



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

**IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS IMUNORREATIVOS CONTRA
IgG DE SORO DE PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA
POR MEIO DA TECNOLOGIA *PHAGE DISPLAY***

Aluna: FABIANA DE ALMEIDA ARAÚJO SANTOS

Orientador: Dr. Luiz Ricardo Goulart

Co-Orientadora: Dra. Ana Paula Peres Freschi

UBERLÂNDIA - MG
2007



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

**IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS IMUNORREATIVOS CONTRA
IgG DE SORO DE PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA
POR MEIO DA TECNOLOGIA *PHAGE DISPLAY***

ALUNA: FABIANA DE ALMEIDA ARAÚJO SANTOS

Orientador: Dr. Luiz Ricardo Goulart

Co-Orientadora: Dra. Ana Paula Peres Freschi

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

**UBERLÂNDIA-MG
2007**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

- S237i Santos, Fabiana de Almeida Araújo, 1983-
Identificação de peptídeos imunorreativos contra IgG de soro de
pacientes com câncer de próstata por meio da tecnologia phage display
/ Fabiana de Almeida Araújo Santos. - 2007.
77 f.: il.
- Orientador: Luiz Ricardo Goulart.
Co-orientadora: Ana Paula Peres Freschi.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pro-
grama de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.
1. Próstata - Câncer - Teses. I. Goulart, Luiz Ricardo. II. Freschi,
Ana Paula Peres. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 616.65-006.6



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

**IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS IMUNORREATIVOS CONTRA
IgG DE SORO DE PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA
POR MEIO DA TECNOLOGIA *PHAGE DISPLAY***

ALUNA: FABIANA DE ALMEIDA ARAÚJO SANTOS

COMISSÃO EXAMINADORA

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

Examinadores: **Dra. Etel Rodrigues Pereira Gimba**
 Dr. José Daniel Lopes

Data da Defesa: 05 / 07 / 2007.

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

Luiz Ricardo Goulart
(Orientador)

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, que se faz presente em todos os momentos da minha vida, me ajudando sempre a superar todos os medos e obstáculos que encontro em meu caminho, e me dando força para procurar sempre fazer o melhor.

Aos meus familiares, em especial aos meus pais Marisa e José Antônio, que sempre me acompanharam, incentivaram e com muito amor torceram pelo meu sucesso!

Ao meu amor, Oscar Bruno I. R. Borges que a cada dia se torna mais importante na minha vida me fazendo muito feliz, e que soube compreender os momentos de ausência e cansaço, me apoiando e incentivando sempre!

A Ana Paula Freschi por todo ensinamento que me foi passado, pelo apoio e incentivo. Sua atuação neste trabalho foi essencial e sua co-orientação muito importante!

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart pela oportunidade, pelo estímulo, otimismo e confiança em mim depositada em todas as etapas deste trabalho, o que sem dúvida possibilitou meu crescimento pessoal e profissional!

Aos pacientes que se dispuseram a doar tecido e sangue mesmo em um momento difícil de suas vidas, acreditando que os conhecimentos obtidos nessa pesquisa poderão de alguma forma ajudar outras pessoas.

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

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

Aos meus amigos do Laboratório de Genética Molecular da UFU, em especial a Juliana Franco, Guilherme Lino, Carolina Reis, Fausto Capparelli, Luciana Bueno, Ana Carolina Siquieroli, José Geraldo, Carlos Prudêncio, Ana Paula Carneiro, Janaína Lobato, Patrícia Tieme, Adriana Neves pela amizade e apoio que sempre me proporcionaram.

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

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

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	3
Lista de Aminoácidos	5
Lista de Tabelas	6
Lista de Figuras	7
Introdução Geral	8
Capítulo Único	11
Resumo	12
Abstract	13
Introdução	14
Câncer Próstata	14
Aspectos Imunológicos	18
<i>Phage Display</i>	20
Material e Métodos	24
Material Biológico	24
Pacientes e Controles	24
Extração de Proteínas Totais	25
Eletroforese em SDS-PAGE	25
Coloração de Gel com <i>Coomassie-blue</i>	26
Coloração de Gel com Nitrato de Prata	26
Purificação de IgG com Microesferas Magnéticas	27
Seleção de Peptídeos Sintéticos	27
<i>Biopanning</i> (Seleção de Fagos)	27
Titulações	29
Extração de DNA de Fagos	29
Seqüenciamento	30
Análise de Dados pela Bioinformática	31
<i>Phage ELISA</i>	32

Resultados	34
Purificação de IgG de Soro	34
Extração de Proteínas	35
Seleção de Peptídeos Sintéticos	35
<i>Biopanning</i> e Titulações	35
Extração de DNA e Seqüenciamento dos Clones de Fagos	36
Análise de Dados pela Bioinformática	37
<i>Phage</i> ELISA	45
Discussão	46
Conclusões	53
Referências Bibliográficas	54
Anexos	71

Lista de Abreviaturas

°C	Graus Celsius
µg	Microgramas
µl	Microlitros
µm	Micrometro
aa	Aminoácido
Ab	Anticorpo
Ag	Antígeno
BCIP	Bromochloroindolyl phosphate
BMTI	Inibidor de serino protease
BSA	Soro albumina bovina
CaP	Câncer de Próstata
DNA	Ácido Desorribonucléico
DO	Densidade ótica
EDTA	Etileno diamino tetra acetato
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
g	Grama
HPB	Hiperplasia Prostática Benigna
IgG	Imunoglobulina G
IgY	Imunoglobulina Y (Yolk)
IPTG	Isopropil b-D-tiogalactoside
kDa	Quilodalton
L	Litro
LB	Meio de cultura Luria-Bertania
M	Molar
M13KE	Vetor de clonagem de bacteriófagos filamentosos
M13mp19	Vetor de clonagem de bacteriófagos filamentosos
mA	Miliamper
NBT	Nitroblue tetrazolium
NC	Membrana de nitrocelulose

ng	Nanogramas
p/v	Peso por volume
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
Pb	Par de base
PBS	Tampão fosfato de sódio
PBST	Tampão fosfato de sódio com Tween 20
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PD	<i>Phage Display</i>
PEG	Polietilenoglicol
pfu	Unidades formadoras de colônias
pH	Potencial Hdrogenionico
Ph.D	Bibliotecas de <i>Phage display</i> New England Biolabs
Ph.D- 12mer	Biblioteca contendo 12 peptídeos randômicos
PSA	Antígeno Prostático Específico
pIII	Proteína III capsídica menor de bacteriófagos filamentosos
pIX	Proteína IX capsídica menor de bacteriófagos filamentosos
pVI	Proteína VI capsídica maior de bacteriófagos filamentosos
pVII	Proteína VII capsídica menor de bacteriófagos filamentosos
pVIII	Proteína VIII capsídica menor de bacteriófagos filamentosos
RELIC	Receptor Ligants Contents
RNA _m	Ácido Ribonucléico mensageiro
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TBS	Tampão Tris-NaCl
TBST	Tampão Trifosfato de sódio com Tween 20
TBST _M	TBST com 5% de leite desnatado
UFC	Unidades formadoras de colônias
v/v	Volume por Volume
X-gal	b-galactosidase chromogenic substrate

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

TABELA I - Parâmetros clínicos e laboratoriais dos pacientes com CaP e HPB utilizados para a extração de proteínas totais.....24

TABELA II - Seleção dos fagos com peptídeos ligantes a anticorpos policlonais anti-CaP. Título obtido (pfu) no processo de seleção dos fagos por imunoafinidade.....36

TABELA III - Sequência traduzida de aminoácidos dos peptídeos expressos nos clones de fagos selecionados e suas respectivas frequências.....37

TABELA IV - Frequência dos aminoácidos individuais dos peptídeos expressos nos fagos selecionados pelas IgGs e a frequência esperada dos aminoácidos na construção da biblioteca realizado pelo AADIV.....38

TABELA V - Sequências de aminoácidos dos clones selecionados, frequência observada, frequência esperada, amplificação dos peptídeos e grau de informação.....40

TABELA VI - Alinhamentos das seqüências de aminoácidos dos 12 peptídeos selecionados pelos programas CLUSTAL W (v. 1.83), MUSCLE (v. 3.6), T-COFFEE (v. 5.13) e MAFFT (v. 4.0) mostrando a divergência entre os alinhamentos nos diferentes programas.....42

TABELA VII - 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 Swissprot, e sua regiões de prováveis epítomos lineares feita de acordo com o programa *Bepipred*.....43

Lista de Figuras

FIGURA 1 - Esquema representativo de um bacteriófago filamentosso ilustrando as proteínas do capsídeo viral pIX, pVII, pVIII, pVI e pIII.....20

FIGURA 2 - 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 sequenciamento da população de fagos com maior afinidade pelo alvo.....22

FIGURA 3 - 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.....34

FIGURA 4 - 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.....35

FIGURA 5 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% de 12 amostras de DNA extraído de fagos (1-12) aleatoriamente escolhidos e de 200ng de DNA controle (C) com 7249pb.....36

FIGURA 6 - Gráfico construído pelo programa DIVAA que ilustra a diversidade de sucessão dos aminoácidos em cada posição nos peptídeos.....39

FIGURA 7 - Gráfico representativo das leituras a 492nm do ensaio de ELISA mostrando a reatividade dos clones de fagos capturados por anticorpo anti-M13 contra soro de pacientes com câncer, HPB e indivíduos sadios. 45

INTRODUÇÃO GERAL

Câncer é uma doença originada por aberrações genéticas que inativam genes supressores de tumor e ativam proto-oncogenes. Essas alterações desorganizam a homeostase tissular por aumentar desregradamente a divisão celular ou por diminuir a apoptose, causando o aparecimento dos tumores.

O câncer de próstata, como várias outras formas de câncer, é uma doença multifocal e multicausal, que teve durante muito tempo sua origem atribuída apenas à estimulação hormonal da testosterona, porém, atualmente se sabe que o desenvolvimento tumoral é também regido por componentes genéticos e ambientais. Modificações moleculares e presença de moléculas alvo interessantes têm sido recentemente associadas à progressão do tumor prostático e ao desenvolvimento de resistência a terapia.

Nas últimas décadas, o câncer de próstata tem emergido como uma das doenças mais comuns entre os homens idosos, sendo considerado o câncer da terceira idade, uma vez que aproximadamente 75% dos casos, no mundo, ocorrem a partir dos 65 anos.

No Brasil e nos Estados Unidos é o segundo mais comumente diagnosticado após o câncer de pele não melanoma. É a segunda causa de óbitos por câncer em homens, sendo superado apenas pelo câncer de pulmão. O número de casos novos de câncer de próstata estimados para o Brasil em 2006 foi de 47.280, este valor corresponde 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, com exceção do câncer de 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.

O perfil da resposta imunológica no câncer pode fornecer informações valiosas sobre proteínas expressas pelo tumor que induzem a produção de anticorpos. Desta forma a descoberta da resposta imune humoral a antígenos associados a tumores, os quais são reconhecidos como “estranhos” pelo sistema imune, pode ser fonte para diagnóstico e informação de prognóstico de câncer.

O presente estudo teve como objetivos selecionar peptídeos recombinantes diretamente relacionados a antígenos circulantes no soro de pacientes com câncer de próstata, por meio de eluição competitiva, avaliar a

reatividade diferencial dos clones frente aos anticorpos utilizados para seleção (IgG) e buscar clones com potencial diagnóstico por meio de análises de bioinformática e testes imunológicos.

Para o desenvolvimento deste trabalho, foi utilizada a tecnologia de apresentação de peptídeos em fagos (*phage display*), a qual vem sendo amplamente utilizada no mapeamento de epítomos de diversas proteínas antigênicas, constituintes de vários agentes causadores de doenças. Esta tecnologia é baseada na fusão de peptídeos ou proteínas ao capsídeo viral e sua expressão na superfície deles. Análises de bioinformática e ensaios imunoenzimáticos também foram realizados para demonstrar a identidade dos peptídeos recombinantes com proteínas de potencial interesse para diagnóstico.

Este estudo foi apresentado em um capítulo único, onde foram feitas considerações gerais sobre o câncer de próstata e a tecnologia de apresentação de peptídeos em fagos, seguida dos resultados obtidos, discussão e conclusões.

CAPÍTULO ÚNICO

IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS IMUNORREATIVOS CONTRA IgG DE SORO DE PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA POR MEIO DA TECNOLOGIA *PHAGE DISPLAY*

RESUMO

O câncer de próstata é a segunda causa de óbitos por câncer em homens, sendo superado apenas pelo câncer de pulmão. Atualmente o único marcador sérico na avaliação clínica é o PSA. Portanto, a identificação de novos antígenos ou genes específicos do câncer de próstata pode prover novos biomarcadores e fornecer instrumentos para o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas. Neste trabalho foi utilizada a técnica de *phage display* para isolar peptídeos ligantes a anticorpos presente no soro de pacientes com câncer de próstata para obtenção de biomarcadores que possam ser utilizados no diagnóstico sorológico dessa patologia. Para seleção dos peptídeos foi realizado um *biopanning* subtrativo utilizando uma biblioteca de peptídeos Ph.D.-12 expressa na superfície do fago filamentoso M13. Em cada ciclo foram feitas duas seleções subtrativas, uma com anticorpos (IgG) de indivíduos saudáveis, e uma segunda seleção com extrato protéico de pacientes com hiperplasia prostática benigna (HPB). Após esta subtração, a biblioteca foi submetida a uma seleção positiva contra IgG de pacientes com câncer de próstata e os fagos ligantes de interesse foram eluídos por afinidade com proteínas totais de tecidos prostáticos tumorais. O DNA dos fagos selecionados foi seqüenciado, traduzido e submetido às análises de bioinformática e sorológica (ELISA). Os peptídeos obtidos apresentaram similaridades nos alinhamentos com diversas proteínas relacionadas com processos tumorais, tais como adesão, transporte intra e intercelular e regulação gênica. Dentre os 12 peptídeos selecionados, oito apresentaram imunorreatividade diferencial para o câncer e quatro clones para o HPB, podendo ser potenciais biomarcadores no diagnóstico destas doenças.

Palavras-chave: câncer de próstata, hiperplasia prostática benigna, marcadores tumorais, *phage display*.

ABSTRACT

Prostate cancer is the second cause of death in men by tumor, surpassed only by lung cancer. Therefore, the identification of new cancer specific antigens and genes may provide important biomarkers for diagnosis and instruments for the development of new treatment strategies. In this investigation the *phage display* technology have been used to select ligand peptides to serum antibodies of patients with prostate cancer in order to use them in diagnosis as serological biomarkers. Selection of phages was performed in three steps using a random peptide library of 12 residues (Ph.D.-12) expressed in fusion with the pIII protein of the M13 bacteriophage. The first two selection steps consisted of a pre clearing using the phage libraries against sera antibodies (IgG) of healthy individuals, followed by a second selection against total proteins of patients with benign prostatic hyperplasia. After subtraction, the library was submitted to a positive selection against purified IgG from patients with prostate cancer and ligand phages of interest were eluted by affinity with total proteins from prostate tumor tissues. Selected phages were amplified, and DNA was sequenced, translated and submitted to bioinformatic analyzes and ELISA assays. Similarities were found between peptide sequences and proteins deposited in GeneBank associated with adhesion, intra and intercellular trafficking and transcriptional regulation. Among 12 selected peptides, eight presented differential immune reactivity for cancer detection, and four clones for benign prostatic hyperplasia, which may become potential biomarkers for diagnosis of these pathologies.

Key-words: prostate cancer, benign prostatic hyperplasia, tumor markers, *phage display*.

INTRODUÇÃO

1. Câncer Próstata

O câncer é uma doença originada por aberrações genéticas que inativam genes supressores de tumor e ativam proto-oncogenes (1). Essas alterações desorganizam a homeostase tissular por aumentar desregradamente a divisão celular ou por diminuir a apoptose, causando o aparecimento dos tumores (2). A maioria das mutações é adquirida ao longo do desenvolvimento do tumor, sendo assim consideradas mecanismos da tumorigenese. Contudo, algumas podem ser herdadas, resultando em predisposição ao câncer (1).

Atualmente, já se sabe da existência de mais de 100 tipos de câncer e diversos subtipos, a maioria deles ou, praticamente todos, compartilham alterações essenciais na fisiologia celular que, em conjunto, ditam o crescimento tumoral. Dentre as alterações que ocorrem tem-se: auto-suficiência em sinais de crescimento, insensibilidade aos sinais de inibição de crescimento, evasão a apoptose, potencial replicativo ilimitado, autonomia angiogênica e capacidade para invadir tecidos e produzir metástases (3).

O câncer de próstata (CaP), como várias outras formas de câncer, é uma doença multifocal e multicausal, correspondendo a uma alteração no balanço entre a proliferação e a morte celular. Durante os estádios 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 às mutações genéticas, reflete graus de respostas anormais dos fatores de crescimento, gerando um processo que leva a formação de clones autônomos de células malignas, com crescimento promovido por via autócrina que passa a não responder ao controle androgênico (hormônio independente) (4).

Por muito tempo atribuiu-se a origem do tumor prostático como determinada apenas pela estimulação hormonal da testosterona, porém, atualmente se sabe que o desenvolvimento tumoral é também regido por componentes genéticos e ambientais (5), sendo em 10% dos casos por transmissão hereditária e os demais por alterações genéticas esporádicas (2),

podendo também estar relacionado a fatores nutricionais (6). Dentre os fatores de risco mais amplamente associados ao CaP estão a idade, a etnia, a história familiar da doença e a localização geográfica (7, 8, 9).

Nas últimas décadas, o câncer de próstata tem emergido como uma das doenças mais comuns entre os homens idosos, sendo considerado o câncer da terceira idade, uma vez que cerca de 75% dos casos, no mundo, ocorrem a partir dos 65 anos (4, 10).

No Brasil e nos Estados Unidos é o segundo mais comumente diagnosticado após o câncer de pele não melanoma (4). É a segunda causa de óbitos por câncer em homens, sendo superado apenas pelo câncer de pulmão. O número de casos novos de câncer de próstata estimado para o Brasil em 2006 foi de 47.280, este valor corresponde 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, com exceção do câncer de 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 (10).

Além do câncer algumas doenças clinicamente importantes podem afetar a próstata nos homens adultos, como as prostatites e a hiperplasia prostática benigna. Estas apresentam grande significado clínico, não só por suas conseqüências, mas também pela freqüência com que se manifestam (12).

A hiperplasia prostática benigna (HPB) caracteriza-se por um aumento de tamanho das células do componente acinar prostático em relação às células dos componentes intersticial e capsular, acarretando por conseqüência, aumento volumétrico da próstata. Esse aumento benigno ocorre sempre após os 35 anos de idade, sendo responsável por vários sintomas no trato urinário inferior em homens (13, 14, 15, 16).

Câncer e HPB conferem risco e prognóstico bastante diferentes aos pacientes. Contudo incidem sobre a mesma faixa etária. A neoplasia prostática, em estágios iniciais, apresenta alterações clínicas e laboratoriais semelhantes à hiperplasia benigna. Além do fato de ambas poderem co-existir, complicando ainda mais o diagnóstico preciso. Esses fatos dificultam sensivelmente a diferenciação dessas patologias (15, 16).

Uma das formas de diagnosticar estas patologias é através da dosagem do antígeno prostático específico (PSA), uma glicoproteína de peso molecular de 34 KDa que pertence a família das calicreínas e é secretada no fluido prostático (17). Elevações nos níveis séricos desse marcador são amplamente utilizadas para o diagnóstico e monitoramento de pacientes com CaP (18).

Os níveis de PSA do sangue dependem diretamente do volume de tecido prostático, seja este benigno ou maligno (19, 13). Na HPB cada grama de tecido eleva os níveis séricos de PSA em 0,31ng/mL (dosado pela metodologia Yang), sendo que, nos casos de adenocarcinoma da próstata, cada grama de tecido neoplásico aumenta os níveis séricos do PSA em 3,5ng/mL (dez vezes mais, dosado pela metodologia Yang). Este fato também demonstra que quanto maior os valores do PSA maior é o volume do tumor do paciente (19). No CaP os níveis séricos do PSA aumentam progressivamente à medida que aumenta o estágio da doença (20).

No entanto, 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 (21, 22, 23, 18).

Além da dosagem do PSA, compõe ainda o rastreamento das anomalias prostáticas o exame físico da próstata (toque retal), sendo que tanto o CaP quanto a HPB são diagnosticados pelo exame patológico de material obtido pela biopsia da próstata. A biopsia 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 (24). No entanto, a biopsia é um exame invasivo, com riscos de infecção e extremamente desagradável para o paciente. No procedimento 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 quatro 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 - Metastase), 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) (25, 26, 27, 28).

O uso de nomogramas “Partin Tables”, utilizando como parâmetros alterações do toque retal, Gleason da biopsia e o resultado do PSA pré-operatório fornece as probabilidades do estadiamento patológico em termos de probabilidade de doença confinada a próstata, extensão extra prostática, invasão de vesículas seminais, metástases em gânglios linfáticos (29).

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 (30, 31).

Com tantas variáveis em questão, existe real necessidade de diferenciação entre a hiperplasia benigna e o câncer de próstata realmente inicial. 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 (32, 33, 34, 35).

Muitos esforços têm sido destinados ao melhor entendimento dos complexos mecanismos moleculares envolvidos na ontogênese e progressão do CaP (36). Os métodos que são usados para caracterizar as aberrações genéticas encontradas nessa doença neoplásica incluem estudos familiares designados a mapear *loci* hereditários, estudos cromossômicos para a identificação de anomalias que possam localizar oncogenes ou supressores de tumor e diversos estudos de expressão gênica (37, 38).

Modificações moleculares e presença de moléculas alvo interessantes têm sido recentemente, associadas à progressão do tumor prostático e ao desenvolvimento de resistência a terapia (39).

Marcadores biológicos tem sido de grande importância para o diagnóstico e tratamento do CaP por 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 (40). Proteínas biomarcadores presente no soro oferecem grande promessa para detecção não invasiva, classificação e estadiamento do câncer de próstata. Arranjos de anticorpos parecem ser adequados para a descoberta de marcadores sorológicos, pela possibilidade de comparação da abundância relativa de centenas de proteínas (36).

1.1. Aspectos Imunológicos

Com base nos conhecimentos acerca do sistema imunológico nos anos de 1960 e 1970 MacFarlane Burnet de Melbourne, formulou a teoria da *immune surveillance*, que postulava que os linfócitos protegem os indivíduos imunocompetentes contra aparecimento de tumores, portanto segundo ele o surgimento de uma doença neoplásica é resultado de uma falha no sistema de vigilância.

O perfil da resposta imunológica no câncer pode fornecer informações valiosas sobre proteínas expressas pelo tumor que induzem a produção de anticorpos. Desta forma a descoberta da resposta imune humoral a antígenos associados a tumores, os quais são reconhecidos como “estranhos” pelo sistema imune, pode ser fonte para diagnóstico e informação de prognóstico de câncer (41). Atualmente, há muitos estudos sobre a resposta imune humoral de pacientes com diversos tipos de cânceres: colorectal (42), de testículo e próstata (43), pulmão (44, 45), mama (46, 47, 48), carcinoma hepatocelular (49), melanoma (50), cânceres ginecológicos (51).

Uma característica comum, se não intrínseca, da auto-imunidade humoral é o desenvolvimento de auto-anticorpos endereçados contra proteínas celulares próprias do indivíduo e ácidos nucleicos (52). Evidências consideráveis têm mostrado que os auto-anticorpos são uma forma de resposta imune contra o tumor para vários antígenos tumorais desenvolvida por muitos pacientes (53). O estudo da auto-imunidade associada ao tumor pode oferecer esclarecimentos não apenas na patogênese de doenças auto-imunes 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 (54).

A resposta imune humoral ao câncer tem direcionado a especificidade antigênica de anticorpos do soro. Na literatura são apresentados vários trabalhos com auto-anticorpos contra diferentes proteínas tumorais em diversos tipos de cânceres: p53 (55, 42), fator de crescimento de fibroblasto (56), proteínas ribossomais (57), proteínas *heat shock* (51), α -metilacetil CoA (58), mucina (59), proteína HER2 (60), estas duas últimas envolvidas na inibição da progressão tumoral.

A presença de auto-anticorpos no soro de pacientes com câncer de próstata tem sido relatada em uma infinidade de trabalhos (41, 43, 61, 53, 62, 63). A detecção desses auto-anticorpos 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, em 2006 propuseram o uso de *screening* de auto-anticorpos como diagnóstico para o CaP (100). Bradford *et al.* (2006) após uma seleção de 22 peptídeos sintéticos imunorreativos contra auto-anticorpos do soro de pacientes com câncer de próstata, apresentou um perfil protéico aparentemente superior ao PSA (53).

Com o uso de tecnologias proteômicas pode-se identificar antígenos e anticorpos presentes durante a tumorigenese. Várias tecnologias vêm sendo utilizadas na identificação e detecção desses biomarcadores: eletroforese em gel bi-dimensional (64), *microarrays* (53), ELISA (51, 45, 47, 63), *western-blot* (64), espectrometria de massa (64), modelamento computacional (65), SEREX (53, 61), imunoistoquímica (42), cromatografia (56), biossensores (66), e *phage display* (67, 68, 69, 41, 43, 53, 62).

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 (70, 62), porém estes estudos ainda estão em desenvolvimento.

2. Phage Display

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 bacteriófagos filamentosos pela inserção de um segmento de DNA codificante no genoma dos mesmos, de modo que o peptídeo ou proteína expressado fique exposto na superfície da partícula viral fusionado a uma proteína endógena.

A possibilidade de expressão de uma proteína de fusão no capsídeo de bacteriófagos, de maneira acessível ao reconhecimento por um ligante, demonstrada em 1985 por Smith, abriu caminho para a construção de bibliotecas conformacionais apresentadas na superfície destas partículas virais (71), um bacteriófago que infecta uma variedade de bactérias gram-negativas, frequentemente a *Escherichia coli* do gênero masculino (72).

Os bacteriófagos são formados por uma fita simples de DNA envolta por uma capa protéica constituída por cinco proteínas (pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX) (FIGURA 1). Destas cinco proteínas existem aproximadamente 2.800 cópias da pVIII e cinco cópias da pIII. Neste sistema, o gene codificador do peptídeo ou proteína de interesse é geralmente fusionado a um dos genes destas duas proteínas da capa protéica do fago (73, 74, 75). Devido a baixa representatividade da pIII em relação à pVIII as bibliotecas de peptídeos sintéticos fusionados na pIII são mais indicadas para descoberta de ligantes com alta afinidade, quando comparadas as bibliotecas pVIII ligadas (75).

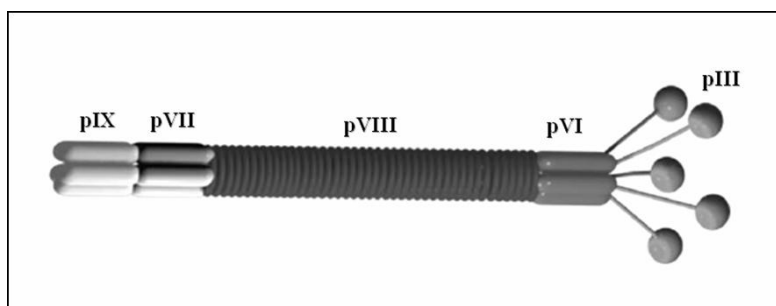


FIGURA 1 - Esquema representativo de um bacteriófago filamentoso ilustrando as proteínas do capsídeo viral: pIX, pVII, pVIII, pVI e pIII (101).

Uma das vantagens do uso do bacteriófago é que eles não geram uma infecção lítica em *Escherichia coli*, mas preferencialmente induzem um estado no 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 expulsa da bactéria através da membrana para o meio extracelular (76).

Bibliotecas de peptídeos geradas por *phage display* são extensivamente aplicadas na descoberta de uma grande variedade de polipeptídeos incluindo anticorpos, receptores e enzimas (77). Epítomos ou determinantes antigênicos, regiões de reconhecimento do antígeno pelos anticorpos, podem também ser identificados através desta metodologia de apresentação de peptídeos em fagos (78), a qual 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.

As 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 (79, 76, 69). Essas bibliotecas podem ser adquiridas comercialmente o que garante melhor a manutenção da variabilidade.

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* (80). O *biopanning* é realizado pela incubação da biblioteca de peptídeos

expostos em fagos contra o alvo. O alvo é imobilizado em um suporte sólido que pode ser 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 sequenciamento de DNA, *western blotting* ou ELISA (71). Para melhor entender o processo de seleção é apresentado na FIGURA 2 um esquema ilustrativo do processo de *biopanning*.

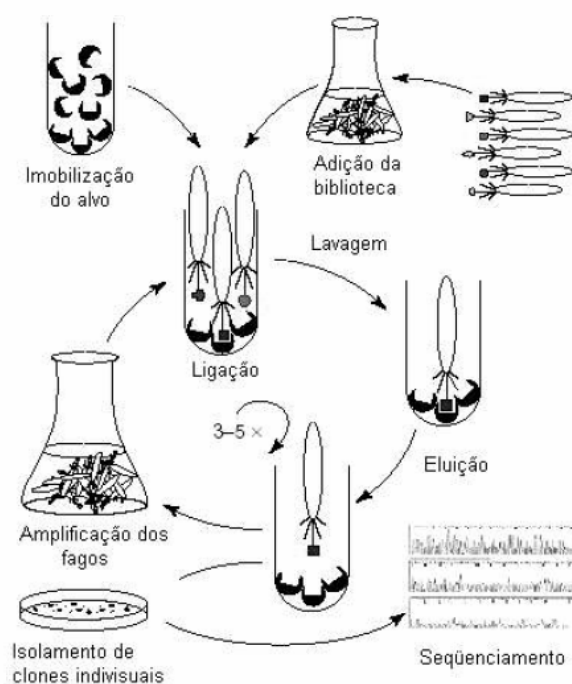


FIGURA 2 - Esquema representativo do processo de *Biopanning*. Imobilização do alvo e incubação da biblioteca de fagos, retirada dos fagos não ligados por lavagens sucessivas, eluição dos fagos ligados e infecção de *E. coli*, amplificação dos fagos eluídos e sequenciamento da população de fagos com maior afinidade pelo alvo (disponível em: <http://www.molgen.mpg.de/~invitro/technology.html>).

A tecnologia de *phage display* tem apresentado grande impacto na imunologia, biologia celular, descoberta de medicamentos e outros fármacos (81). Vários trabalhos têm relatado a identificação, pela tecnologia de *phage display*, de

peptídeos que mimetizam biomoléculas específicas em diversos tipos de câncer, como por exemplo: mama (67, 68), hepatocarcinoma (82), mieloma (69), fibrosarcoma (83), coloretal (42), câncer gástrico (84), próstata e testículo (43), entre outras. As aplicações dos peptídeos expressos em fagos em câncer tem sido as mais variadas, dentre elas: mapeamento da diversidade tumoral (68, 69, 85) a seleção de peptídeos que inibem metástase (84), peptídeos miméticos de oncogenes (78, 42), receptores vasculares (86, 87) e muitos peptídeos relacionados a fatores de crescimento (88, 89). Os peptídeos selecionados podem ser utilizados de diversas maneiras, inclusive no tratamento do câncer através do endereçamento vascular dos peptídeos (90) e de alvos em imunoterapia (83).

Proteínas prostáticas câncer-específicas podem ser identificadas para a utilização como marcadores em diagnóstico e prognóstico na terapia efetiva do câncer de próstata (91, 79). A tecnologia de *phage display* tem sido largamente empregada no estudo do câncer de próstata (79, 92, 85, 69, 41, 43, 53, 62, 93). Esses trabalhos têm identificado peptídeos relacionados com marcadores e proteínas prostáticas, como receptor de andrógeno AR (94), PSA (95, 96, 97, 98, 99) calicreína 2 (93), receptor α da interleucina 11 (92).

O presente trabalho teve como objetivo selecionar peptídeos miméticos de proteínas prostáticas imunorreativos contra IgGs de pacientes com câncer de próstata através da metodologia de *phage display* que possam ser utilizados como biomarcadores no diagnóstico e prognóstico do câncer de próstata.

MATERIAL E MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

1.1. Pacientes e Controles

Neste estudo foram utilizados soros de 10 pacientes com adenocarcinoma de próstata em diversos estádios, caracterizados de acordo com parâmetros clínicos e laboratoriais, 10 pacientes com HPB, cujo sangue foi colhido com indicação de biópsia prostática por PSA>2,5ng/mL e/ou toque alterado (TABELA I) e 10 voluntários saudáveis com idade entre 18 e 27 anos que não apresentavam nenhum tipo de alteração clínica ou infecções no trato urinário.

TABELA I - Parâmetros clínicos e laboratoriais dos pacientes com CaP e HPB utilizados para a extração de proteínas totais.

Pacientes CaP	Idade	PSA	Gleason	TNM	Pacientes HPB	Idade	PSA
1	67	12,77	8	T3aNOMX	1	75	7,1
2	50	17,9	6	T2aNOMX	2	69	10,1
3	62	14,3	6	T1aNOMX	3	74	19,2
4	75	11,7	6	T3bNOMX	4	56	7,4
5	66	12,47	6	T2aNOMX	5	63	4,84
6	71	7,4	6	T3cNOMX	6	74	10,6
7	53	7,1	6	T2aNOMX	7	71	7,8
8	63	26	6	T3cNOMX	8	72	5,33
9	74	5,9	7	T3bNOMX	9	50	5,7
10	58	12,2	6	T2cNOMX	10	53	7,5

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

Após a coleta, o material foi levado ao laboratório de Genética Molecular do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia-MG e armazenado a -80°C para os posteriores procedimentos experimentais. 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 com aproximadamente 20mg de próstatas de cada paciente foram trituradas com um homogenizador elétrico em 800µL de tampão (400mM NaCl; 25mM EDTA pH 8,0; 50mM Tris pH 7,5; 2% SDS), para preservação da integridade das proteínas foram adicionados os inibidores de protease: 10µL de benzamidina (100mM) e 3µL de PMSF (150mM). As amostras foram então incubadas a 37°C por 15 minutos e em seguida adicionou-se 300µL de solução saturada de NaCl e novamente incubou-se por 15 minutos a -20°C.

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

1.3. Eletroforese em SDS-PAGE

A eletroforese foi realizada segundo Barbas *et al.* (2001), a concentração do gel foi de 16% (p/v). As amostras foram diluídas em 10µL de tampão de amostra (12mL de SDS a 10%, 6mL 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 foi realizada 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.

1.4. Coloração de gel com *Coomassie-blue*

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

1.5. Coloração de gel com nitrato de prata

Após a corrida o gel foi corado com prata (SAMBROOK *et al.* 1989). Inicialmente incubou-se o gel durante 12 horas com solução fixadora (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, a 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 de revelação (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.

1.6. Purificação de IgG com Microesferas Magnéticas

Soro de 10 pacientes com câncer de próstata, 10 pacientes com HPB e 10 pacientes controles 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 500µL de tampão MES (1M, pH 5,0), em seguida adicionou-se 100µL de soro e incubou-se por 40 minutos a temperatura ambiente sob 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 sódio (1M pH 2-3) e o pH neutralizado com Tris (1M pH 9,1), separando as IgGs das microesferas magnéticas pela introdução dos tubos no separador magnético.

2. SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS

2.1. *Biopanning* (seleção de fagos)

Para seleção de fagos ligantes às IgGs de soro de pacientes com câncer de próstata foram utilizadas 10µL (2×10^{11} partículas virais) de uma biblioteca comercial de peptídeos randômicos fusionados no capsídeo de fagos (Ph.D.-12 da *NEW ENGLAND BioLabs® Inc.*). A biblioteca consistia de 12 aminoácidos randômicos entre duas seqüências espaçadoras curtas fusionados a região N-terminal da Proteína III (pIII) de bacteriófagos filamentosos M13. Todas as cinco cópias da pIII dos fagos continham peptídeos recombinantes.

Foram realizados três 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 IgG purificada provenientes de pacientes com câncer (100µg/mL em 0,1M NaHCO₃, pH 8,6) por 12-16 horas (*overnight*) a 4°C sob agitação leve, bloqueada com 250µL de 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 10µL da biblioteca diluídos em 100µL de TBST agitando-se por uma hora a temperatura ambiente. Fagos não ligantes foram removidos por dez lavagens com TBST (0,1% Tween-20) nos dois primeiros ciclos de seleção e no terceiro ciclo subsequente com TBST (0,5% Tween-20) para aumentar a estringência.

Em cada ciclo foram feitas eluições negativas, uma com IgG de indivíduos normais e a outra com extrato protéico de pacientes com HPB. Os fagos ligantes de interesse foram eluídos por afinidade com 10µg de proteínas totais de próstatas de pacientes com CaP diluídas em 90µL de TBS por 60 minutos sob agitação, a 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* (OD₆₀₀ ~ 0,3) e incubou-se a 37°C por 4-5 horas sob forte agitação. A cultura foi submetida à centrifugação a 10000rpm 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 2,5M de NaCl – solução estéril) incubando-se por 12-16 horas a 4°C.

Decorrida a precipitação, centrifugou-se a solução a 10000rpm por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e centrifugou-se, brevemente uma outra vez para remoção de sobrenadante residual. O precipitado foi suspenso em 1mL de TBS e precipitou-se novamente com 1/6 do volume de PEG/NaCl incubado em gelo por 1 hora. Centrifugou-se a 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.

2.1.1. 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 tetraciclina. Para cada diluição foi confeccionada uma placa.

As placas foram incubadas a 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.

2.2. Extração de DNA de fagos

Para a extração do DNA dos fagos, colônias isoladas de uma placa oriunda do 3º ciclo do *biopanning* foram transferidas para poços de 2mL de placas de cultura tipo *deepwell*, contendo 1mL de cultura de ER2738 em fase *early-log* (OD₆₀₀ ~ 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 (250rpm).

Para isolar os fagos das bactérias, as placas foram centrifugadas a 3700rpm, a 20°C, durante 10 minutos. Apenas 800µL do sobrenadante da centrifugação foram transferidos para novas placas e incubados por 10 minutos

com 350µL de PEG/NaCl. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas a 3700rpm, a 20°C durante 40 minutos para precipitação dos fagos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 100µL de Tampão Iodeto (10mM de Tris-HCl pH 8,0, 1mM de EDTA e 4M de NaI) foi adicionado ao precipitado de fagos.

As placas foram agitadas vigorosamente e, em seguida, 250µL de etanol absoluto foi acrescentado. Após uma incubação de 10 minutos, a temperatura ambiente, as placas foram centrifugadas 3700rpm, 20°C, 10 minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado de fagos foi lavado com 500µL de etanol 70% e recentrifugado. Finalmente, o precipitado remanescente foi diluído em 20µL de água Milli-Q. A qualidade do DNA fita simples foi verificada pela corrida eletroforética em gel de agarose 0,8% corado com solução de brometo de etídeo.

2.3. 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 1µL de acetato de amônio e etanol, homogeneizando a placa com leves batimentos. Então, foram acrescentados 27,5µL de etanol absoluto, em seguida, a placa foi centrifugada por 45 minutos, a 4000rpm e o sobrenadante descartado.

Adicionou-se 150µL de etanol 70% ao DNA precipitado e centrifugou-se por 10 minutos, a 4000rpm. A solução de etanol foi descartada, a placa permaneceu invertida sobre um papel toalha e nesta posição foi pulsada a 800rpm, durante um segundo. A placa foi coberta por um papel alumínio 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 sequenciamento foi realizada em um seqüenciador automático MegaBace 1000 (Amersham Biosciences) no laboratório de Genética Molecular (UFU).

3. ANÁLISE DE DADOS PELA BIOINFORMÁTICA

Após sequenciamento, 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 freqüência, diversidade de aminoácidos dentro da população de peptídeos foi realizado pelo programa AADIV (<http://relic.bio.anl.gov/aafreqs3.aspx>).

As homologias entre os 12 peptídeos selecionados foram testadas utilizando os programas CLUSTAL W versão 1.83 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>), T-Coffee versão 5.13 (<http://www.ch.embnet.org/software/TCoffee.html>) (<http://tcoffee.vital-it.ch/cgi-bin/TCoffee/tcoffee.cgi/index.cgi>), MUSCLE versão 3.6 (<http://www.ebi.ac.uk/muscle/>), MAFFT versão 4.0 (<http://www.ebi.ac.uk/mafft/>). O programa CLUSTAL W inclui ainda na análise o pareamento entre os peptídeos recombinantes selecionados.

As homologias entre os peptídeos selecionados e as proteínas depositadas foram realizadas utilizando a ferramenta BLAST (*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>). Dentro do blast a busca foi realizada no “*Protein blast*” utilizando como *database* o “*swissprot protein sequences*”

(*swissprot*)", algoritmo - *blastp* (*protein-protein BLAST*) e restrita a humanos (*human - taxid: 9606*).

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

Para identificar possíveis epítomos lineares, foi realizada uma busca no *BLAST* (*blastp*) utilizando os clones e o banco de dados de seqüências de proteínas *Swissprot* restrito a proteínas humanas, e selecionamos as duas melhores proteínas que se alinharam com cada clone. Em seguida esse resultado foi cruzado com o resultado de um programa de predição de epítomos lineares com o objetivo de saber se as regiões alinhadas correspondiam às regiões preditas. O programa utilizado foi o *Bepipred* (http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input).

4. Phage ELISA

Para quantificação da reatividade dos clones às IgG anti-CaP foi realizado o ensaio de ELISA onde placas de microtitulação foram sensibilizadas, em duplicata, para todas as amostras, com 1µg/poço de anticorpo anti-M13 diluído em tampão carbonato 50mM pH 9,6 por 2 horas a temperatura ambiente. Decorrido o tempo de incubação as placas foram bloqueadas com TBS caseína a 2,5% por 16 horas a 4°C.

As placas foram lavadas por seis vezes com TBST (0,05% de Tween 20) e incubadas por 1 hora a 37°C com 50µL/poço de cultura dos fagos selecionados, do fago selvagem (fago que não expressa nenhuma proteína exógena) e de meio de cultura sem fago, para controle das reações. Posteriormente as placas foram lavadas quatro vezes e incubadas por 1 hora a 37°C com *pool* de soro de 10 pacientes de cada grupo – CaP, HPB e pacientes saudáveis (controle negativo) – na concentração de 1:50, diluídos em TBST caseína 2,5%.

Após este período, as placas foram lavadas por oito vezes e incubadas com anti-IgG conjugado com peroxidase diluído 1:5000 em TBST caseína 2,5%,

durante 1 hora a 37°C, lavadas novamente e a ligação antígeno/anticorpo foi detectada pela adição de tampão orto-fenilenodiamina (OPD) a 1mg/mL. A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 4N. A reatividade foi obtida em leitor de placas (*Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, USA*) pela leitura a 492nm.

O índice ELISA (IE) para os soros testados foi calculado realizando a divisão da média das leituras das densidades óticas (DO) das duplicatas das amostras pelo valor de *cutoff*. O valor *cutoff* foi calculado segundo a fórmula: *cutoff* = média das DOs do fago selvagem + 2X desvio padrão. Os IEs maiores que 1 foram considerados positivos e os IEs menores que 1 foram considerados negativos.

RESULTADOS

1. PURIFICAÇÃO DE IgG DE SORO

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 seleção dos peptídeos recombinantes.

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 3 apresenta um gel SDS-PAGE das imunoglobulinas tipo G purificadas com microesferas magnéticas.

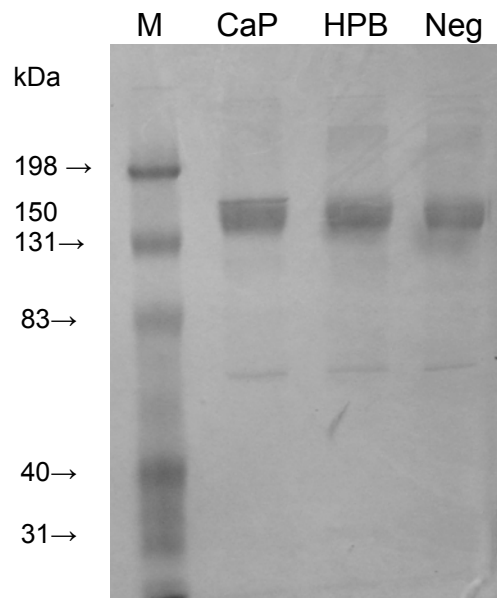


FIGURA 3 - Eletroforese em SDS-PAGE (Gel 16%) corado com *coomassie blue*. Preparações de IgG obtidas por imunoprecipitação com microesferas magnéticas. M - marcador de peso molecular; CaP - câncer de próstata, HPB - hiperplasia prostática benigna.

2. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

As proteínas totais extraídas das próstatas foram de boa qualidade. Após a resolução das proteínas em gel de acrilamida SDS-PAGE observou-se que estas se mantiveram preservadas (FIGURA 4).

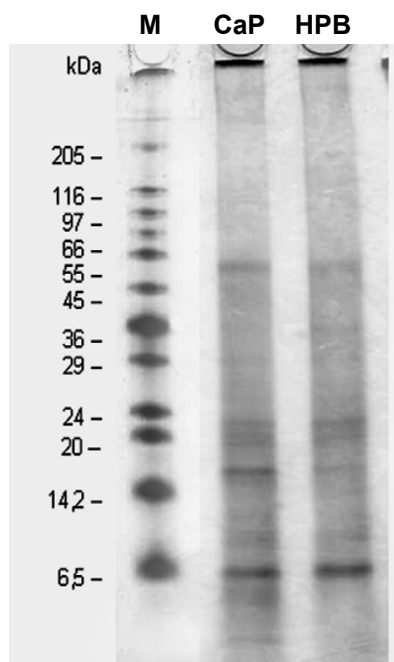


FIGURA 4 - Eletroforese SDS-PAGE (16%) proteínas totais extraídas de amostras de tecido de próstata de pacientes com CaP e HPB observadas em gel de acrilamida corado com nitrato de prata, M - marcador de peso molecular.

3. SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS

3.1. *Biopanning* e Titulações

A seleção dos peptídeos ligantes aos anticorpos policlonais anti-proteínas totais de câncer de próstata foi realizada utilizando uma biblioteca de 12 peptídeos expressos na superfície de fagos filamentosos M13. A especificidade dos peptídeos foi assegurada pelas duas subtrações negativas, utilizando IgG purificadas de indivíduos sadios e proteínas totais de próstatas de pacientes com

HPB, eliminando assim, potenciais proteínas ligantes presentes em tecidos que não seja o tumoral. A eluição dos fagos foi realizada com proteínas totais de CaP.

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*” foram sempre maiores que os títulos de saída, pois os fagos com maior afinidade a proteínas do tumor ficam ligados a elas por interação peptídeo/anti-corpo e o restante dos fagos com baixa ou sem afinidade foi removido durante as lavagens. Nas amplificações ocorre o inverso, indicando a eficiência do processo.

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

Ciclos	Número de partículas de fagos	
	Entrada	Saída
1º Ciclo de seleção	2×10^{11}	$1,3 \times 10^4$
2º Ciclo de seleção	2×10^{11}	$7,8 \times 10^4$
3º Ciclo de seleção	2×10^{11}	$5,1 \times 10^4$

3.2. Extração de DNA e Seqüenciamento dos Clones de Fagos

O DNA extraído dos fagos foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, para verificar sua qualidade e estimar sua quantidade, comparando a intensidade das bandas das amostras com a intensidade da banda do DNA padrão, o qual continha uma massa de 200ng (FIGURA 5). Em seguida o DNA foi seqüenciado e analisado.

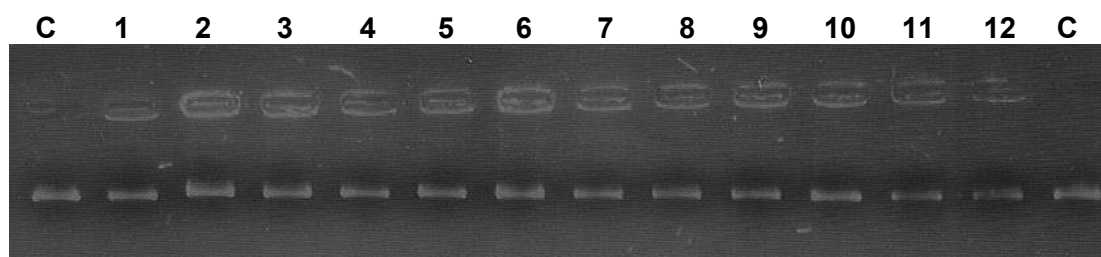


FIGURA 5 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% de 12 amostras de DNA extraído de fagos (1-12) aleatoriamente escolhidos e de 200ng de DNA controle (C) com 7249pb.

Dos 80 clones seqüenciados, apenas 51 apresentaram seqüências válidas (sem erros de sequenciamento), onde foram identificadas 12 seqüências diferentes e as demais ocorrendo repedidas 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	51/80	Freqüência
1	NMSDFLRIQLRS	38/51	74,51%
2	NYTIPTITHSRS	2/51	3,92%
3	TMSDFLRIQLPD	1/51	1,96%
4	HVYTANAFTHLT	1/51	1,96%
5	TPQTRQLIPPNP	1/51	1,96%
6	HMSRTVTHPSYP	1/51	1,96%
7	GQTEIYPPSVRF	1/51	1,96%
8	YIGSQTNERYS	2/51	3,92%
9	FPPNHNIAPLWS	1/51	1,96%
10	SLQMFFQLTNTV	1/51	1,96%
11	WTKPAAVIDLLA	1/51	1,96%
12	SPSMLTSMWPNT	1/51	1,96%

4. ANÁLISE DE DADOS PELA 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 Cisteína, Lisina e Glicina que foram selecionados negativamente apresentando frequência bem abaixo do esperado, e pela seleção positiva dos aminoácidos Isoleucina, Asparagina, Prolina e Treonina, os quais apresentaram uma frequência bem elevada em relação à esperada sugerindo que esses aminoácidos estão envolvidos na maioria das interações antígeno-anticorpo.

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

Aminoácidos			Frequência	
			Esperada	Observada
a	(alanina)	Ala	6,2%	4,17%
c	(Cisteína)	Cis	3,1%	0%
d	(Aspartato)	Asp	3,1%	2,78%
e	(Glutâmato)	Glu	3,1%	1,39%
f	(Fenilalanina)	Fen	3,1%	4,86%
g	(Glicina)	Gly	6,2%	1,39%
h	(Histidina)	His	3,1%	4,17%
i	(Isoleucina)	Ile	3,1%	6,25%
k	(Lisina)	Lys	3,1%	0,69%
l	(Leucina)	Leu	9,4%	8,33%
m	(Metionina)	Met	3,1%	4,17%
n	(Asparagina)	Asn	3,1%	6,25%
p	(Prolina)	Pro	6,2%	11,81%
q	(Glutamina)	Gln	6,2%	5,56%
r	(Arginina)	Arg	9,4%	5,56%
s	(Serina)	Ser	9,4%	10,42%
t	(Treonina)	Thr	6,2%	12,50%
v	(Valina)	Val	6,2%	3,47%
w	(Triptofano)	Trp	3,1%	2,08%
y	(Tirosina)	Tyr	3,1%	4,17%

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 6 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 4 e 7 houve a maior diversidade de aminoácidos enquanto que as diversidade nas posições 3, 10 e na última posição a diversidade foi reduzida, ficando abaixo de 0,4.

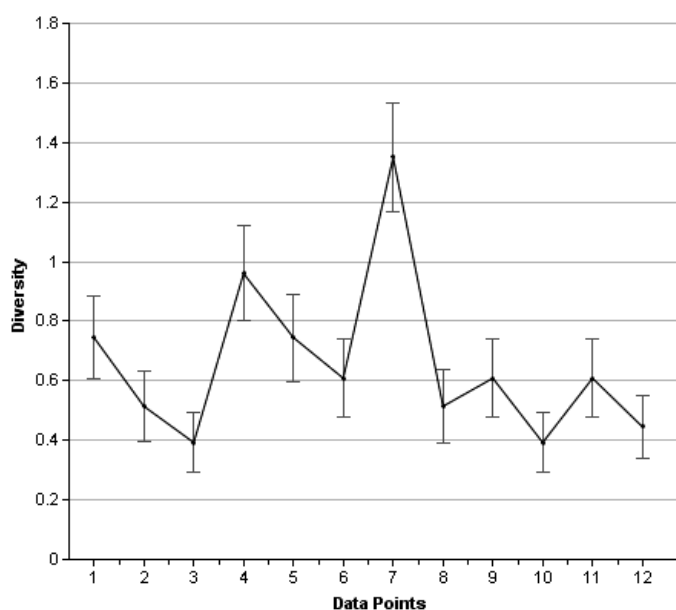


FIGURA 6 - Gráfico construído pelo programa DIVAA que ilustra a diversidade de sucessão dos aminoácidos em cada posição nos peptídeos.

Existem diversos parâmetros que indicam o sucesso de seleção de cada peptídeo. Na TABELA V são apresentados os seguintes parâmetros: seqüências de aminoácidos obtidas, freqüência dos peptídeos selecionados (FO), freqüência esperada desses peptídeos na biblioteca original (FE), amplificação dos peptídeos decorrentes do processo de seleção em relação à freqüência esperada dos peptídeos da biblioteca original (FO/FE), grau de informação de cada peptídeo ($I_{(m)}$) e número provável de clones independentes dentro da biblioteca (λ). Estes parâmetros são obtidos mediante cálculos a partir das freqüências dos aminoácidos para cada posição no clone, a freqüência esperada é calculada pela multiplicação das freqüências de todos os aminoácidos observados, tabela que é apresentada pelo fabricante para cada tipo de biblioteca de fagos. Todos os outros parâmetros são fórmulas que se originam desta FE, conforme

apresentadas na publicação de Rodi *et al.*, 2002 (105). Ao analisar a tabela, deve-se relacionar todos os dados de cada peptídeo selecionado, assim um peptídeo que apresenta um baixo valor de FE e λ , e alto valor para I(m) e FO/FE possui uma baixa probabilidade de ser selecionado, a menos que a seleção seja de fato específica. Ao observar os clones CS5 e CS9, por exemplo, veremos que eles possuem os maiores valores para I(m) e FO/FE, e os menores para FE e λ , mas mesmo assim foram selecionados durante o biopanning, o que comprova mais uma vez a eficiência da seleção.

TABELA V - Sequências de aminoácidos dos clones selecionados, frequência observada, frequência esperada, amplificação dos peptídeos e grau de informação.

Clone	Peptídeo	Frequência Observada (FO)	Frequência Randômica* (FE)	Amplificação** (FO/FE)	I(m)***	λ ****
CS1	NMSDFLRIQLRS	38/51	$1,46 \times 10^{-12}$	$1,34 \times 10^{10}$	27,3	$2,93 \times 10^{-3}$
CS2	NYTIPTITHSRS	2/51	$6,46 \times 10^{-14}$	$6,07 \times 10^{11}$	30,4	$1,29 \times 10^{-4}$
CS3	TMSDFLRIQLPD	1/51	$1,06 \times 10^{-12}$	$1,84 \times 10^{10}$	27,6	$2,13 \times 10^{-3}$
CS4	HVYTANAFTHLT	1/51	$8,71 \times 10^{-17}$	$2,30 \times 10^{14}$	37,0	$1,74 \times 10^{-7}$
CS5	TPQTRQLIPPNP	1/51	$3,68 \times 10^{-20}$	$5,44 \times 10^{17}$	44,8	$7,35 \times 10^{-11}$
CS6	HMSRTVTHPSYP	1/51	$2,74 \times 10^{-18}$	$7,31 \times 10^{15}$	40,4	$5,47 \times 10^{-9}$
CS7	GQTEIYPPSVRF	1/51	$5,11 \times 10^{-16}$	$3,91 \times 10^{13}$	35,2	$1,02 \times 10^{-6}$
CS8	YIGSQTNERYSYSP	2/51	$1,13 \times 10^{-14}$	$3,44 \times 10^{12}$	32,1	$2,27 \times 10^{-5}$
CS9	FPPNHNIAPLWS	1/51	$2,33 \times 10^{-22}$	$8,57 \times 10^{19}$	49,8	$4,66 \times 10^{-13}$
CS10	SLQMFFQLTNTV	1/51	$3,01 \times 10^{-12}$	$6,65 \times 10^9$	26,5	$6,01 \times 10^{-3}$
CS11	WTKPAIVIDLLA	1/51	$5,05 \times 10^{-11}$	$3,96 \times 10^8$	23,7	$1,0 \times 10^{-1}$
CS12	SPSMLTSMWPNT	1/51	$5,89 \times 10^{-13}$	$3,39 \times 10^{10}$	28,2	$1,18 \times 10^{-3}$

*Probabilidade de sequência randômica = frequência esperada na biblioteca (FE) **Amplificação = frequência observada/frequência esperada ***I(m) = grau de informação = $-\ln$ (probabilidade de sequência randômica) **** λ = número provável de clones independentes na biblioteca = complexidade x FE, onde complexidade da biblioteca ($2,7 \times 10^9$ - Ph.D.-12).

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 VI). Não foi observada concordância nos alinhamentos entre os programas e optou-se pela não formação de motivos o que poderia induzir a identificação errônea 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.nih.gov/blast>). Os alinhamentos revelaram similaridade entre os peptídeos selecionados e proteínas relacionadas a receptores de membranas, antígenos tumorais, transportadores, proteínas relacionadas à regulação gênica, componentes do sistema imune e supressor de tumor (TABELA VII).

Epítomos lineares preditos pelo programa *Bepipred* são apenas alinhamentos de seqüências dos peptídeos com seqüências alvos de proteínas com estrutura conhecidas, com provável acerto em regiões que possuem alta probabilidade de superfície e que sejam altamente hidrofílicas. Esta predição serve apenas como um indicador a mais a ser investigado posteriormente após a validação de cada clone por outros métodos moleculares e imunológicos. Infelizmente o programa não faz alinhamentos de motivos descontínuos ou conformacionais, que provavelmente seriam ainda mais importantes.

Assim, para a identificação destes possíveis epítomos lineares foi realizada uma busca no BLAST (*blastp*) utilizando a seqüência peptídica dos clones e o banco de dados de seqüências de proteínas *Swissprot*, restrito a proteínas humanas. As duas melhores proteínas que se alinham a cada um dos clones foram comparadas ao resultado do programa *Bepipred* de predição de epítomos lineares, com o objetivo de saber se as regiões alinhadas correspondiam às regiões preditas.

Essas predições são feitas através de métodos que utilizam uma escala de tendências como estrutura secundária, hidrofilicidade, acessibilidade, e assim dão valores para cada aminoácido (Programa *Bepipred* - http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input). Na última coluna da TABELA VII estão apresentadas as regiões de prováveis epítomos lineares dos peptídeos selecionados. Motivos lineares com maior homologia foram identificados e aqueles que resultaram em similaridade com regiões não acessíveis das prováveis moléculas alvo pode ser um indicativo que este provável alvo não seja a verdadeira molécula que gerou a resposta imune.

TABELA VI - Alinhamentos das seqüências de aminoácidos dos 12 peptídeos selecionados pelos programas CLUSTAL W (v. 1.83), MUSCLE (v. 3.6), T-COFFEE (v. 5.13) e MAFFT (v. 4.0) mostrando a divergência entre os alinhamentos nos diferentes programas.

ALINHAMENTO - PROGRAMAS			
CLUSTAL W (v. 1.83)	MUSCLE (v. 3.6)	T-COFFEE (v. 5.13)	MAFFT (v. 4.0)
CS2 -NYTIPTITHSRS--	CS8 YIGSQTNERYS- - - -	CS7 - - - -G- - -QT-EIYP- - - -PSVR-F- - - - - - - -	CS1 NM- -SDFLRIQLRS
CS4 HVYTANAFTHLT- - -	CS5 - -TPQTRQLIPPNP- -	CS8 - -YIGS- -QTNERYS- - - -P- - - - - - - - - - - - - -	CS3 TM- -SDFLRIQLPD
CS1 - - -NMSDFLRIQLRS	CS7 - - - -GQTEIYPPSVRF	CS1 - - -NMSDFL- - - - - - - - - - - -RI- - -Q- L- RS- -	CS2 NY- -TIPTITHSRS
CS3 - - -TMSDFLRIQLPD	CS9 - -FPPNHNIAPLWS- -	CS3 - - -TMSDFL- - - - - - - - - - - -RI- - -Q- L- PD- -	CS4 HV- -YTANAFTHLT
CS6 - -HMSRTVTHPSYP-	CS11- -WTKPAAVIDLLA- -	CS10- - - -S- - -L- - - - - - - - - - - -QMFFQ- L- TNTV	CS5 TP- -QTRQLIPPNP
CS5 -TPQTRQLIPPN-P-	CS1 - - -NMSDFLRIQLRS-	CS11- -WTKPAAV- - - - - - - - - - - -I- - -DLL- A- - -	CS6 HM- -SRTVTHPSYP
CS9 -FPPNHNIAPLWS- -	CS3 - - -TMSDFLRIQLPD-	CS12- - -SPS-MLTS-MWPN- - - - - - - - - - - -T-	CS7 GQ- -TEIYPPSVRF
CS8 - -YIGSQTNERYS-	CS10- - -SLQMFFQLTNTV-	CS9 - - -FP- - - - - - - - - - - -PN- - -H- - -NI-APLW- - -S-	CS8 YI- -GSQTNERYS-
CS7 - - -GQTEIYPPSVRF	CS2 -NYTIPTITHSRS- - -	CS2 -NY- - - - - -T- - -I-PTITH-S-R- - - - - - - - -S-	CS9 FPPNHNIAPLW- -S
CS12- - -SPSMLTSMWPNT	CS4 HVYTANAFTHLT- - - -	CS4 HVY- - - - -TA- - - -N- - - - - - - - -AFTHL- - - -T-	CS12 SP- -SMLTSMWPNT
CS11-WTKPAAVIDLLA- -	CS6 - -HMSRTVTHPSYP- -	CS5 - - - - - - - -T- - - -PQ-T- - - -R- - - -QLIPPNP-	CS10 SL- -QMFFQLTNTV
CS10- - -SLQMFFQLTNTV	CS12- - -SPSMLTSMWPNT	CS6 H- - -MS- -RT- - - - - -VTHPS- - -Y- - - -P- - - -	CS11 WT- -KPAAVIDLLA

TABELA VII - 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 Swissprot, e sua regiões de prováveis epítomos lineares feita de acordo com o programa *Bepipred*.

	Peptídeo	Alvos Potenciais	Swissprot	E Value	Regiões dos prováveis epítomos lineares
1	NMSDFLRIQLRS	Uncharacterized protein C16orf44	Q96MC4	0.94	*
		Contactin-associated protein-like 4 precursor (Cell recognition molecule Caspr4)	Q9C0A0	1.3	*
2	NYTIPTITHSRS	Mucin-16 (Ovarian carcinoma antigen CA125) (Ovarian cancer related tumor marker CA125)	Q8WXI7	18	11759 - 11766, 162 - 168, 10608 - 10612, 7031 - 7034, 11394 - 11397
		Hydrocephalus-inducing protein homolog	Q4G0P3	24	*
3	TMSDFLRIQLPD	Uncharacterized protein C16orf45	Q96MC5	0.95	*
		F-actin capping protein subunit alpha-1 (CapZ alpha-1)	P52907	2.3	249 - 252
4	HVTANAFTHLT	Thioredoxin domain-containing protein 5 precursor (Thioredoxin-like protein p46) (Endoplasmic reticulum protein ERp46)	Q8NBS9	2.3	*
		Nuclear RNA export factor 1 (Tip-associating protein) (Tip-associated protein) (mRNA export factor TAP)	Q9UBU9	9.9	596 - 599
5	TPQTRQLIPPNP	Alstrom syndrome protein 1	Q8TCU4	9.9	3284 - 3288
		Uncharacterized protein C10orf119	Q9BTE3	9.9	527 - 531
6	HMSRTVTHPSYP	Chymotrypsin-like protease CTRL-1 precursor	P40313	18	108 - 112
		Transportin-2 (Karyopherin beta-2b)	O14787	24	*

7	GQTEIYPPSVRF	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 A (Ubiquitin-protein ligase A) (Ubiquitin carrier protein A) (HR6A)	P49459	7.4	*
		Endothelial lipase precursor (Endothelial cell-derived lipase)(EDL)	Q9Y5X9	9.9	42 - 45
8	YIGSQTNERYS	Nesprin-1 (Nuclear envelope spectrin repeat protein 1) (Synaptic nuclear envelope protein 1) (Syne-1) (Myocyte nuclear envelope protein 1) (Myne-1) (Enaptin)	Q8NF91	5.5	*
		Glycophorin A precursor (PAS-2) (Sialoglycoprotein alpha) (MN sialoglycoprotein) (CD235a antigen)	P02724	9.9	39 - 46
9	FPPNHNIAPLWS	General transcription factor 3C polypeptide 2 (Transcription factor IIIC-subunit beta) (TF3C-beta) (TFIIIC 110 kDa subunit)	Q8WUA4	24	*
		B-cell lymphoma 9 protein (Bcl-9) (Legless homolog)	O00512	32	947 - 954
10	SLQMFFQLTNTV	Olfactory receptor 2T34 (Olfactory receptor OR1-63)	Q8NGX1	2.3	*
		Uncharacterized protein KIAA0467	Q5T011	13	*
11	WTKPAAVIDLLA	Protein MTO1 homolog, mitochondrial precursor	Q9Y2Z2	13	*
		Protocadherin Fat 2 precursor (hFat2) (Multiple epidermal growth factor-like domains 1)	Q9NYQ8	18	4150 - 4153
12	SPSMLTSMWPNT	UNC45 homolog A (UNC-45A) (Smooth muscle cell-associated protein 1) (SMAP-1)	Q9H3U1	7.4	*
		WD and tetratricopeptide repeats protein 1	Q8N5D0	9.9	*

* região não acessível na molécula.

5. Phage ELISA

Para confirmar 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 o anticorpo anti-M13 na concentração de 1 μg por poço. Novamente aqui utilizou-se o fago selvagem como controle negativo de reação, pacientes com HPB e indivíduos sadios.

A FIGURA 7 apresenta um gráfico representativo da reatividade dos clones selecionados aos anticorpos IgG anti-CaP, o *cutoff* foi calculado somando-se a média das leituras das réplicas do fago selvagem (controle negativo) mais duas vezes o desvio padrão. Observa-se que os clones 1, 5, 9 e 11 apresentaram razões dos índices ELISA maiores do que 1, ou seja significativas, mas apenas os clones 1 e 5 apresentaram alta reatividade aos anticorpos testados.

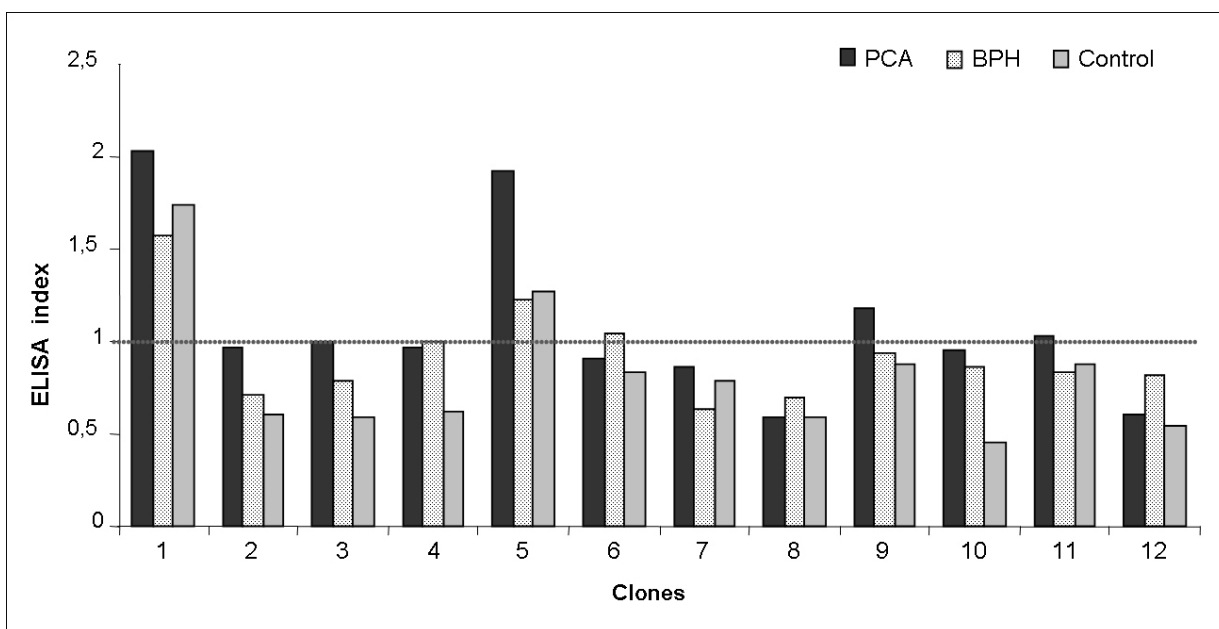


FIGURA 7 - Gráfico representativo das leituras a 492nm do ensaio de ELISA mostrando a reatividade dos clones de fagos capturados por anticorpo anti-M13 contra soro de pacientes com câncer, HPB e indivíduos sadios.

DISCUSSÃO

Este trabalho foi planejado com o propósito de utilizar a tecnologia *phage display* para selecionar peptídeos que sejam miméticos de antígenos prostáticos ligantes a anticorpos circulantes de pacientes com câncer de próstata e que possam ser utilizados como biomarcadores potenciais desta doença.

A seleção dos fagos ligantes aos anticorpos purificados, foi realizada com uma biblioteca de peptídeos expressos em fagos M13 com 12 resíduos randômicos. Como tumores possuem uma grande quantidade de proteínas diferentes que são capazes de interagir com os peptídeos da biblioteca, uma simples seleção contra proteínas de células tumorais poderia resultar em um grande número de peptídeos sem especificidade. Para evitar esse problema, utilizou-se soro de indivíduos sadios e extratos de proteínas totais de tecido de próstata de pacientes com HPB para “subtrair” fagos que se ligam as proteínas expressas nesses tecidos. Essa metodologia de subtração tem sido utilizada com sucesso para identificar peptídeos ligantes específicos aos neurônios de camundongo (102), assim como identificar peptídeos com capacidade de promover a invasão metastática em carcinoma hepatocelular (103).

No presente trabalho, os extratos protéicos utilizados foram provenientes de próstatas macrodissecadas, desta forma é provável que parte das amostras contenham células neoplásicas misturadas a células hiperplásicas e normais, principalmente por se tratar de um tumor altamente heterogêneo, multifatorial e multilocal (4). Por este motivo, em cada ciclo de seleção foram feitas eluições negativas com IgG de soro de indivíduos normais e extrato protéico de pacientes com HPB. Para obter uma maior especificidade dos peptídeos selecionados optou-se por realizar uma eluição por afinidade com extrato protéico de CaP ao invés de uma eluição ácida, o que garante a seleção de peptídeos que mimetizam proteínas do tecido prostático e que são reativas contra as IgGs circulantes dos pacientes com CaP, pois ao adicionar as proteínas, que são mais específicas por possuírem os

epítomos completos, ocorre uma competição de ligação ao anticorpo entre o fagos e as proteínas adicionadas, fazendo com que os mesmos sejam eluídos.

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 retidos para subsequente eluição e amplificação no ciclo seguinte (TABELA II). Os títulos dos fagos na entrada do biopanning foram sempre maiores que os títulos de saída, pois os fagos com maior afinidade aos anticorpos imobilizados na placa ficam ligados a estes pela interação com o parátipo, e o restante dos fagos com baixa ou sem afinidade aos anticorpos são lavados (removidos). Fagos com baixa afinidade pelos anticorpos podem ficar aderidos diretamente à placa, não interagindo com os anticorpos, ou ainda permanecerem suspensos na solução (não ligados), assim após as sucessivas lavagens muitos destes fagos não específicos são excluídos (104). Isto leva a redução nos títulos após as etapas do biopanning.

Os títulos do 1º e 2º ciclos de seleção ($1,3 \times 10^4$ e $7,8 \times 10^4$) evidenciam a ocorrência de uma seleção específica dos fagos. Como se pode observar na TABELA II, houve uma queda esperada no número de partículas virais selecionadas no terceiro ciclo de seleção ($5,1 \times 10^4$ pfu), pois a partir dessa etapa a estringência de seleção foi elevada pelo aumento da concentração de Tween 20 de 0,1% para 0,5% no tampão de lavagem, porém este aumento de estringência foi realizado apenas no terceiro ciclo de seleção para que não se perdesse a variabilidade dos clones. 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.

Após a avaliação preliminar dos clones e sequenciamento, foi constatada a ausência de cisteína, e o aminoácido arginina apresentou-se com uma freqüência abaixo da freqüência esperada na biblioteca original (TABELA IV). Sabe-se que os aminoácidos arginina e cisteína nas seqüências de peptídeos randômicos atuam na secreção da Proteína III e podem interferir na infectividade dos fagos. Conseqüentemente, clones com peptídeos contendo estes aminoácidos podem ser menos freqüentes durante a seleção (105, 106).

O *pool* de imunoglobulinas G de soros de pacientes com CaP pode conter um repertório de anticorpos contra o tumor (41), assim a verificação de imunorreatividade dos peptídeos selecionados contra o repertório de IgG circulante de pacientes com CaP, HPB e homens jovens (controle negativo) foi realizada neste trabalho com o intuito de melhor caracterizar os peptídeos selecionados como potenciais biomarcadores tumorais identificando a presença de auto-anticorpos anti-CaP nos pacientes testados.

No ensaio de ELISA (FIGURA 7), pôde-se observar que quando testada a reatividade dos 12 clones selecionados contra os anticorpos (IgG) presentes nos *pools* de soros, os clones 1, 5, 9 e 11 apresentaram razão do índice ELISA maior do que 1, para os anticorpos anti-CaP, o que evidencia a imunorreatividade específica ao câncer destes peptídeos. Porém, por se tratar de testes realizados com *pool* de soros, o fato dos outros clones encontrarem-se abaixo do *cutoff*, não significa que não sejam tão imunorreativos, provavelmente isto se deva a reatividade individual do soro de cada paciente que compõe o *pool*.

Ao analisar a freqüência dos peptídeos selecionados juntamente com o grau de informação e o fato de ter sido utilizado anticorpos policlonais na seleção, constata-se que o clone 1, mesmo sendo o mais freqüente (74,51%) e apresentando uma razão do índice ELISA maior que 1, não foi o mais imunorreativo. Já os clones 5 e 9 que são seqüências únicas (1,56%), mostraram-se altamente imunorreativos e evidenciam uma seleção eficiente, pois estes clones apresentaram a razão do índice ELISA maior que 1 e possuem os maiores valores do grau de informação (TABELA V), ou seja, mesmo sendo um evento estatisticamente raro de ocorrer, os peptídeos foram eficientemente selecionados.

Mesmo alguns clones não apresentando uma imunorreatividade significativa ao utilizar *pool* de IgGs dos pacientes, foi possível verificar que 66,7% dos clones reagiram positivamente com CaP e apenas 33,3% com HPB. 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 (67, 110, 41, 111).

Desta forma, verificou-se mais uma vez, a eficiência da eluição por afinidade com extrato protéico de CaP, pois os clones apresentaram alta reatividade aos anticorpos específicos de CaP, mesmo com a utilização de anticorpos policlonais. Entretanto, cuidados devem ser tomados, pois anticorpos policlonais desenvolvidos contra um grande número de antígenos certamente contêm numerosos epítomos correspondentes a diferentes regiões do antígeno e, normalmente, soros policlonais reconhecem outros antígenos não relacionados com o alvo desejado (107). No presente trabalho, a eluição por afinidade minimizou a seleção de clones que pudessem reagir com anticorpos não específicos ao alvo de interesse.

Santamaria *et al.* em 2001 (108) realizaram vários ensaios de ELISA com fagos miméticos de HPV com soro de pacientes com câncer cervical e sugeriram 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.* em 2004 (43), identificaram imunorreatividade de antígenos selecionados 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.

Os alinhamentos das seqüências peptídicas com o banco de dados *GeneBank* pelo *BLAST* não encontraram homologias perfeitas. Vários autores relatam essa falta de homologias perfeitas dos peptídeos selecionados com as proteínas anotadas (104, 107, 109, 82, 110). 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 *et al.* em 2003 (69), mesmo não encontrando homologias perfeitas, sugerem possíveis proteínas alvo apresentadas nos alinhamentos com similaridade significativa aos seus peptídeos.

Devido à divergência de resultados entre os programas utilizados para o alinhamento entre as seqüências peptídicas dos fagos selecionados neste trabalho,

não foi possível identificar motivos protéicos comuns. 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.

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 de membrana transportadoras, receptores celulares sinalizadores, moléculas de adesão, proteínas relacionadas à regulação gênica e transcrição, proteínas relacionadas com filamento de actina, mobilidade intracelular e citoesqueleto, e também similaridades com proteínas relacionadas a processos tumorais.

Sabe-se que antígenos intracelulares normalmente não induzem resposta imune, contudo a necrose tumoral pode ser responsável pela liberação de proteínas citoplasmáticas que subsequentemente podem ativar o sistema imune do hospedeiro (111). Essa pode ser uma provável explicação para as similaridades encontradas com proteínas nucleares e citoplasmáticas. 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 (112, 113).

Irving *et al.* em 2001 (114) 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 (115) 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 epítopos conformacionais presentes nas proteínas de CaP.

Epítopos de células B são regiões que são reconhecidos pelos anticorpos do sistema imune e por isso podem ser usados no design de vacinas e testes para diagnósticos. A grande maioria dos epítopos de uma proteína são compostos de diferentes partes da cadeia polipeptídica que estão próximas devido ao enovelamento da proteína e por isso são chamados de descontínuos ou conformacionais. Mas aproximadamente 10% são compostos de uma simples seqüência da cadeia polipeptídica, sendo denominados epítopos contínuos ou lineares (116).

A identificação de segmentos peptídicos lineares é o passo inicial na busca de determinantes antigênicos. Uma das maneiras de se fazer esta identificação é através de métodos de predição, que são baratos, rápidos e podem fornecer bons indícios para uma pesquisa mais detalhada através de técnicas experimentais. Na última coluna da TABELA VII estão apresentadas as regiões de prováveis epítopos lineares dos peptídeos selecionados. Estas predições foram feitas através de métodos que utilizam uma escala de tendências como estrutura secundária, hidrofiliidade, acessibilidade, e assim dão valores para cada aminoácido (programa *Bepipred*).

O sistema de exposição de proteínas em fagos tem sido extensivamente aplicado em diversos campos. Aplicações recentes no desenvolvimento de medicamentos, vacinas e agentes para diagnósticos estão sendo cada vez mais promissores (72).

Existe um crescente entusiasmo por aplicar técnicas proteômicas para a identificação de biomarcadores em soro de pacientes em estádios iniciais do câncer, diagnósticos não invasivos e para monitorar a progressão de tumores. Auto-anticorpos associados ao câncer são freqüentemente dirigidos por proteínas intracelulares que são mutadas, modificadas, ou aberrantemente expressas em células tumorais e conseqüentemente são considerados como repórteres imunológicos que poderiam ajudar na descoberta de eventos moleculares existentes na tumorigênese. Evidências sugerem que cada tipo de câncer pode ativar auto-

anticorpos únicos que refletem a natureza do processo maligno no órgão afetado. O advento das técnicas modernas, tais como genômica e proteômica têm acelerado o interesse no repertório de auto-anticorpos de soro em cânceres humanos, para a descoberta de candidatos a antígenos associados a tumor, TAAs (100).

Assim, a descoberta de um ligante que ataca apenas o tumor pode abrir caminhos para o tratamento do câncer, podendo carrear drogas não-tóxicas que se tornam ativas quando atingem o alvo. Esta técnica pode evitar que as células saudáveis sejam danificadas ao usar um ligante específico das células tumorais. Se bem sucedida em humanos, a técnica pode melhorar muito a qualidade de vida de pacientes com câncer.

A originalidade deste trabalho está na seleção específica de peptídeos recombinantes por *phage display* contra imunoglobulinas G do soro de pacientes utilizando extratos protéicos de tecidos tumorais, identificando assim, prováveis alvos protéicos da resposta auto-imune no desenvolvimento do CaP. Os peptídeos selecionados poderão se tornar importantes marcadores tumorais, para utilização no estadiamento, prognóstico e tratamento do câncer. Porém, é necessária a 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 está em andamento e faz-se necessária, no intuito de avaliar a imunorreatividade dos peptídeos selecionados com mais profundidade para a possível utilização em diagnósticos mais eficientes e precisos do CaP e HPB, além da identificação e mapeamento de epítomos das proteínas mimetizadas.

CONCLUSÕES

A seleção e identificação de peptídeos imunorreativos contra IgG de soro de pacientes com câncer de próstata por meio da tecnologia *phage display* revelaram que:

- A tecnologia de *phage display* foi eficiente na seleção de peptídeos imunorreativos contra os anticorpos alvo circulantes em pacientes com câncer de próstata, não apresentando reação cruzada com outras IgGs irrelevantes.
- O não alinhamento das seqüências peptídicas selecionadas pode ser um indicativo de que sejam mimetopos de proteínas diferentes, corroborando os resultados da seleção 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 parâmetros estatísticos e de bioinformática para cada peptídeo selecionado, juntamente com os resultados dos testes ELISA, validam a seleção subtrativa e comprovam a eficiência da tecnologia *Phage Display*.
- Resultados preliminares de imunoensaios para o estudo da diversidade humoral indicam que os peptídeos selecionados apresentaram reatividade diferencial entre os grupos de pacientes CaP e HPB, indicando que alguns peptídeos têm maior expressão dentro de um grupo específico e, portanto, podem apresentar potencial aplicação no diagnóstico sorológico dessas alterações, embora estudos individualizados sejam necessários para obter os parâmetros de validação diagnóstica, tais como sensibilidade e especificidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. PORKKA, K. P., VISAKORPI, T. Molecular mechanisms of prostate cancer. *European Urology*. v. 45, p. 683-691, 2004.
2. GATTAS, N. Genética e câncer de próstata. In: WROCLAWSKI, E. R., BENDHACK, D. A., DAMIAO, R., ORTIZ, V. *Guia Prático de Urologia*. São Paulo: Segmento, cap. 128, p. 433-434, 2003.
3. HANAHAN D., WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell*, v. 100, p. 57-70, 2000.
4. 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, cap. 4, p. 51-74, 1999.
5. 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.
6. 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.
7. PIENTA, K.J., ESPER, P.S. Risk factors for prostate cancer. *Ann Intern Med*, v. 118, p. 793-803. 1993.
8. 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.

9. HERING, F. L. Epidemiologia e historia natural. In: WROCLAWSKI, E. R., BENDHACK, D. A., DAMIAO, R., ORTIZ, V. Guia Prático de Urologia. São Paulo: Segmento, cap. 125, p. 423- 424, 2003.
10. INSTITUTO NACIONAL DO CANCER. Câncer de Próstata. Disponível em: <<http://www.inca.org.br/cancer/tipos/prostata>>. Acesso em: 14 abr, 2007.
11. 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-dependent and androgen-independent prostate cancer cells. European Journal of Cancer, v. 37, p. 2129-2134, 2001.
12. SROUGI, M., CURY, J. Hiperplasia benigna da próstata. In: SCHOR, N., SROUGI, M. Nefrologia, Urologia, Clínica. São Paulo: Sarvier, cap. 6, p. 501-506, 1998.
13. 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. v. 2. 6ª ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, cap. 29, p. 1159-1221, 1992.
14. CATALONA, W. J.; ANTENOR, J. A. *et al.* Screening for prostate cancer in high risk populations. The Journal of Urology, Baltimore, v. 168, n. 5, p 1.980-1.984, 2002.
15. KRUMHOLTZ, J. S.; CARVALHAL, G. F. *et al.* Prostate specific antigen cutoff of 2.6ng/mL for prostate cancer screening is associated with favorable pathologic tumor features. Urology, v. 60, n. 3, p. 469-474, 2002.
16. CATALONA, W. J. Prostate cancer screening. International British Journal of Urology, v. 94, n. 7, p. 964-966, 2004.

17. COFFEEY, D. S. Prostate cancer: an overview of an increasing dilemma. *Cancer (Suppl.)*, v. 71, p.880-886, 1993.
18. 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.
19. STAMEY, T. A.; YANG, N.; HAY, A. R. Prostate specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *New England Journal of Medicine*, Waltham, v. 317, p. 909-916, 1987.
20. 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, 125 p., 1986.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. ARAGÃO, A. J. O exame físico na avaliação do câncer de próstata. In: WROCLAWSKI, E. R., BENDHACK, D. A., DAMIÃO, R., ORTIZ, V. *Guia Prático de Urologia*. São Paulo: Segmento, cap. 130, p. 437-438, 2003.

25. GLEASON, D. F. Histologic grading and clinical staging of prostatic carcinoma. In: Tannenbaum, M (Ed). Urologic Pathology: The prostate. Philadelphia: Lea e Febiger, p. 121, 1977.
26. 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. 6^a ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, cap. 29, p. 1159-1221, 1992.
27. SROUGI, M. Câncer da próstata. In: SCHOR, N., SROUGI, M. Nefrologia, Urologia, Clínica. São Paulo: Sarvier, cap. 40, p. 225-240, 1998.
28. SCHRODER, 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.
29. PARTIN, W.A., MANGOLD, D.L., WALSH, P.C., LAMM, D.M., WALSH, P.C., EPSTEIN, J.I., PEARSON, J.D. Contemporany update of prostate cancer staging nomograms (Partin Tables) for the new millennium. Urology, Secaucus, v 59, p 843-848, 2001.
30. 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, 1985.
31. 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.
32. BUSSEMAKERS, M. J.; VON BOKHOVEN, A. *et al.* DD3: a new prostate-specific gene highly over expressed in prostate cancer. Cancer Research, Baltimore, v. 59, n. 23, p. 5.975-5.979, 1999.

33. 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.
34. ROGERS, C.G.; YAN, G.; ZHA, S. *et al.* Prostate cancer detection un uroanalysis for α -methylacy coenzyme a racemase protein. *The Journal of Urology*, Baltimore, v. 172, n. 4, p. 1.501-1.503, 2004.
35. ORNSTEIN, D. K.; RAYFORD, V. A.; FUSARO, V. A. *et al.* 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.
36. GIMBA, E. R. P., BARCINSKI, M. A. Molecular aspects of prostate cancer: implications for future directions. *International Braz. J. Urol*, v. 29, p. 401-411. 2003.
37. LI, P. E., NELSON, P. S. Prostate cancer genomics. *Cur. Urol Rep*, v. 2, p. 70-78. 2001.
38. KARAN, D., LIN, M. F., JOHNSON, S. L., BATRA, S. K. Current status of the molecular genetics of human prostatics adenocarcinomas. *Int J Cancer*, v. 103, p. 285-293. 2003.
39. CAVARRETTA, I.T.R., CULIG, Z., KLOCKER, H., EDER, I.E. Novel Experimental Therapeutic Approaches for Prostate Cancer. *EAU Update Series*, v. 3, n. 4, p. 227-239, 2005.
40. BOK, R.A., SMALL, E.J. Bloodborne biomolecular markers in prostate cancer development and progression. *Nature Reviews*, v. 2, p. 918-926, 2002.

41. MINTZ, P.J., KIM, J., DO, K.A., WANG, X., ZINNER, R.G., CRISTOFANILLI, M., ARAP, M.A., HONG, W.K. TRONCOSO, P., LOGOTHETIS, C.J., PASQUALINI, R., ARAP, W. Fingerprinting the circulating repertoire of antibodies from cancer patients. *Nat Biotechnology*, v. 21, n.1, p. 57-63, 2003.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. 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.
46. MADRID, F.F. Autoantibodies in breast cancer sera: candidate biomarkers and reporters of tumorigenesis. *Cancer Letters*, v. 230, n. 2, p. 187-198, 2005.
47. 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.

48. 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. 8, 1609-1616, 2006.
49. 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.
50. 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.
51. 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.
52. TAM, E.M. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv Immunol*, v. 44, p. 93-151, 1989.
53. 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.
54. TAN, E.M. Autoantibodies as reporters identifying aberrant cellular mechanisms in tumorigenesis. *J Clin Invest*, v. 108, n. 10, p. 1411-1415, 2001.
55. 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.

56. 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.
57. 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.
58. 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.
59. VON MENSdorFF-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.
60. 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.
61. 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.
62. 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.

63. 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.
64. 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. 8, 1609-1616, 2006.
65. 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.
66. 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.
67. 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.
68. HANSEN, M.H., OSTENSTAD, B., SIOUD, M. Identification of immunogenic antigens using a phage-displayed cDNA library from an invasive ductal breast carcinoma tumor. *Int J Oncol*, v. 19, n. 6, p. 1303-1309, 2001b.
69. DYBWAD, A., LAMBIN, P., SIOUD, M., ZOUALI, M. Probing the specificity of human mieloma proteins with a random peptide phage library. *Scand J Immunol*, v. 57, n. 6, p. 583-590, 2003.

70. JAGER, D., KNUTH A. Antibodies and vaccines—hope or illusion? *The Breast*, v. 14, n. 6, p. 631-635, 2005.
71. SMITH, G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, v. 228, p. 1315-1317, 1985.
72. BENHAR, I. Biotechnological applications of phage and cell display. *Biotechnol Adv*, v. 19, p. 1-33, 2001.
73. PHIZICKY, E.M., FIELDS, S. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol*, v. 59, p. 94-123, 1995.
74. 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.
75. BRIGIDO, M.M., MARANHÃO, A.Q. Bibliotecas Apresentadas em FAGOS. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, n. 26, 2002.
76. AZZAZY, H.M., HIGHSMITH, W.E. Jr. *Phage display* technology: clinical applications and recent innovations. *Clin Biochem*, v. 35, p. 425-445, 2002.
77. HAARD, H., HENDERIKX, P., HOOGENBOOM, H.R. Creating and engineering human antibodies for immunotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 31, p. 5-31, 1998.
78. STEPHEN, C.W., HELMINEN, P., LANE, D.P. Characterization 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.

79. 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.
80. PARMLEY, S., SMITH, G. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene*, v. 73, p. 305–318, 1988.
81. WILLATS, W.G. *Phage display*: practicalities and prospects. *Plant Mol Biol.* v. 50, p. 837-54, 2002.
82. 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.
83. 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.
84. 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.
85. 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.
86. 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.

87. 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.
88. 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.
89. 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.
90. NILSSON, F., TARLI, L., VITI, F., NERI, D. The use of *phage display* for the development of tumor targeting agents. Adv Drug Deliv Rev, v. 43, n. 2-3, p.165-196, 2000.
91. 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.
92. 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.

93. HEKIM, C., LEINONEN, J., NARVANEN, A., KOISTINEN, N., ZHU, L., KOIVUNEN, E., VÄISÄNEN, V., STENMAN, U.H. Novel Peptide Inhibitors of Human Kallikrein 2. The Journal of Biological Chemistry, v. 281, n. 18, p. 12555–12560, 2006.
94. 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.
95. 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.
96. 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.
97. WU P, LEINONEN J, KOIVUNEN E, LANKINEN H, STENMAN UH. Identification of novel prostatespecific antigen-binding peptides modulating its enzyme activity. Eur J Biochem, v. 267, n. 20, p. 6212-6220, 2000.
98. 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.
99. FERRIEU-WEISBUCH, C., MICHEL, S., COLLOMB-CLERC, E., POTHION, C., DELEAGE, G., JOLIVET-REYNAUD, C. Characterization of prostate-specific antigen binding peptides selected by *phage display* technology. J Mol Recognit, v.19, n.1, p.10-20, 2006.

100. CASIANO, C.A., MEDIAVILLA-VARELA, M., TAN, E.M. Tumor-associated antigen arrays for the serological diagnosis of cancer. *Mol Cell Proteomics*, v. 5, n.10, p. 1745-1759, 2006.
101. ARAP, M.A. *Phage display* technology - Applications and innovations. *Genetics and Molecular Biology*, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2005.
102. HOU T. S., DOVE M., ANDERSON J. Z., *et al.* Identification of polypeptides with selective affinity to intact mouse cerebellar granule neurons from a random peptide-presenting phage library. *J Neurosci Methods* v. 138, p. 39-44, 2004.
103. JIA W. D., SUN H. C., ZHANG J. B., *et al.* A novel peptide that selectively binds highly metastatic hepatocellular carcinoma cell surface is related to invasion and metastasis. *Cancer Letters*, v. 247, p. 234-242, 2006.
104. FRESCHI, A. P. P. Desenvolvimento de Aplicações Tecnológicas da Metodologia de *phage display* no Diagnóstico do Câncer de Próstata. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.
105. RODI J. D., SOARES A. S., MAKOWSKI L. Quantitative assessment of peptide sequence diversity in M13 combinatorial peptide *phage display* libraries. *Journal of Molecular Biology*. v. 322, p.1039–1052, 2002.
106. NOREN K. A., NOREN C. J. Construction of high-complexity combinatorial *phage display* peptide libraries. *METHODS*. V. 23, P.169–178, 2001.
107. 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, n. 3, p. 305–309, 1998.

108. 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.
109. 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.
110. VIEIRA, C. U. Expressão de genes das vias de biossíntese e degradação do hormônio juvenil e caracterização de peptídeos ligantes ao cérebro de *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Tese de Doutorado. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2006.
111. CHRISTIAN, C. L., ELKON, K.B. Autoantibodies to intracellular proteins: clinical and biological significance. *Am. J. Med.* v. 80, p. 53-61, 1986.
112. DYBWAD A., FORRE O., KJELDSEN-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.
113. 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.

114. 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.
115. LIU R., ENSTROM A. M., LAM K. S. Combinatorial peptide library methods for immunobiology research. *Experimental Hematology*. v.31, p.11-30, 2003.
116. LARSEN J. E. P.; LUND O.; NIELSEN M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Research*, v. 2, p. 1-7, 2006.

ANEXO I



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Termo de Consentimento

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

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

Para realização dos exames laboratoriais será necessárias a coleta de 10mL 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, será realizadas juntamente com os procedimentos rotineiros do centro cirúrgico do Hospital de Clínicas, sem qualquer desconforto adicional ao paciente.

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

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

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

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

Os pacientes e contatos familiares que concordarem em participar da pesquisa poderão desistir de fazê-lo a qualquer momento, sem que haja nenhum prejuízo próprio. Pelos presentes termos apresentados por este documento, Eu,

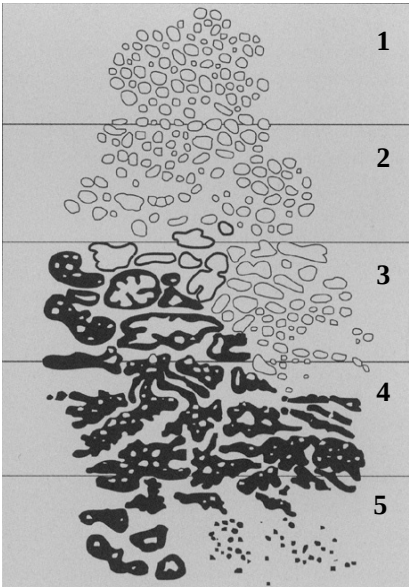
_____,
concordo em colaborar com a pesquisa, declarando estar ciente dos riscos, benefícios e direitos.

Assinatura _____

Testemunhas _____

ANEXO II

SISTEMA DE GRADAÇÃO HISTOLÓGICO DE GLEASON

GLÂNDULAS				
	M A R G E N S	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 Diferenciados 10= Indiferenciados				

Como os adenocarcinomas da próstata apresentam mais de um padrão histológico, o diagnóstico final na escala de Gleason (1977) é dado pela soma dos graus do padrão primário (predominante) e do padrão secundário (segunda menor área representada) (*apud* Stamey & McNeal 1992, Isaacs 1997, Srougi 1998).