1	P54840	Glicogênio sintase 2 Transfere um resíduo glicosil de UDP-Glc para a extremidade final não redundante alfa-1,4-glucan.
13	SPTSFPAPPSLY	NP_958845	P23193	Fator de alongação da transcrição Necessário para a eficiência da alongação naRNA polimerase II da transcrição. Localização subcelular: Núcleo .
14	TVAQMPPHWQLT	AAH66597	O75131	Copina III Pode funcionar no transporte de membrana. Exibe propriedades de ligação fosfolipídica cálcio-dependente. Parece ter uma atividade de proteína quinase. Onipresente.

15	YSEIRDSSDTAI	NP_000326	Q14524	Canal de sódio tipo V alfa dependente de voltagem isoforma 6 Esta proteína media a permeabilidade de íon de sódio voltagem-dependente de membranas excitáveis. Assumindo conformações aberta e fechada em resposta à diferença de voltagem na membrana, a proteína forma um canal sódio-seletivo por qual Na(+) íons podem passar de acordo com seu gradiente eletroquímico. É uma isoforma Na(+) tetrodotoxin-resistente) de canal. Este canal é responsável pelo traço ascendente inicial do potencial de ação no eletrocardiograma. Localização subcelular: Membrana; proteína de passe múltiplo de membrana
16	MHRSDLMSAAVR	Q86SQ7	Q86SQ7	Antígeno 8 de câncer de colón definido sorologicamente (autoantígeno de câncer de colón centrossomal) (hCCCAP) (Antígeno NY-CO-8) Expresso em timo, próstata, testículo, ovário, intestino delgado, cólon, mucosa do cólon e tumores de câncer renais. Localização subcelular: Centrossomo.
17	SQNTVLVHGTSS	AAB83982.1	P33527	Proteína de resistência a múltiplas drogas Pode participar diretamente no transporte ativo de drogas em organelas subcelulares ou influencia indireta na distribuição de drogas. Confere resistência a drogas anticâncer. Transporta LTC4. Pode proteger o leite contra xenobióticos Expresso em Fígado, testículo e células mononucleares do sangue. Localização subcelular: Membrana; proteína de passe múltiplo de membrana.
18	GGMTPGSLGLKQ	AAH65223.1	Q6P189	Antígeno HA-1 menor do complexo de histocompatibilidade
19	CLSGPLADC	AF468657_1	Q8TEU8	Proteína inibidora de protease multivalente – ativador de GTPase
20	TMGFTAPRFPHY	NP_003473	O14686	<i>myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 2</i> Pode estar envolvida na regulação transcricional. Este gene foi mapeado de uma região cromossômica envolvida em duplicações e translocações associadas com câncer. Localização subcelular: Núcleo
21	WSLNGSGFSMRF	Q15149	Q15149	Plectina-1 (PLTN) (PCN) (Hemidesmosomal protein 1) (HD1). Interliga filamentos intermediários com microtúbulos e microfilamentos e ancora filamentos intermediários para desmossomos ou hemidesmosomos. Também pode ligar proteínas de músculo como actina para complexos de membrana em músculo. Pode estar envolvido não apenas na ligação cruzada e estabilização da rede de filamentos intermediários do citoesqueleto, mas também na regulação da dinâmica deles. Amplamente expresso com níveis mais altos em músculo, coração, placenta e corda espinhal.

22	SIFPYPHPAFT	AAH45764.1	Q86XA9	C14orf125 protein (chromosome 14 open reading frame 125)
23	HPRSPSPHYWS	AAC18274.1	-	Cadeia pesada variável de imunoglobulina
24	SNTAQANWAEPF	CAI13559.1	Q5QP32	Proteína nova
25	SVSVGMKPSRP	Q9BTC0	Q9BTC0	Obliterador morte-indutor 1 (DIO-1) (fator 1 de transcrição associado a morte) (DATF-1) (hDido1). Putativo fator de transcrição, fracamente pró-apoptótico quando superexpresso. Supressor de Tumor. Onipresente Localização subcelular: Citoplasma. Núcleo. Transloca depois para o núcleo estímulos estímulos pró-apoptóticos.
26	AHENSIKPTQLH	Q8N6M6	Q8N6M6	Aminopeptidases O Aminopeptidases catalisam a hidrólise de resíduos de aminoácido N-terminal de peptídeos ou substratos de proteínas. Pode ter um papel no processo prolífico de peptídeos bioativo em tecidos como testículo e coração Predominantemente expresso em pâncreas, placenta, fígado, testículo e coração. Baixa expressão em cérebro, pulmão e rim. Localização subcelular: Citoplasma
27	NPLIPENVPLRH	Q96FZ7	Q96FZ7	Proteína de corpo de multivesicular carregada 6 (proteína de modificação de cromatina6) Componente do complexo de ESCRT-III que é necessária para formação de corpos de multivesicular (MVBs) e arranjando proteínas carregadoras endossomais em MVBs. A vias de MVB media o transporte de proteínas transmembrana no lúmen do lisossomo para degradação. O complexo de ESCRT-III é provavelmente envolvido na concentração de carregamento de MVB. Provavelmente serve como um receptor para o complexo ESCRT-II em membranas de endossomos no complexo de ESCRT-III. Expressa em todos os tecidos. Localização subcelular: Membrana intracitoplasmática, endossomo, membrana endossomal.
28	HARINPSFPLPI	O75920	O75920	Pequeno fator rico em EDRK 1a. O gene codifica uma proteína de função desconhecida que é parece ter baixa homologia com o domínio RNA-ligante de matrin-ciclophilina, uma proteína que colocaliza com pequenas ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs) e o produto gênico SMN.
29	TNWRVEPSGIPI	AAD48833.1	-	Região variável DPL5 cadeia leve kappa de imunoglobulina

4 IMUNORREATIVIDADE DOS PEPTÍDEOS COM SORO HUMANO

Buscando melhor caracterizar os peptídeos selecionados como possíveis biomarcadores prostáticos, verificou-se a sua imunorreatividade contra imunoglobulinas tipo IgG circulante de pacientes com CaP, HPB e homens jovens como controle negativo.

4.1 Peptídeo Array

Soros de 10 pacientes com câncer de próstata, 10 com HPB e 10 homens jovens (controle negativo), devidamente identificados e caracterizados por urologistas, foram purificados por imunoprecipitação com microesferas magnéticas ativadas com proteína G para obtenção de IgG circulante para os ensaios de *Dot immunoblotting*.

A utilização de microesferas magnéticas foi extremamente importante pois é uma metodologia rápida e eficaz na obtenção de IgG de boa qualidade e excelente grau de pureza utilizando-se pequena quantidade de soro. A Figura 1.10 apresenta um gel SDS-PAGE das imunoglobulinas tipo G purificadas com microesferas magnéticas.

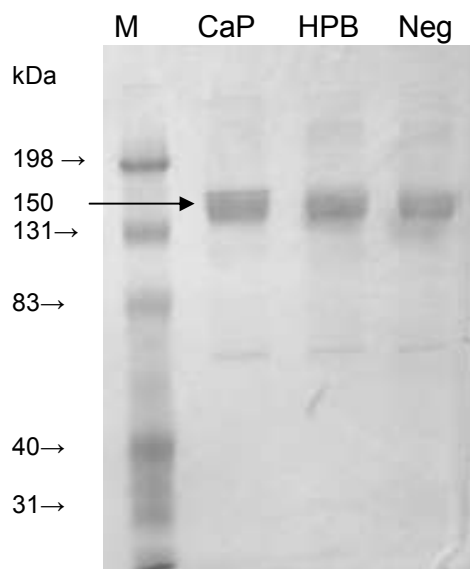


FIGURA 1.10. Eletroforese em SDS-PAGE (Gel 16%) corado com coomassie blue. Preparações de IgG obtidas por imunoprecipitação com microesferas magnéticas. M- marcador de peso molecular; CaP- câncer de próstata, HPB, hiperplasia prostática benigna.

As IgGs purificadas foram utilizadas em três ensaios de peptídeo *array* onde foram incubadas com os fagos imobilizados em membranas de nitrocelulose. Todos os peptídeos foram imunorreativos contra as IgGs testadas e mostraram reatividade diferencial entre os grupos (FIGURA 1.11).

A imunorreatividade dos peptídeos foi estimada calculando-se as DO relativas pela média das 6 leituras de para cada *dot* das 3 membranas, com as quais pode ser feito o gráfico apresentado na Figura 1.12 para a comparação de reatividade dos fagos aos 3 grupos de IgG. Constatou-se que 17 clones foram específicos para CaP, 7 para HPB e nenhum para os controles negativos. Os clones 2, 3, 5, 10, 13 e 23 apesar de serem mais imunorreativos para CaP, apresentaram reatividade menor que o fago selvagem. Os peptídeos 12, 13, 14, 19, 21, 27 e 28 foram reativos para HPB. A presença de clones mais reativos para HPB é esperada, pois pacientes com adenocarcinoma também apresentam tecido normal e hiperplásico e também inflamações.

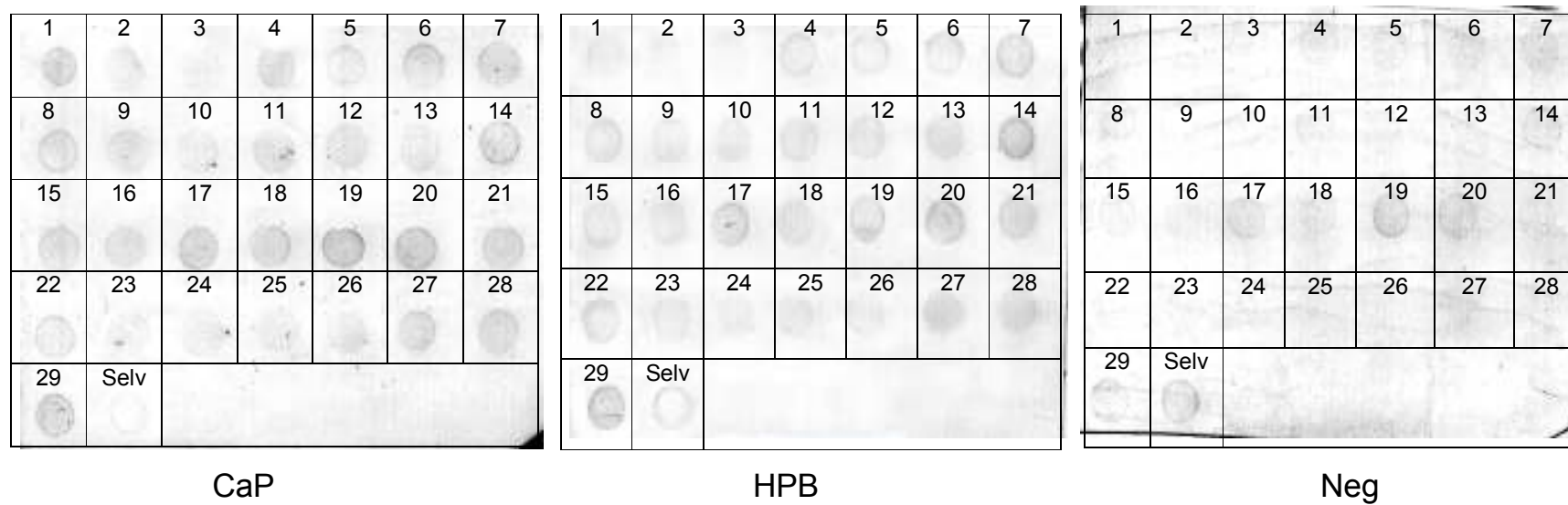


FIGURA 1.11. *Phage Peptide Arrays* em membranas com 29 clones de fago selecionados por *Phage Display*. As membranas foram sondadas com IgGs purificadas de *pools* de pacientes com CaP, HPB e controles sadios. Selv= fago selvagem.

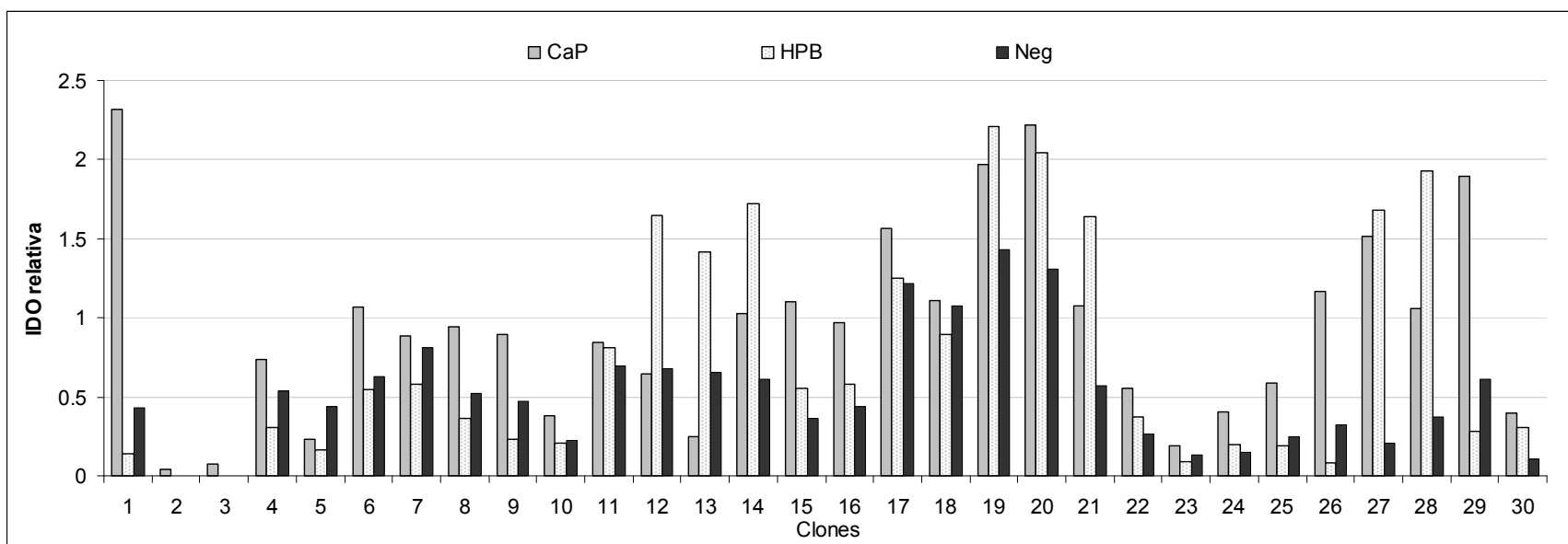


FIGURA 1.12. Gráfico representativo das densidades ópticas relativas obtidas para cada um dos 29 clones recombinais e para o fago selvagem (30) nos ensaios com *phage* peptídeo array sondados com IgGs purificadas de pacientes com CaP, HPB e controles sadios (Neg).

DISCUSSÃO

Este trabalho foi desenhado com o propósito de selecionar peptídeos miméticos de proteínas prostáticas através da metodologia de *phage display* que possam ser utilizados como biomarcadores potenciais de câncer de próstata (CaP) e hiperplasia prostática benigna (HPB) a partir de imunoglobulinas tipo Y geradas em galos imunizados com proteínas totais de próstatas de 20 pacientes com CaP.

A escolha de galos para as imunizações foi baseada na distância evolutiva desses animais aos seres humanos, acreditou-se que como as aves não tem próstata produziram uma variabilidade maior de anticorpos do que outros mamíferos comumente utilizados em experimentos de imunizações, tais como coelhos, cabras e camundongos.

A utilização de imunoglobulina de galinha (IgY) para pesquisas proteômicas foi denominada *IgY technology* por Zhang (2003), dentre as vantagens desta tecnologia destacam-se a capacidade das IgYs apresentarem alta afinidade e títulos persistentes (LEMAMY *et al.* 1999), produção de resposta imune a antígenos conservados em mamíferos e produção maior e em escala, tendo como fontes dos anticorpos o soro e os ovos (GASSMANN *et al.* 1990). Diferenças bioquímicas e imunológicas são marcantes como a não ligação de receptores Fc de bactérias e mamíferos (proteínas A ou G) (BARKAS *et al.* 1979), ausência de reação com IgGs de mamíferos (HADGE; AMBROSIUS, 1984) e fatores do complemento (CARLANDER *et al.* 2000), possuir grande afinidade (IKEMORI *et al.* 1993) e avidéz (STUART *et al.* 1988), resistência a pH extremo (LEE *et al.* 2002) e temperatura (JENSENIUS *et al.* 1988), motivo pela qual têm sido usadas eficientemente em análises imunológicas (SCHADE; HLINAK, 1996).

Outra vantagem na escolha de galos para as imunizações é a posterior produção de anticorpos monoclonais por *phage display* e construção de bibliotecas combinatoriais derivadas dos genes de anticorpos de aves (BARBAS *et al.* 2001). A construção dessas bibliotecas a partir de RNAm amplificado de

genes de anticorpos via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é mais simples que em mamíferos que apresentam muitos genes responsáveis pela síntese de anticorpos necessitando de muitos pares de *primers*, enquanto galinhas apresentam apenas um gene, simplificando muito o processo.

A escolha por animais SPF para o experimento teve como princípio excluir o máximo de anticorpos que possam vir a ser gerados por contaminação externa e não pelas sucessivas imunizações. Não se utilizou fêmeas pela dificuldade de obtenção dos animais devido ao alto valor econômico para os criadores.

Outra medida que foi tomada se deu em relação à salubridade do ambiente no qual os animais estavam confinados; uma fumigação com KMnO_4 + Formol foi realizada no biotério da Granja Planalto, em sala específica e lacrada, com dois dias de antecedência à chegada dos galos. Tal preocupação se deve ao fato de que a seleção de fagos seria realizada com anticorpos purificados destes animais, o que poderia aumentar os riscos de obter seqüências inespecíficas para o trabalho.

Todos os animais imunizados desenvolveram anticorpos reativos a muitas frações antigênicas do extrato protéico de próstata em contraste com os animais controles e reações negativas antes das imunizações. Estes resultados estão de acordo com Lemamy *et al.* (1999) cujo trabalho demonstrou a capacidade das aves produzirem anticorpos com alta afinidade, alto título e grande persistência da resposta imune para proteínas de bactérias e mamíferos. Prudêncio *et al.* (2004) por meio da imunização de galinhas com proteínas totais de *Boophilus microplus*, conseguiu altos títulos de anticorpos, mesmo o carrapato não sendo parasito específico de aves domésticas, possibilitando identificar peptídeos através de purificação de imunoglobulinas do tipo Y nestes animais.

Os anticorpos policlonais anti-proteínas totais de câncer de próstata obtidos neste trabalho apresentaram títulos satisfatórios suficientes para os procedimentos de seleção. A purificação foi eficiente mesmo utilizando-se o soro dos animais imunizados em uma coluna cromatográfica específica para purificação de IgY de gema de ovo.

A seleção dos fagos ligantes aos anticorpos produzidos, foi realizada com três bibliotecas de peptídeos expressos em fagos M13 com 7, 9 e 12-mer.

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

Observou-se (TABELA II) uma queda esperada no número de partículas virais selecionadas no segundo ciclo de seleção ($6,3 \times 10^5$ pfu), pois a partir dessa etapa a estringência de seleção foi elevada pelo aumento da concentração Tween 20 de 0,1% para 0,5% no tampão de lavagem. Esse detergente é classificado como não iônico e tem por finalidade impedir ligações inespecíficas do anticorpo aumentando a eficiência de seleção de fagos específicos de proteínas prostáticas.

A especificidade dos peptídeos selecionados foi assegurada pela eluição por afinidade com proteínas específicas de câncer de próstata. Essa especificidade pôde ser observada no ensaio de *Western blotting* onde foi constatada imunorreatividade dos anticorpos aos peptídeos fusionados na proteína pIII (FIGURA 1.4). Este resultado mostrou a interação dos anticorpos anti-CaP com os peptídeos recombinantes e excluiu a possibilidade da interação dos anticorpos com outras proteínas do capsídeo viral. Além disto, a quantidade de fagos em todas as amostras foi idêntica (1×10^{10} partículas virais); já a marcação da pIII na membrana foi diferenciada, com intensidade crescente do 1º para o 3º ciclo de *Biopanning*. A quantidade de pIII nas três amostras foi constante, porém a intensidade de imunorreatividade presente na posição relativa a esta proteína não foi a mesma, indicando que os peptídeos recombinantes, presentes também nesta posição, foram os responsáveis pela variação na intensidade da imunorreatividade observada nos três ciclos de *Biopanning*. Esta variação na intensidade demonstra que no decorrer do *Biopanning* houve

aumento na população de fagos carreadores de peptídeos recombinantes antigênicos aos anticorpos policlonais anti-CaP.

Apesar do presente estudo ter utilizado, em conjunto, duas bibliotecas lineares (7 e 12-mer) e uma conformacional (9-mer) de peptídeos recombinantes (New England Biolabs, Ph.D.-12TM or Ph.D.-C7CTM), durante os ciclos de seleção, apenas um peptídeo com menos de 12 resíduos foi selecionado. Nesta investigação não foi possível isolar mais do que um epítipo conformacional com nove resíduos. Du *et al.* (2006) utilizando as bibliotecas 12-mer e 7-mer concomitantemente também detectou apenas peptídeos com 12 aminoácidos e sugere que a biblioteca de PhD-12 apresenta melhor capacidade de propagação. Outra possível explicação se deve a possibilidade das proteínas mimetizadas apresentarem epítipos ou motivos com mais de sete resíduos.

Adicionalmente, bibliotecas 12-mers são relativamente longas e capazes de se dobrar em elementos estruturais curtos que podem ser úteis quando a seleção é feita contra alvos que requerem ligantes estruturados (http://www.neb.com/nebecomm/tech_reference/drug_discovery/phdFaq.asp#3.1).

Apenas um peptídeo conformacional com nove resíduos foi selecionado, provavelmente a proteína mimetizada pode apresentar epítipos conformacionais, pois a biblioteca de -C7C é indicada para alvos cujos ligantes localizam-se em uma alça na superfície da molécula, como anticorpos com epítipos estruturais. Adicionalmente, a restrição natural imposta pelas pontes dissulfeto no não reconhecimento de ligantes resulta em uma entropia de ligação mais favorável, melhorando a energia livre total de ligação comparada a ligantes não estruturais. A desvantagem principal deste tipo de biblioteca é que essa restrição pode desestabilizar uma conformação necessária para ligação ao alvo (http://www.neb.com/nebecomm/tech_reference/drug_discovery/phdFaq.asp#3.1).

Na população de peptídeos seqüenciados foi observada a ausência de resíduos de cisteína; uma causa provável é a interferência no processo infectivo do fago na bactéria, pois, de acordo com Rodi, Soares e Makowski (2002), resíduos de cisteína não pareados (sem formar ponte dissulfeto) presentes no peptídeo sintético podem formar pontes dissulfeto com os quatro resíduos de cisteína localizados no domínio D1 da pIII, e desta forma diminuir a infectividade do fago. Assim, peptídeos com cisteína são menos freqüentes na população

selecionada, fato este que compromete o mapeamento de epítomos e isolamento de mimetopos de proteínas ricas em cisteína.

Outra evidência da especificidade dos peptídeos selecionados às proteínas tumorais é a presença do peptídeo 25 (SVSVGMKPSRP) que também foi selecionado por Huang *et al.* (2005) que realizou um biopanning com a biblioteca Ph.D.-12TM (New England Biolabs) contra células da linhagem celular Capan-2 de adenocarcinoma pancreático após irradiação com raios-X. Isso sugere que este peptídeo está relacionado com proteínas de adenocarcinomas, pelo menos de próstata e de pâncreas, e que existe grande possibilidade de que os outros peptídeos também sejam.

As evidências experimentais pelos testes de *Dot immunoblotting* e ELISA com as IgY comprovaram a especificidade dos clones selecionados além de excluir a possibilidade de ocorrência de ligação cruzada dos clones com outros anticorpos irrelevantes (não reativos à CaP). Essas duas metodologias mostraram-se eficientes na verificação da imunorreatividade dos peptídeos.

Verificou-se aqui a eficiência da eluição por afinidade com extrato protéico de CaP pela inexistência de clones com reação cruzada com anticorpos não específicos de CaP mesmo pela utilização de anticorpos policlonais. Entretanto, cuidados devem ser tomados, pois anticorpos policlonais desenvolvidos contra um grande antígeno certamente contêm numerosos epítomos correspondentes a diferentes regiões do antígeno e, normalmente, soros policlonais reconhecem outros antígenos não relacionados com o alvo desejado (GEVORKIAN, 1998). No presente trabalho, a eluição por afinidade minimiza a seleção de clones que reagem com anticorpos não específicos ao alvo de interesse, pois por competição as ligações entre o fago e o anticorpo são quebradas quando as proteínas, que são mais específicas, possuem os epítomos completos, são adicionadas e os fagos eluídos.

O cálculo da frequência dos aminoácidos dentro da população de peptídeos pelo programa AADIV também mostrou eficiência na seleção dos peptídeos quando comparada à frequência de aminoácidos presentes nos fagos da biblioteca indicando a seleção positiva para os aminoácidos His, Pro e Fen e negativas para Cis, Lys e Gln (TABELA IV). Os aminoácidos Arginina e Cisteína, que também tiveram seleção negativa neste estudo, atuam na secreção de

Proteína III e podem interferir na infectividade dos fagos. Conseqüentemente, clones com peptídeos contendo estes aminoácidos podem ser menos freqüentes durante a seleção (NOREN; NOREN, 2001).

Devido à divergência de resultados entre os programas utilizados para o alinhamento entre as seqüências peptídicas dos fagos selecionados não foi possível identificar motivos protéicos. Apesar de programas de Bioinformática serem constantemente solicitados nas previsões estruturais, propriedades físico-químicas e imunológicas de proteínas desconhecidas, eles podem apresentar falhas, pois suas bases para análises em sua maior parte são apenas as estruturas primárias das proteínas. Desta forma, justificam-se a ausência de seqüências consenso e a hipótese dos peptídeos selecionados serem mimetopos de proteínas diferentes. Esta hipótese também é suportada pelo baixo número de peptídeos repetidos, sendo em sua maioria seqüências únicas.

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

Neste estudo alvos potenciais são apresentados a partir de similaridades significativas entre os peptídeos e seqüências protéicas anotadas no *GeneBank*. Foram identificadas similaridades entre proteínas do sistema imune, sistema complemento (peptídeo 1), antígeno do complexo de histocompatibilidade (18) e regiões variáveis de imunoglobulinas (23 e 29) que podem estar relacionados com a resposta imune ao tumor; ativadores de GTPase e o peptídeo 05, aminopeptidases (peptídeo 26) entre outras. Grande número de peptídeos estão relacionados a proteínas de membrana transportadoras (peptídeos 03, 14, 15, 17 e 27), receptores celulares sinalizadores e moléculas de adesão (02 e 11),

proteínas relacionadas à regulação gênica e transcrição (04, 13 e 28) e proteínas relacionadas com filamento de actina, mobilidade intracelular e citoesqueleto (07, 08, 09, 21).

Foram encontradas similaridades com proteínas relacionadas a processos tumorais, dentre elas dois antígenos tumorais similares aos peptídeos 06 e 16, este último também expresso em próstata, um regulador transcricional de células tumorais (peptídeo 20) e um gene supressor de tumor similar ao peptídeo 25, que também foi selecionado por Huang *et al.* (2005) para adenocarcinoma de pâncreas.

Sabe-se que antígenos intracelulares normalmente não induzem resposta imune, contudo a necrose tumoral pode ser responsável pela liberação de proteínas citoplasmáticas que subsequenteiramente podem ativar o sistema imune do hospedeiro (CHRISTIAN; ELKON, 1986). Essa pode ser uma provável explicação para as similaridades encontradas com proteínas nucleares e citoplasmáticas. Outra explicação deve-se ao fato dos galos terem sido imunizados por extrato protéico de células lisadas o que expõe as proteínas intracelulares.

A comparação simplesmente pelo BLAST pode não apresentar todos os ligantes aos anticorpos quando são utilizadas apenas as seqüências lineares dos peptídeos (alinhamento pelas estruturas primárias das proteínas). As redundâncias e altos sinais imunoquímicos poderiam ocorrer em casos de sobreposição dos anticorpos ligantes nos epítomos (DYBWAD *et al.* 1993; FOLGORI *et al.* 1994). Somente um limitado número de trabalhos têm sido publicados para a determinação dos diferentes grupos de epítomos que são identificados pela seleção de preparações de anticorpos policlonais purificados (KAY *et al.* 1993; ROBERTS; GUEGLER; WINTER, 1993; RO; CHEN; SHIUAN, 1994).

Irving; Pan; Scott, (2001) relataram que em casos de baixa similaridade estrutural podem ocorrer contatos realizados via redes de ligações diferentes das realizadas entre o parátomo com o epítomo nativo. Desta forma, a interação entre o peptídeo recombinante e o epítomo pode ocorrer sem necessidade de identidade estrutural. Ainda, Liu *et al.* (2003) relataram que mimetopos sem similaridades estruturais com o epítomo nativo, geralmente são isolados durante o

Biopanning por anticorpos que possuem epítomos nativos descontínuos, assim, alguns clones imunorreativos que não apresentaram homologias perfeitas, podem ser mimetopos de epítomos conformacionais presentes nas proteínas de CaP.

A estratégia de exposição de peptídeos em fagos permite que anticorpos selecionem seus próprios peptídeos ideais. Além disso, alguns dos peptídeos selecionados podem não ter seqüências homólogas do imunógeno original, contudo podem mimetizar a estrutura deste imunógeno. Estes peptídeos miméticos (mimetopos) são extremamente importantes para o diagnóstico e prognóstico tão bem como uma nova forma de vacina, especialmente quando a imunidade protetora não pode ser obtida com os antígenos originais. Abordagens baseadas em *Phage Display* indiscutivelmente são importantes para a avaliação da resposta imune humoral em pacientes com câncer (HANSEN; OSTENSTAD; SIOUD, 2001).

O *pool* de imunoglobulinas de soros de pacientes com CaP pode conter o repertório de anticorpos contra o tumor (MINTZ *et al.* 2003). A verificação de imunorreatividade dos peptídeos selecionados contra o repertório de IgG circulante de pacientes com CaP, HPB e homens jovens com controle negativo foi realizada neste trabalho com o intuito de melhor caracterizar os peptídeos selecionados como potenciais biomarcadores tumorais identificando a presença de autoanticorpos anti-CaP nos pacientes testados. Utilizando *pool* de IgGs de pacientes foi possível verificar que 72% dos clones reagem positivamente com CaP, 24% com HPB e apenas um clone apresentou maior reatividade para o controle negativo. Esses resultados, mesmo sendo preliminares, validam a utilização potencial desses marcadores para investigações da resposta imune humoral de pacientes com câncer. Vários trabalhos utilizaram peptídeos expressos em fagos para esse tipo de análise (HANSEN; OSTENSTAD; SIOUD, 2001; SANTAMARIA *et al.* 2001; MINTZ *et al.* 2003, FOSSA *et al.* 2004).

Utilizando fagos imobilizados em membranas, Hansen; Ostenstad; Sioud (2001) verificaram que peptídeos selecionados contra IgG de pacientes com câncer de mama apresentaram reatividade não significativa para os *pools* de IgG de soros de indivíduos normais, pacientes com linfoma e pacientes com osteosarcoma, porém apresentaram forte reatividade para um *pool* de soros de pacientes com câncer de mama. Quando alguns dos peptídeos foram testados

para soros individuais cerca de 15% apresentaram reatividade positiva para pacientes com câncer de mama.

Os peptídeos selecionados apresentam reatividade diferencial entre os soros de pacientes testados individualmente (HANSEN; OSTENSTAD; SIOUD, 2001; SANTAMARIA *et al.* 2001; MINTZ *et al.* 2003). Santamaria *et al.* (2001) realizou vários ensaios de ELISA com fagos miméticos de HPV com soro de pacientes com câncer cervical e observaram que 44% de pacientes reagiram positivamente pelo menos com 1 clone, enquanto que 8% das pacientes do grupo controle apresentaram reação a pelo menos 1 clone, sugerindo que uma combinação de vários epítomos doença-específicos gerados por *phage display* pode compor um ensaio diagnóstico multicomponente potencial para a detecção do HPV em lesões cervicais pré-cancerosas.

Fossa *et al.* (2004), identificaram imunorreatividade de antígenos identificados por *phage display* e testados contra um pequeno painel de paciente com CaP e normais, e mostraram reconhecimento diferencial de algumas proteínas, sugerindo que a exposição de peptídeos em fagos combinada a um *screening* de seleção pós-imune é adequado para identificação de um repertório de antígenos por bibliotecas de cDNA de tumor.

O perfil da resposta imune em pacientes com câncer pode fornecer informações valiosas de proteínas celulares que podem induzir a resposta imune. A regressão tumoral é um processo que parece ser o resultado da interação do sistema imune com células tumorais. Então, em alguns pacientes, o sistema imune parece ser ativado contra células tumorais. Resposta imune contra algumas proteínas celulares tem sido descritas em pacientes com câncer. A resposta imune específica em pacientes com câncer pode ser elucidada por *phage display* facilitando o estudo da imunologia do tumor (HANSEN; OSTENSTAD; SIOUD, 2001).

O presente trabalho apresenta a seleção de peptídeos recombinantes por *phage display* contra imunoglobulinas obtidas através de imunização de animais com extrato protéico de tecidos prostáticos tumorais que podem ser utilizados como biomarcadores em diagnóstico. Há necessidade de realização de mais testes de especificidade e sensibilidade para este propósito. Além disso, esses peptídeos podem ser utilizados na identificação das proteínas alvo tumorais para

melhor entendimento do processo de tumorigênese, ou ainda como possíveis alvos em imunoterapia. Estudos adicionais nesse sentido são de grande importância.

A continuidade deste trabalho faz-se necessária no intuito de avaliar a imunorreatividade dos peptídeos selecionados com mais profundidade para possível utilização em diagnósticos mais eficientes e precisos do CaP e HPB, além da identificação e mapeamento de epítomos das proteínas mimetizadas.

CONCLUSÕES

Pela análise da resposta imune em galos imunizados com o extrato protéico de câncer de próstata, foi possível demonstrar neste trabalho a capacidade de se utilizar galinhas como fonte produtora de anticorpos policlonais, tendo os animais apresentados altos títulos, a purificação eficiente e os anticorpos funcionalmente ativos. O processo de seleção de peptídeos por *Phage display* apresentou ser eficiente pela seleção de peptídeos imunorreativos contra os anticorpos alvo testados, não apresentando reação cruzada com outras IgYs irrelevantes demonstrando a eficiência de seleção de peptídeos alvo-específicos. A eluição com as proteínas totais provavelmente foi responsável pela eficiência da seleção de peptídeos específicos de câncer que selecionou o peptídeo SVSVGMKPSRP também selecionado por outros pesquisadores em adenocarcinoma de pâncreas. A não concordância entre os programas de alinhamentos de seqüências pode ser um indicativo de que os peptídeos selecionados sejam mimetópos de epítópos de proteínas diferentes, provavelmente pela seleção ter sido realizada com anticorpos policlonais. Os peptídeos obtidos apresentaram similaridades nos alinhamentos com diversas proteínas relacionadas com processos tumorais, tais como adesão, transporte intra e intercelular e regulação gênica. Os peptídeos selecionados apresentaram reatividade diferencial quando utilizados em imunoensaios para o estudo da diversidade humoral de pacientes com CaP e HPB, indicando grande potencial para o diagnóstico dessas alterações, embora ainda seja necessário muitos estudos nesse sentido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BARKAS, T., WATSON, C.M. Induction of an Fc conformational change by binding of antigen: the generation of protein A-reactive sites in chicken immunoglobulin. *Immunology*, v.36, p.557–561, 1979.

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

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

CARLANDER, D., KOLLBERG, H., WEJAKER, P.E., LARSSON, A. Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. *Immunol Res*, v.21, p.1–6, 2000.

CATALONA, W. J. Prostate Cancer Screening. *International British Journal Of Urology*, 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, 2002.

CHRISTIAN, C.L., ELKON, K.B. Autoantibodies to intracellular proteins: clinical and biological significance. *Am. J. Med.* v. 80, p. 53–61, (1986).

DU, B., QIAN, M., ZHOU, Z., WANG, P., WANG, L., ZHANG, X., WU, M., ZHANG, P., MEI, B. In vitro panning of a targeting peptide to hepatocarcinoma from a phage display peptide library. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 342, n. 3, p. 956-962, 2006.

DYBWAD A., FORRE O., KJELDSSEN-KRAGH J., NATVIG J.B., SIOUD M. Identification of new B cell epitopes in the sera of rheumatoid arthritis patients using a random nanopeptide phage library. *Eur J Immunol.* V.12, p.3189–93, 1993.

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

FOLGORI A., TAFI R., MEOLA A., FELICI F., GALFRE G., CORTESE R., MONACI P., NICOSIA A. A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptide libraries and human sera. *EMBO J.*; v.13, p.223-243, 1994.

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

GASSMANN, M., THOMMES, P., WEISER, T., HUBSCHER, U. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *FASEB J.*, v. 4, p.2528–2532, 1990.

GEVORKIAN G., MANOUTCHARIAN K., ALMAGRO J. C., GOVEZENSKY T., AND DOMINGUEZ V. Identification of Autoimmune Thrombocytopenic Purpura-Related Epitopes Using Phage-Display Peptide Library. *Clinical Immunology And Immunopathology*. v. 86, No. 3, p. 305–309, 1998.

HAARD, H., HENDERIKX, P., HOOGENBOOM, H.R. Creating and engineering human antibodies for immunotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 31, p. 5-31, 1998.

HADGE, D., AMBROSIUS, H. Evolution of low molecular weight immunoglobulins – IV. IgY-like immunoglobulins of birds, reptiles and amphibians, precursors of mammalian IgA. *Mol Immunol*, v.21, p.699–707, 1984.

HANSEN, M.H., OSTENSTAD, B., SIOUD, M. Antigen-specific IgG antibodies in stage IV long-time survival breast cancer patients. *Molecular Medicine*. v. 7, n. 4, p. 230-239, 2001.

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

HUANG. C., LIU, X.Y., REHEMTULLA, A., LAWRENCE T.S. Identification of peptides that bind to irradiated pancreatic tumor cells. *International Journal of Radiation Oncology *Biology* Physics*, v. 62, n.5 , p. 1497-1503, 2005.

IKEMORI, Y., PERALTA, R.C., KUROKI, M., YOKOYAMA, H., KODAMA, Y. Research note: avidity of chicken yolk antibodies to enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbriae. *Poult Sci*, v.72, p.2361–2365, 1993.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Câncer de Próstata. Disponível em: <<http://www.inca.org.br/cancer/tipos/próstata>>. Acesso em: 10 set. 2006.

IRVING M. B.; PAN O.; SCOTT J. K. Random-peptide libraries and antigen-fragment libraries for epitope mapping and the development of vaccines and diagnostics. *Current Opinion in Chemical Biology*, v.5, p.314–324, 2001.

JENSENIUS, J.C., ANDERSEN, I., HAU, J., CRONE, M., KOCH, C. Eggs: conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG. *J Immunol Methods*, v.46, p.63–68, 1981.

KAY BK, ADEY NB, HE YS, MANFREDI JP, MATARAGNON AH, FOWLKES DM. An M13 phage library displaying random 38-amino-acid peptides as a source of novel sequences with affinity to selected targets. *Gene*. V.128(1), P.59-65, 1993.

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

LEE, K.A., CHANG, S.K., LEE, Y.J., LEE, J.H., KOO, N.S. Acid stability of anti-Helicobacter pylori IgY in aqueous polyol solution. *J Biochem Mol Biol*, v.35, p.488–493, 2002.

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

LEMAMY, G.J., ROGER, P., MANI, J.C., ROBERT, M., ROCHEFORT, H., BROUILLET, J.P. High-affinity antibodies from hen's-egg yolks against human mannose-6-phosphate/insulin-like growth-factor-II receptor (M6P/IGFII-R): characterization and potential use in clinical cancer studies. *Int J Cancer*, v.80, p.896–902, 1999.

LIU R.; ENSTROM A. M.; LAM K. S. Combinatorial peptide library methods for immunobiology research. *Experimental Hematology*. v.31, p.11–30, 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 Biotechnol*, v. 21, n.1, p. 57-63, 2003.

NOREN K. A., NOREN C.J. Construction of High-Complexity Combinatorial Phage Display PEPTIDE LIBRARIES. *METHODS*. V. 23, P.169–178, 2001.

PRUDENCIO, C. R, CARDOSO, R., LINO, G.R., GOULART, L.R. Produção de soros policlonais em galinhas para a detecção de antígenos do carrapato bovino (*Boophilus microplus*). *Arquivos do instituto Biológico*. São Paulo, v.70, nº 153, 2003.

RO L.H., CHEN R.J., SHIUAN D. Rapid purification of antiserum against *Mycoplasma hyopneumoniae* by an efficient absorption method. *J. Biochem. Biophys. Methods.* v. 28, p.155, 1994.

ROBERTS, D., GUEGLER, K., WINTER, J. Antibody as a surrogate receptor in The screening of a phage display library. *Gene* V.128, P.67–69, 1993.

RODI J. D., SOARES A .S., MAKOWSKI L. Quantitative Assessment of Peptide Sequence Diversity in M13 Combinatorial Peptide Phage Display Libraries. *Jornal of Molecular Biology.* v.322, p.1039–1052, 2002.

ROMANOV, V.I., DURAND, D.B., PETRENKO, V.A. Phage display selection of peptides that affect prostate carcinoma cells attachment and invasion. *The Prostate*, v. 47, p. 239-251, 2001.

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

SANTAMARIA, H., MANOUTCHARIAN, K., ROCHA, L., GONZALEZ, E., ACERO, G., GOVEZENSKY, T., URIBE, L.I., OLGUIN, A., PANIAGUA, J., GEVORKIAN, G. Identification of peptide sequences specific for serum antibodies from Papillomavirus-infected patients using Phage Display Libraries. *Clinical immunology*, v. 101, n.3, p. 296-302, 2001.

SCHADE, R., HLINAK, A. Egg yolk antibodies, state of the art and future prospects. *ALTEX*, v.13, p.5-9, 1996.

SROUGI, M., CURY, J. Hiperplasia Benigna da Próstata. In: SCHOR, N., SROUGI, M. Nefrologia, Urologia, Clínica. São Paulo: Sarvier, 1998, cap. 6, p. 501-506.

STAMEY, T. A., MCNEIL, J. E. Adenocarcinoma of the prostate. In 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.

STUART, C.A., PIETRZYK, R.A., FURLANETTO, R.W., GREEN, A. High-affinity antibody from hens' eggs directed against the human insulin receptor and the human IGF-1 receptor. *Anal Biochem*, v.173, p.142–150, 1988.

WALSH, P. C., WORTHINGTON, J. F. *Doenças da Próstata: um guia para os homens e para as mulheres que os amam.* São Paulo: Martins Fontes, 1998.

ZHANG, W.W. The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery. *Drug Discovery Today*, v.8, n.8, p.364-371, 2003.

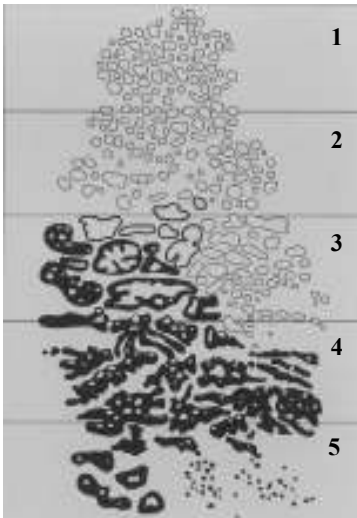
ANEXO I:

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

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

ANEXO II

SISTEMA DE GRADAÇÃO HISTOLÓGICO DE GLEASON

GLÂNDULAS			
	MARGENS	Padrão Glandular	Distribuição
	1 Bem definida	Simples Separadas Redondas	Pacote fechado
	2 Menos definida	Simples - Separadas Redondas Mais Variadas	Espaçamento médio de um diâmetro glandular
	3 Irregular Infiltrada	Simples, separadas, mais irregular. Massas epiteliais redondas cribiformes ou papilar	Espaçamento médio de mais de um diâmetro glandular. Raramente em pacotes. Massas arredondadas c/ contornos pouco definidos
	4 Irregular Infiltrada	Massas glandulares fundidas do tipo hipernefróide	Massas epiteliais anaplásicas irregulares
	5 Mal definida	Padrão quase ausente Poucas glândulas pequenas Poucos e pequenos lúmens envolvidos por massa epitelial sólida às vezes com necrose central	Massas irregulares ou cordões com contornos pouco definidos
Padrões Anatomopatológicos Adenocarcinoma da Próstata			
2 a 4 = Diferenciados 5 a 7= Moderadamente Diferenciado 8 a 10= Indiferenciados			

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

ANEXO III

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

Termo de Consentimento

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

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

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

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

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

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

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

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

Pelos presentes termos apresentados por este documento, Eu, _____,
concordo em colaborar com a pesquisa, declarando estar ciente dos riscos, benefícios e direitos.

Assinatura _____

Testemunhas _____

ANEXO IV

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

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

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

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

CAPITULO II

**Desenvolvimento de um Biossensor para o
Diagnóstico de Doenças por Imunoaglutinação
com Microesferas de Látex de Poliestireno**

“Desenvolvimento de um Biossensor para o Diagnóstico de Doenças por Imunoaglutinação com Microesferas de Látex de Poliestireno”

RESUMO

Testes de aglutinação com partículas de látex têm sido utilizados em diagnósticos de diversas patologias humanas e animais, embora com baixa sensibilidade. Nesta investigação propôs-se desenvolver imunossensores baseados em microesferas de látex coloridas e em colunas cromatográficas de exclusão, em que os microaglutinados de complexos antígeno-anticorpo são separados por tamanho. Considerando a importância da rapidez e eficácia de diagnósticos, desenvolveu-se um biossensor que utiliza micro e nanoesferas de látex coloridas, ativadas com diferentes grupamentos químicos e sensibilizadas com bacteriófagos filamentosos carreadores de antígeno(s) e/ou anticorpo(s) na superfície de sua proteína pIII, que favorecem a formação dos complexos antígenos-anticorpos, peptídeo-proteína ou peptídeo-substrato, ampliando a detecção ótica durante a separação por cromatografia ou por microaglutinação em microscopia ótica. Esta nova tecnologia pode ser usada para a detecção de biomoléculas ou substâncias químicas associados a diversas doenças, infecciosas e parasitárias, e crônico-degenerativas, como o câncer.

Palavras-chave: biossensor, microesferas de látex, fagos, imunoaglutinação, imunocromatografia.

ABSTRACT

Agglutination tests with latex particles have been used in diagnostics of several human and animal pathologies, although with low sensitivity. In this investigation, we have proposed the development of an immunosensor based on colored latex microspheres and exclusion chromatography columns, where microagglutinates of the antigen-antibody complex are separated by size. Considering the importance of the speediness and effectiveness in diagnostics, we have developed a biosensor that uses colored latex micro and nanospheres, activated with different chemical groups and coupled with filamentous bacteriophage displaying antigens and/or antibodies in its pIII protein surface, which favors the formation of the antigen-antibody complex, peptide-protein or peptide-substrate, amplifying the optical detection during the chromatographic separation of the microagglutinates in optical microscopy. This new technology may be used for biomolecules detection or chemical substances associated with several infectious, parasitic, and chronic-degenerative diseases, as prostate cancer.

Word-key: biosensor, latex beads, phage, immunoagglutination, immunochromatography.

INTRODUÇÃO

Muitos ensaios e testes de diagnósticos utilizam micro partículas de látex de tamanho uniforme, ou microesferas (*beads*), em substratos ou suportes como base em reações imunológicas para diagnóstico e pesquisa.

O teste de aglutinação em látex (LAT) tem sido considerado um teste muito útil para descoberta de anticorpos em microbiologia clínica (BHASKAR; BANAVALLIKER; HANIF, 2003). Sensores baseados em micro e nanoesferas de látex para ensaios de imunoaglutinação com separação em colunas cromatográficas ou visualizados em microscópio são também extremamente rápidos e sensíveis, sendo superiores aos métodos convencionais (ELISA e

Western blot), por serem altamente ativados em toda sua superfície, que servem de suporte sólido para as sondas moleculares ou imunológicas, não necessitando de substratos enzimáticos. Além disso, grandes instalações e equipamentos, como leitores de ELISA podem não estar disponíveis em muitos centros (BHASKAR; BANAVALLIKER; HANIF, 2003; XU *et al.* 2005). A descoberta de anticorpo baseado em aglutinação de látex é um procedimento bem estabelecido e kits comerciais estão disponíveis para diagnósticos de muitas doenças bacterianas e virais (MADHUSUDANA; SARASWATI, 2003).

Geralmente, microesferas são partículas de polímeros esféricos compostas principalmente por poliestireno, mas também podem ser encontradas partículas de sílica, por exemplo. Depois de ativadas, as microesferas podem ser preparadas para a ligação (acoplamento) de ligantes, normalmente proteínas. Estas partículas podem ter sua superfície ativada com diversos grupamentos químicos para a ligação de uma infinidade de substâncias. A adsorção de um ligante é um processo onde vários fatores físico-químicos são envolvidos. A quantidade e modo no qual o ligante é adsorvido dependem da natureza do ligante, das características da superfície sólida e de condições da solução (PEULA-GARCIA *et al.* 2002).

Imunoensaios em gel teste (PaGIAs) são métodos estabelecidos em sorologia de grupos sanguíneos e foi introduzido para descoberta de doenças infecciosas (RABELLO *et al.* 1999).

O PaGIA convencional consiste em um microtubo contendo uma matriz de gel onde, após centrifugação, a reação antígeno-anticorpo é detectada pela aglutinação provocada pelos anticorpos ligados às hemácias. Diferentemente, o sensor aqui apresentado substitui as hemácias por diferentes tamanhos de microesferas de poliestireno coloridas ativadas com grupamento aldeído (COH) acopladas com bacteriófagos filamentosos que carregam antígeno(s) ou anticorpo(s), favorecendo a formação do complexo antígeno-anticorpo em suspensão, e ampliando a detecção ótica durante a separação por cromatografia líquida, após centrifugação, ou ainda por microaglutinação em microscopia ótica.

Este trabalho apresenta o desenvolvimento e utilização de um imunoensaio rápido, sensível e prático com uso combinado do acoplamento direto ou indireto (através do sistema biotina/estreptavidina) de microesferas ativadas a peptídeos imunorreativos com potencial antigênico, utilizando bacteriófagos filamentosos

como espaçadores para imunoenaios de aglutinação, no diagnóstico de doenças infecciosas, genéticas e imunológicas com detecção por imunocromatografia líquida (PaGIA).

MATERIAL E MÉTODOS

O antígeno utilizado foi selecionado por meio de *Phage Display* com imunorreatividade contra câncer de próstata obtido no Laboratório de Genética Molecular da UFU. O antígeno recombinante testado encontravam-se em fusão com a pIII dos fagos filamentosos e possuíam 12 resíduos (LLADTTTHRPWT).

Para o acoplamento, utilizou-se microesferas de poliestireno vermelhas (diâmetro, 3,1 μ m, aldeído -COH- ativadas, Interfacial Dynamics Corporation 12-RE-3K.1). A sensibilização das microesferas de látex foi realizada utilizando uma suspensão de 1% de microesferas de látex em água ultra pura, precipitando-a por centrifugação e lavando-a de 1 a 6 vezes com tampão acetato (acetato de sódio 0,05M, pH de 5,5 a 10). Agitou-se e sonicou-se a suspensão por 30 segundos a 10 minutos em cada lavagem. Foi adicionado de 5 a 10 μ g de estreptavidina para cada mg de microesferas, diluídas em tampão acetato. A estringência iônica foi controlada adicionando-se diferentes concentrações de NaCl (0,001 a 1 M). Como agente redutivo foi utilizado uma solução de NaCNBH₃ (0,5 a 5,5 M). A reação de acoplamento foi realizada em temperatura ambiente, sob agitação constante, de 3 a 48 horas.

A mistura foi lavada então de 1 a 6 vezes com PBS (tampão fosfato salino). As microesferas foram então ressuspensas em PBS, contendo 1% albumina de soro bovina e 0,02% de azida sódica, e armazenada a 4°C até o momento do uso.

Após o acoplamento as microesferas de látex de poliestireno foram testadas em imunoenaios em gel teste (PaGIAs) com o cartão NaCl Teste enzimático e ID-Screening I (Diamed) e soros de indivíduos positivos para algumas doenças infecciosas ou genéticas.

O PaGIA foi executado como recomendado pelo fabricante. Brevemente, 10 μ l de soro ou protoplasma foram pipetados na coluna do cartão e incubados por 10 minutos a 37°C com um volume de 50 μ l de solução de microesferas

previamente agitadas, 10^{10} partículas de fagos, 0,01 µg de anti-IgG biotinilada. Depois da incubação, foi realizada uma centrifugação por 10 minutos em uma centrífuga de cartões ID. Os resultados foram visualizados e arquivados pelo leitor de cartões "ID Reader" (DiaMed).

A aglutinação somente ocorre quando há anticorpos reativos contra os antígenos na amostra testada. Resultados positivos ++++ são indicados tipicamente pela presença de uma linha vermelha forte condensada no topo da superfície do gel. Os outros casos (+++, ++ e +), apresentam uma migração variável conforme a quantidade de aglutinados. As concentrações menores de anticorpos específicos (e/ou baixa avidéz) estão presentes no soro aglutinado, e estes pequenos aglutinados são visualizados na matriz do gel, porém estas não são totalmente retidas na superfície e se distribuem ao longo da coluna. Resultados negativos são indicados pela presença de um precipitado forte de partículas coloridas ao fundo da coluna após a centrifugação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O câncer de próstata é a segunda causa de óbitos em homens, sendo superado apenas pelo câncer de pulmão. Estima-se a ocorrência de 47.280 casos novos por ano para esse tipo de câncer no Brasil. O aumento observado nas taxas de incidência pode ser parcialmente justificado pela evolução dos métodos diagnósticos, pela melhoria na qualidade dos sistemas de informação do país e pelo aumento na expectativa de vida do brasileiro (INCA, 2006). O câncer de próstata pode ser facilmente tratado se detectado em fases iniciais. Devido a isso, faz-se necessário o desenvolvimento de novas metodologias para o diagnóstico precoce desse tipo de câncer (WALSH; WORTHINGTON, 1998).

A especificidade do sistema biotina/estreptavidina foi testada neste sensor. A Figura 2.6 representa a fotografia digital do teste realizado no Cartão de NaCl Teste Enzimático (DiaMed A/G) com microesferas acopladas com estreptavidina ligadas a anti-IgG humana biotinilada que se ligam aos anticorpos do soro e reagem com o fago selecionado contra anticorpos anti-CaP, quando presentes na

amostra, de pacientes com CaP (colunas 1 e 2), pacientes com HPB (colunas 3 e 4) e indivíduos normais com menos de 30 anos (colunas 5 e 6).

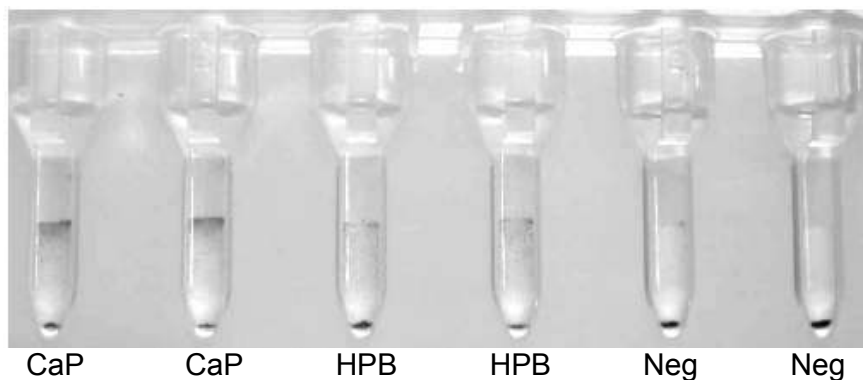


FIGURA 2.6. Fotografia digital do Cartão de NaCl Teste Enzimático (DiaMed A/G) onde foi realizado o teste do biossensor com o soro de pacientes com CaP, pacientes com HPB e indivíduos normais. As microesferas foram sensibilizadas com estreptavidina e ligadas com anti-IgG humana biotinilada, formando um complexo com IgG específicas e fagos recombinantes para CaP.

A figura mostra a reação positiva de dois pacientes com adenocarcinoma de próstata, uma fraca reação com dois com pacientes HPB e reação negativa com dois pacientes negativos (controles).

OUTRAS APLICAÇÕES

Os antígenos recombinantes testados encontravam-se em fusão com a pIII dos fagos filamentosos e possuíam 12 resíduos selecionados contra diversos alvos biológicos selecionados por meio de *Phage Display* com imunorreatividade malária, leishmaniose, hanseníase, toxoplasmose e o antígeno eritrocitário Duffy Fya, obtidos no Laboratório de Genética Molecular da UFU.

As partículas virais foram acopladas diretamente microesferas de poliestireno vermelhas aldeído -COH- ativadas. A sensibilização das microesferas de látex foi realizada como descrito anteriormente

Após o acoplamento as microesferas de látex de poliestireno foram testadas em imunoenaios em gel teste (PaGIAs) com diferentes cartões, LISS-

Coombs, Teste enzimático e ID-Screening I (Diamed) e soros de indivíduos positivos para algumas doenças infecciosas ou genéticas.

O PaGIA foi executado como recomendado pelo fabricante. Brevemente, 10 µl de soro ou protoplasma foram pipetados na coluna do cartão e incubados por 10 minutos a 37°C com um volume de 50 µl de solução de microesferas previamente agitadas. Depois da incubação, foi realizada uma centrifugação por 10 minutos em uma centrífuga de cartões ID.

TOXOPLASMOSE

A toxoplasmose é uma das principais zoonoses descritas até o momento. Esta zoonose é causada pelo protozoário parasita *Toxoplasma gondii*, que infecta a ampla maioria dos vertebrados homeotermos (TENER; HECKEROTH; WEISS, 2000). A infecção pode ocorrer de diversas formas: oral, pela ingestão de cistos tissulares ou oocistos esporulados (DUBEY, 1996) ou transplacentária, podendo acarretar danos ao conceito, podendo até levar a morte ou ao abortamento (TENER; HECKEROTH; WEISS, 2000), sendo importante o diagnóstico durante o período gestacional.

O biossensor foi utilizado em um teste com soro de cinco pacientes (29, 33, 15, 20, 36 e Ctrl como controle negativo) com quantificação de IgG realizada por MEIA (imunoensaio enzimático de micropartículas) para toxoplasmose. Utilizou-se o Cartão “LISS/Coombs” (DiaMed A/G) (FIGURA 2.1).

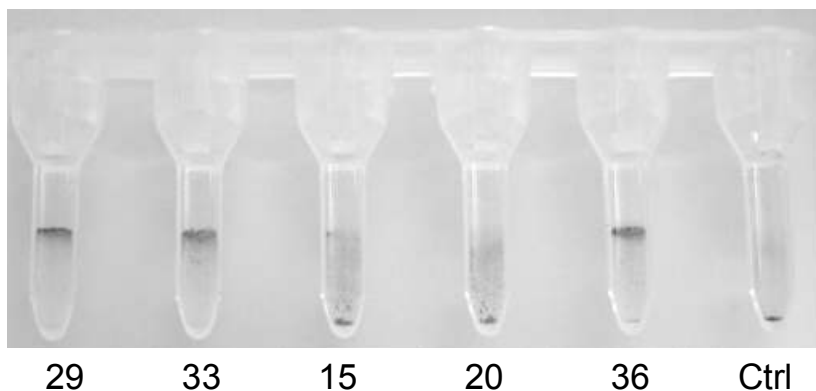


FIGURA 2.1. Fotografia digital do teste utilizando o biossensor em cartão Liss/Coombs com soro dos pacientes 29, 33, 15, 20, 36 e Ctrl como controle negativo para toxoplasmose.

Os resultados apresentaram alta correlação entre si, quando interpretados de acordo com o padrão de leitura utilizando-se uma Leitora de Cartões Diamed ID-Reader para leitura dos cartões sendo (++++), os mais reativos diminuindo gradativamente até (+) menos reativo e (-) não reativo. A comparação do resultado dos testes com os cinco pacientes utilizando-se o cartão “LISS/Coombs” está apresentado na TABELA I.

TABELA I. Comparação dos resultados da tipagem dos pacientes por MEIA e por imunoaglutinação em biossensor.

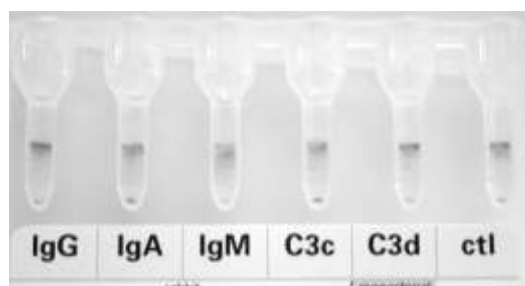
Pacientes	Tipagem por MEIA (UI/mL) para IgG	Biossensor
29	410	++++
33	27.8	+++
15	<10	+
20	39	++
36	353	+++

O biossensor apresenta grande sensibilidade na distinção de IgG e IgM que pode ser observada pelos testes com o paciente 33, que apresenta nível alto de leitura (+++) mesmo apresentando índice de IgG baixo. A explicação para isso é a presença de IgM na amostra, que por ser uma molécula muito grande (900 kDa contra 150 kDa de IgG) apresenta capacidade de aglutinação muito maior, não sendo necessária a presença de anti-anticorpos na matriz do cartão para aumentar a sensibilidade do teste como é necessário no caso de IgG.

A Figura 2.2 registra as fotografias digitais das imunoaglutinações dos anticorpos dos pacientes testados com o cartão DC-Screening I (DiaMed A/G) que possui em sua matriz anti-anticorpos específicos para as diversas imunoglobulinas, confirmando as reatividades específicas para IgM e IgG, e mostrando também a presença de IgM nos pacientes 29 e 36, o que corrobora os bons resultados deste processo.



PACIENTE 29: Positivo para IgM e IgG



PACIENTE 36: Positivo para IgM e IgG



PACIENTE 33: Positivo para IgM e IgG



PATIENTE 20: Positivo para IgG



PACIENTE 15: Positivo fraco para IgG, negativo para IgM.

FIGURA 2.2. Fotografia digital do teste utilizando o biossensor em DC-Screening I (DiaMed A/G) para detecção de IgG e IgM no soro dos pacientes 29, 33, 15, 20 e 36 positivos para toxoplasmose

Os resultados da utilização do biossensor para o diagnóstico da toxoplasmose foram excelentes mostrando-se um método de simples execução e baixo custo e não requerendo o uso de extrato de parasitas organismos mortos ou uma enzima conjugada. Na literatura foi descrito um método para a descoberta de anticorpos IgM para *Toxoplasma gondii* usando partículas de látex sensibilizadas com antígenos do parasito. Uma excelente correspondência foi verificada quando o método de látex foi comparado com outros testes para a descoberta de anticorpos IgM em toxoplasmose (REMYINGTON/ EIMSTAD/ ARAUJO, 1983).

HANSENÍASE

A hanseníase é um grave problema de saúde pública no Brasil. O país ocupa o 2º lugar do mundo e o 1º lugar da América Latina em número de doentes, com uma prevalência de 3,81/10.000 habitantes e detecção de 2,63/10.000 em 2000. (MINAS GERAIS/ÁREA TÉCNICA DE HANSENÍASE/DIRETORIA DE ATENÇÃO BÁSICA/SUPERINTENDÊNCIA OPERACIONAL DE SAÚDE/SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE MINAS GERAIS. 2001. 45p). A hanseníase, cujo agente etiológico *Mycobacterium leprae*, pode ocorrer nos tecidos em grandes quantidades sem, contudo, causar sintomas clínicos, é uma doença de amplo espectro clínico e imunopatológico (JACOBSON; KRAHEMBUHL, 1999).

Para hanseníase desenvolveu-se um teste baseado no uso de peptídeos miméticos do glicolípido fenólico-1 acoplados às microesferas, sendo este um antígeno específico do *Mycobacterium leprae*, que reconhece a resposta imune humoral de pacientes com hanseníase, classificados como multibacilares (detectando apenas a forma clínica lepromatosa, V). A Figura 2.3 ilustra o teste realizado no Cartão LISS-Coombs (DiaMed A/G), demonstrando a imunorreatividade das microesferas associadas aos fagos e o soro de pacientes V (virchoviano), DD (dimorfo-dimorfo) e T (tuberculóide) positivos para hanseníase.

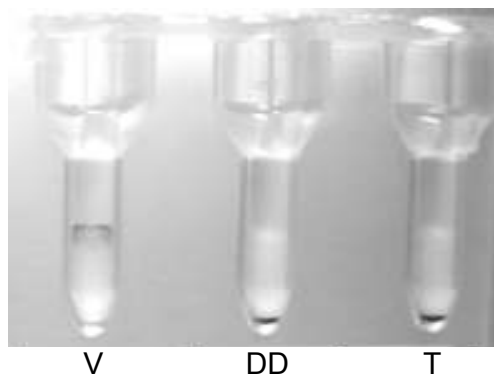


FIGURA 2.3. Fotografia digital do teste utilizando o biossensor em cartão Liss/Coombs com soro dos pacientes com hanseníase com as formas clínicas virchoviana (V), dimorfa-dimorfa (DD) e tuberculóide, detectados com peptídeos miméticos de PGL-1.

Este teste produz resultados semelhantes ao ML-Flow (fluxo lateral em membrana) e ELISA com o mesmo antígeno. Em relação ao ML-Flow, a imunocromatografia não requer ambiente seco ou protegido da luz e necessita praticamente do mesmo tempo para a execução. Em relação ao ELISA, o teste é muito superior, tanto em sensibilidade e especificidade, quanto em rapidez, podendo ser realizado em menos de 30 minutos, enquanto que o ELISA pode levar algumas horas.

ANTÍGENO ERITOCITÁRIO DUFFY A

Os antígenos do grupo sanguíneo Duffy são de particular interesse na medicina clínica devido ao seu envolvimento na incompatibilidade durante a transfusão sanguínea e na doença hemolítica do recém nascido (TOURNAMILLE *et al.* 1998) o que torna seu diagnóstico importante em hemoterapia.

Foram realizados testes com microesferas acopladas a fagos imunorreativos para anticorpos específicos contra o antígeno eritrocitário Duffy tipo A (Fya) e soros comerciais (DiaMed) de 4 antígenos eritrocitários: Fya – Duffy A, Fyb – Duffy B, Jka –Kidd A, Jkb – Kidd B e Ctrl- respectivamente Duffy Fya, Duffy Fyb, Kidd A, Kidd B e um controle negativo realizado no Cartão LISS-Coombs (DiaMed A/G) (FIGURA 2.4).

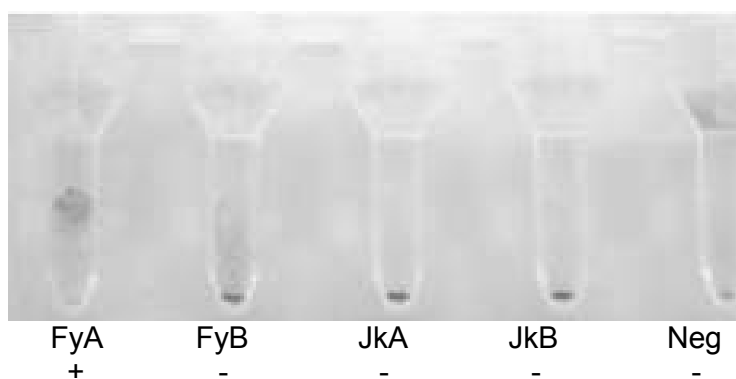


FIGURA 2.4 Teste para o antígeno eritrocitário Duffy A utilizando o biossensor em cartão Liss/Coombs com soro dos pacientes: Fya – Duffy A, Fyb – Duffy B, Jka –Kidd A, Jkb – Kidd B e Controle respectivamente.

Na Figura 2.5, observa-se o resultado fornecido pela leitora de cartões ID-Reader (DiaMed) de três testes realizados com três diferentes clones de fagos selecionados por *Phage Display* acoplados às microesferas e os mesmos pacientes, mostrando a não ocorrência de reação cruzada entre os anticorpos testados.

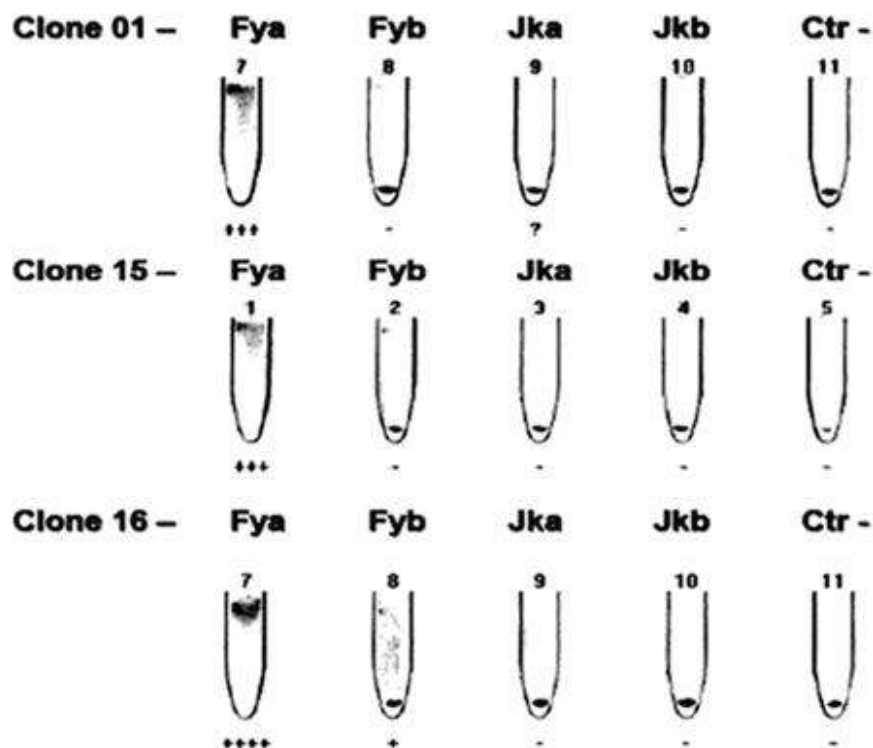


FIGURA 2.5. Resultado fornecido pela leitora de cartões ID-Reader (DiaMed) com três peptídeos diferentes com soros de : Fya–Duffy A, Fyb–Duffy B, Jka–Kidd A, Jkb–Kidd B e Ctr- como controle negativo.

Foram testados três clones de fagos diferentes com soros, sendo que apenas o clone 16 mostrou uma pequena reação com Duffy Fyb, que pode ser resultante de uma reação cruzada irrelevante entre os peptídeos Duffy (FIGURA 2.5). Esses resultados mostram mais uma vez a especificidade do sensor na detecção da aglutinação formada entre antígeno e anticorpo, além da utilização do fago como espaçador no complexo formado aumentando os níveis de detecção.

LEISHMANIOSE

As leishmanioses, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, afetam mais de 12 milhões de pessoas em todo o mundo. Os parasitos do gênero *Leishmania* são protozoários digenéticos pertencentes à família Trypanosomatidae, e apresentam-se sob duas formas: uma flagelada, denominada promastigota, outra não flagelada denominada amastigota, (MOLINEUX; KILLICK-KENDRICK, 1987). A *Leishmania* é transmitida aos hospedeiros vertebrados suscetíveis através da picada de fêmeas de mosquitos *Lutzomia longipalpis*, de hábitos alimentares ecléticos e os cães domésticos agem como maior fonte de infecção (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994). As leishmanioses apresentam um amplo espectro de manifestações clínicas: leishmaniose tegumentar, variando da forma cutânea à mucocutânea (LC e LMC), representando o pólo responsivo, para a leishmaniose cutânea difusa (LCD) que representa o pólo não responsivo, e a leishmaniose visceral (LV), abrangendo da forma subclínica à doença fatal (OLIVEIRA *et al.* 2004).

O ensaio realizado no Cartão de NaCl Teste Enzimático (DiaMed) com microesferas acopladas com fago imunorreativo e soro de pacientes com leishmaniose visceral, tegumentar, normal e sem soro, mostra a reação positiva para leishmaniose visceral, fracamente positiva para leishmaniose tegumentar e negativa para soro de paciente normal (FIGURA 2.7).

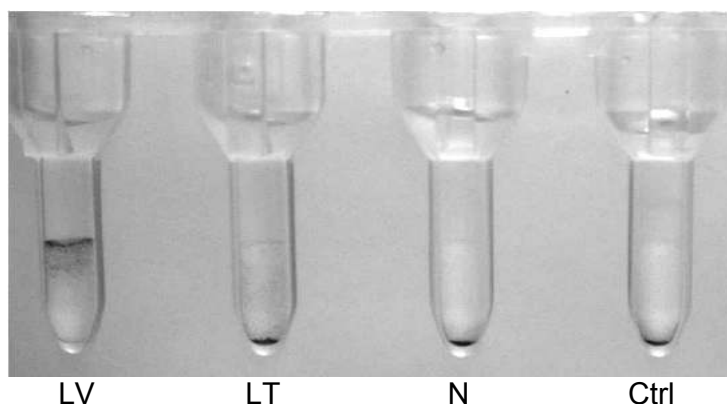


FIGURA 2.7. Fotografia digital do teste realizado no Cartão de NaCl Teste Enzimático (DiaMed A/G) com o microesferas de látex acopladas a fago imunorreativo com o soro de pacientes com leishmaniose visceral - LV, tegumentar - LT, normal - N e sem soro – Ctrl.

MALÁRIA

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a malária é a doença tropical e parasitária que mais causa problemas sociais e econômicos no mundo e só é superada em número de mortes pela AIDS. A malária é causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e cada uma de suas espécies determina aspectos clínicos diferentes para a enfermidade. No caso brasileiro, destacam-se três espécies do parasito: *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malarie*. O protozoário é transmitido ao homem pelo sangue, geralmente por mosquitos do gênero *Anopheles* ou, mais raramente, por via parenteral, como o compartilhamento de seringas (consumidores de drogas), transfusão de sangue ou até mesmo de mãe para feto, na gravidez (FIOCRUZ, 2006).

A Figura 2.8 apresenta o teste realizado no Cartão de NaCl Teste Enzimático com microesferas acopladas a fagos imunorreativos contra anticorpos anti-*Plasmodium* e soro de pacientes positivos para *P. falciparum* e *P. vivax* e um controle negativo. Observa-se que apenas os soros de pacientes positivos para *P. vivax* apresentaram reação positiva, o que demonstra sua especificidade ao parasita.

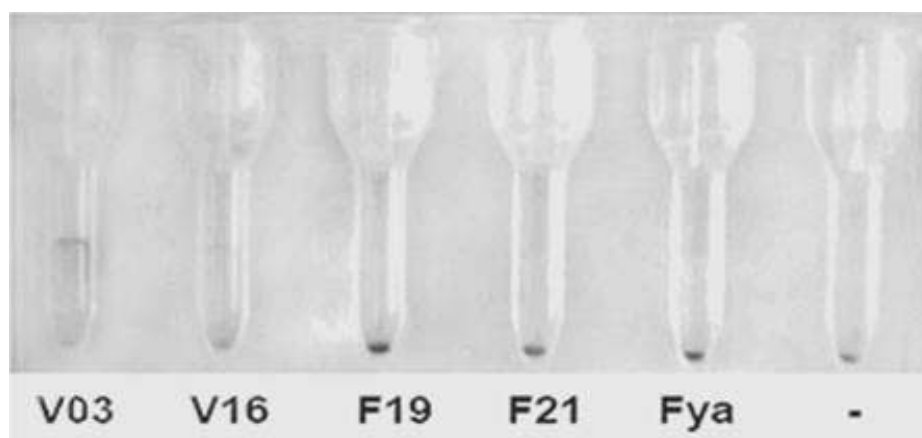


FIGURA 2.8. Fotografia digital do teste utilizando o biossensor em cartão Liss/Coombs com soro dos pacientes V03 – *P. vivax*, V16 – *P. vivax*, F19 – *P. falciparum*, F21 – *P. falciparum* e Fya – Duffy Fya como controle negativo para malária.

Apesar de importantes avanços no entendimento de vários aspectos da resposta imune em diversas moléstias e da existência de diversas modalidades terapêuticas, o número de pacientes ainda sem diagnóstico ou com tratamento ineficaz é alarmante. O desenvolvimento de novas metodologias que favoreça o diagnóstico mais efetivo, rápido e confiável de doenças infecciosas, autoimunes ou genéticas tem grande importância clínica.

Neste trabalho, foi proposto o uso parcial de metodologias já aplicadas no mercado de diagnósticos, que em combinação com outras tecnologias, faz com que esta metodologia seja prontamente aceita, pois a nova tecnologia apresenta sensibilidade e maior flexibilidade de uso em relação a outras tecnologias vigentes. Além do mais, como já existe um mercado com a plataforma básica de imunocromatografia líquida em cartão, esta nova metodologia pode ser amplamente utilizada de forma rápida e eficiente no mercado.

NOVO IMUNOSENSOR

Microesferas ativadas com aldeído apresentam grupo COH livre foram acopladas com os fagos pela formação de base Schiff com grupos amino de proteínas do capsídeo viral do fago. Devido à possibilidade de dissociação da proteína pela reversão da formação das bases Schiff, a estabilização por redução com cianoborohidreto de sódio foi necessária e mostrou-se eficiente.

Componentes carbonil tais como cetonas alifáticas e aldeídos reagem rapidamente e reversivelmente com grupos amino de proteínas para formar bases Schiff. A reação é dependente de pH e os melhores resultados são obtidos perto de pH 9,0. A ligação pode ser estabilizada com borohidreto de sódio ou cianoborohidreto de sódio, entre outros, num processo conhecido como alquilação redutiva. A redução é mais bem carregada em temperaturas baixas em torno de 4°C em tampão borato.

Praticamente todos os componentes carbonil podem ser usados para alquilar grupos amino de proteínas (WONG, 1993). A descoberta de anticorpo baseado em aglutinação de látex é um procedimento bem estabelecido e “kits”

comerciais estão disponíveis para diagnósticos de muitas doenças bacterianas e virais (MADHUSUDANA; SARASWATI, 2003). Testes baseados em aglutinação com partículas de látex não necessitam de grandes instalações e equipamentos, como leitores de ELISA que podem não estar disponíveis em muitos laboratórios (BHASKAR; BANAVALLIKER; HANIF, 2003; XU *et al.* 2005) o que impossibilita ensaios de ELISA e imunofluorescência.

Sabendo que muitas doenças como a hanseníase, a toxoplasmose, o câncer, dentre muitas outras, carecem de diagnósticos mais confiáveis, rápidos e precisos, é apresentado aqui uma amostra do potencial de utilização deste sistema de detecção de aglutinação com fagos imunorreativos contra anticorpos com acoplados a microesferas de látex separados por cromatografia líquida.

A utilização do biossensor é bastante abrangente, podendo ser utilizada praticamente com qualquer doença infecciosa, alguns exemplos podem ser observados nos testes diretos com fagos imunorreativos contra leishmaniose e malária. É muito plausível que este biossensor possa ser utilizado para qualquer tipo de doença que haja produção de anticorpos, humanas ou não. Um teste relativamente rápido de aglutinação com microesferas de látex com peptídeos sintéticos que contém epítomos de micobactéria foi desenvolvido para diagnósticos de bovinos infetados com *Mycobacterium bovis* foi proposto por Koo *et al.* (2004). Uma vantagem adicional desse teste é que pode ser utilizado com varias espécies não sendo necessária adição de nenhum reagente adicional.

Vários biossensores estão sendo desenvolvidos com peptídeos acoplados à microesferas de látex. Marik *et al.* (2003) descrevem um método simples para preparar microesferas magnéticas de poliestireno acopladas a um peptídeo ligante, cNGRGEQc que são satisfatórias para uma seletiva e eficiente captura de células tumorais. Takeoka *et al.* (2003) conjugaram os oligopeptídeos CHHLGGAKQAGDV (H12), que é uma sequência da cadeia γ de fibrinogênio (c 400–411) e CGGRGDF (RGD), que contém a sequência da cadeia- α do fibrinogênio (a 95–98 RGDF) a microesferas de látex para utilização em transfusões de plaquetas. Porém, até o momento, não foi relatado nenhum trabalho que tenha acoplado um organismo em uma esfera látex de poliestireno.

De forma rápida, simples e sem a necessidade de substratos enzimáticos, o biossensor aqui apresentado demonstra um método diagnóstico plausível para

detecção de antígenos/anticorpos por imunoaglutinação. Este trabalho demonstra a utilização deste sistema para o diagnóstico de diversas doenças infecciosas e crónico-degenerativas de forma rápida, sensível e simples.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

BHASKAR, S., BANAVALLIKER, J.N., HANIF, M. Large-scale validation of a latex agglutination test for diagnosis of tuberculosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 39, p. 235-239, 2003.

DUBEY, J.P. Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats. *Journal of Parasitology*. v.82, p.957-961, 1996.

FUNDAÇÃO INSTITUTO OSVALDO CRUZ. Disponível em: <www.fiocruz.br/ccs/glossario/malaria.htm> Acessado em 15 setembro de 2006.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Câncer de Próstata. Disponível em: <<http://www.inca.org.br/cancer/tipos/próstata>>. Acesso em: 10 set. 2006.

MARZOCHI, M.C.A., MARZOCHI, K.B.F. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis Brasil – Emerging Anthroponosis and Possibilities for Their Control. *Cad Saúde Públ.*, v. 10, p.359-375, 1994.

JACOBSON, R. R., KRAHEMBUHL, J. L. Leprosy. *The Lancet*, v. 353, p. 655-659, 1999.

KOO, H.C., PARK, Y.H., AHN, J., WATERS, W. R., HAMILTON, M.J., BARRINGTON, G., MOSAAD, A.A., PALMER, M.V., SHIN, S., DAVIS, W.C. New Latex Bead Agglutination Assay for Differential Diagnosis of Cattle Infected with *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. *Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 11, n. 6, p. 1070–1074, 2004.

MADHUSUDANA, S.N. SARASWATI, S. Development and evaluation of a latex agglutination test for rabies antibodies. *Journal of Clinical Virology*, v. 27, p. 129-135, 2003.

MARIK, J., LAU, D.H., SONG, A., WANG, X., LIU, R. LAM, K.S. Magnetization of large polystyrene peptide beads for capturing and expanding cancer cells. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 264, p. 153–157, 2003.

MINAS GERAIS/ÁREA TÉCNICA DE HANSENÍASE/DIRETORIA DE ATENÇÃO BÁSICA/SUPERINTENDÊNCIA OPERACIONAL DE SAÚDE/SECRETARIA DE ESTADO DA

SAÚDE DE MINAS GERAIS. Seminário de Avaliação das Ações de Controle de Hanseníase Realizadas em Minas Gerais no Ano 2000. Belo Horizonte, 2001. 45p

MOLINEUX, D.H., KILLICK-KENDRICK, R. Morphology, ultrastructure and life cycles. In: Peters W and Killick-Kendrick R The leishmaniasis in biology and medicine Academic. Florida, pp.161-168, 1987.

OLIVEIRA, C.I., TEIXEIRA, M.J., GOMES, R., BARRA, A., BRODSKYN, C. Animal models for infectious diseases caused by parasites: Leishmaniasis. *Drug Discovery Today: Disease Models*, vol.1, p.81-86, 2004

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*, v.245, p. 230–236, 2002.

RABELLO, A., LUQUETTI, A.O., MOREIRA, E.F., GADELHA, M.F., DOS SANTOS, J. A., DE MELO, L., SCHWIND P. Serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection using the new particle gel immunoassay–ID–PaGIA *Chagas. Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94, p.77–82, 1999.

REMINGTON, J.S., EIMSTAD, W.M., ARAUJO, F.G. Detection of immunoglobulin M antibodies with antigen-tagged latex particles in an immunosorbent Assay. *Journal Of Clinical Microbiology*, v.17, n.5, p. 939-941, 1983.

TAKEOKA, S., OKAMURA, Y., TERAMURA, Y., WATANABE, N.,SUZUKI, H., TSUCHIDA, E., HANDA, M., IKEDAB, Y. Function of fibrinogen c-chain dodecapeptide-conjugated latex beads under flow Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 312, p. 773–779, 2003.

TENER, A.M., HECKEROTH, A.R., WEISS, L.M., *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology*, v.30, p. 1217-1278, 2000

TOURNAMILLE, C., LEVAN, K.C., GANE, P., CARTRON, J.P., COLIN, Y. Arg89Cys substitution results in very low membrane expression of the Duffy antigen, receptor for chemokines in Fy^x individuals. *Hematology*, p.2147-2156, 1998.

WALSH, P. C., WORTHINGTON, J. F. *Doenças da Próstata*: um guia para os homens e para as mulheres que os amam. São Paulo: Martins Fontes, 240p. 1998.

WONG, S.S. *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking*, CRC Press LLC, 1993.

XU, X., JIN, M. YU, Z., LI, H., QIU, D. , TAN, Y., CHEN, H. Latex Agglutination Test for Monitoring Antibodies to Avian Influenza Virus Subtype H5N1. *Journal Of Clinical Microbiology*, v. 43, n.4, p. 1953–1955, 2005.

ANEXO V

Documentação referente ao Depósito da Patente de Invenção intitulada: “**MÉTODOS PARA IMUNOAGLUTINAÇÃO EM MICRO E NANOESFERAS DE POLIESTIRENO**”. O pedido foi depositado no Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI, no dia 21 de agosto de 2006, sob numeração PI0603590-6.