



CAROLINA FERNANDES REIS

CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS LIGANTES A CARCINOMAS
PAPILÍFEROS DE TIREOIDE

Campinas
2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

CAROLINA FERNANDES REIS

CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS LIGANTES A CARCINOMAS PAPILÍFEROS
DE TIREOIDE

ORIENTADORA: Prof. Dra. Laura Sterian Ward

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção
de título de Doutora em Ciências na área de concentração Clínica Médica.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
POR CAROLINA FERNANDES REIS E
ORIENTADA PELA PROF. DRA. LAURA
STERIAN WARD.

Dra. Laura Sterian Ward

Campinas
2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

R277c

Reis, Carolina Fernandes, 1982-
Caracterização de peptídeos ligantes a carcinomas papilíferos de tireoide / Carolina Fernandes Reis. --
Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador : Laura Sterian Ward.
Coorientador : Luiz Ricardo Goulart.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Neoplasias da glândula tireoide. 2. Queratinas. 3.
Biblioteca de peptídeos. 4. Marcadores biológicos. I.
Ward, Laura Sterian, 1956-. II. Goulart, Luiz Ricardo. III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Characterization of peptide binding papillary thyroid carcinoma

Palavras-chave em inglês:

Thyroid neoplasms

Keratins

Peptide library

Biological markers

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Laura Sterian Ward [Orientador]

Alfio José Tincani

Karina Marangoni

Sintia Silva de Almeida

Rita de Cássia Ferreira

Data de defesa: 07-10-2013

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

CAROLINA FERNANDES REIS

ORIENTADORA: PROF. DR. LAURA STERIAN WARD

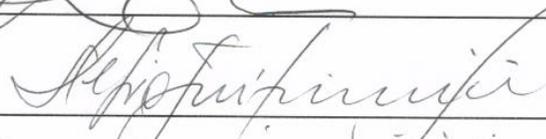
COORIENTADOR: PROF. DR. LUIZ RICARDO GOULART FILHO

MEMBROS:

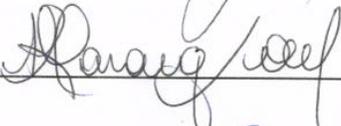
1. PROF. DR. LAURA STERIAN WARD



2. PROF. DR. ALFIO JOSE TINCANI



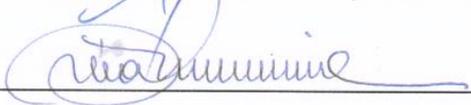
3. PROF. DR. KARINA MARANGONI



4. PROF. DR. SINTIA SILVA DE ALMEIDA



5. PROF. DR. RITA DE CÁSSIA FERREIRA



Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 07 de outubro de 2013

**Dedico a Deus,
por ter me dado a vida e as oportunidades
e a toda minha família,
pelo apoio e incessantes orações.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela proteção, companhia e por sempre enviar um anjo para cuidar de mim. Agradeço também aos Três Sagrados Corações de Jesus, Maria e José e a todos os Santos e Anjos, pela proteção e intercessão, em especial Santa Apolônia, Santa Filomena, Santa Luzia e Santa Gemma.

À FAPESP pela bolsa de doutorado e reserva técnica, obrigada por apoiar este projeto. Reconhecemos que o apoio da FAPESP foi essencial para a realização desta tese.

À minha orientadora Dra. Laura Sterian Ward, pela oportunidade de desenvolver esse trabalho e por confiar que eu seria capaz de desenvolvê-lo.

Ao meu co-orientador Dr. Luiz Ricardo Goulart, pelos conselhos, apoio e por disponibilizar seu laboratório e seus alunos para a realização desta tese.

Aos meus pais, Osvaldo e Silvana, por estarem sempre ao meu lado, pelo apoio e por acreditarem em mim.

Ao meu irmão Thiago, por estar sempre ao meu lado. À Mirella, por fazer parte deste momento.

À minha família, pelo companheirismo, carinho e dedicação, e em especial por todas as orações, sempre feitas com tanta fé; obrigada mamãe e tias Lúcia, Terezinha e Elaine.

Às minhas priminhas e priminhos, Marcela, Aline, Camila, Gabriela, Roberta, Renata e Luciano, por fazerem parte da minha vida e por estarem presentes em todos os momentos da minha vida. E também aos mais novos membros da família que fazem tudo ficar mais belo e alegre, agradeço aos pequeninos que fazem a vida valer a pena. Obrigada Rafael, Leonardo, Ana Karen, Daniel, Miguel e Henrique.

Ao meu avó José, pelo exemplo de vida perseverante e honesta.

Aos meus amigos, que com atenção e carinho fazem os meus dias serem muito melhores.

À minha amiga Patrícia Tiemi por estar sempre ao meu lado, nos momentos mais difíceis e nos melhores também. Obrigado em especial pela companhia nos EUA, por me permitir tornar-me sua irmãzinha, por todas as idéias que contribuíram para este trabalho e por toda a ajuda extra para a realização do mesmo.

Ao meu amigo Fausto, por cuidar de mim e da Paty como um verdadeiro irmão nos EUA. Sem você nós não teríamos conseguido! Valeu irmãozinho!

À Fernanda Bononi por nos acolher em sua casa e por fazer parte de nossas vidas, ganhamos uma amiga, quanto trabalho, viagens e horas de choros, piadas e risadas, você e a Bella foram muito importantes para o meu crescimento e amadurecimento. Sinto saudades!

Aos meus amigos e companheiros do Laboratório de Nanobiotecnologia: Luciana, Carlos Ueira, Carlos Trindade, Lara, Patrícia Terra, Fabiana, Galber, Juliana, Paula, Lea, João Paulo, Larissa, Emília, Bruna, Mayara, Cláudia, Thaise, Yara e Washington.

Ao Dr. Sindeval por cooperar com nosso trabalho, por ser uma pessoa agradabilíssima além de cirurgião fantástico!

Ao Dr. Fernando Soares pela doação das lâminas de *Tissue Micro Array*.

À Dra. Janete Cerruti pela doação das células NPA e TPC1.

À todos do GEMOCA (Laboratório de Genética Molecular do Câncer), que de alguma forma contribuíram para este trabalho. Em especial a Elaine Morari, Marjory, Natássia e Hέλvia.

“Amados filhos Meus, hoje, quando vós comemorais mais um mês da Minha presença Aqui no meio de vós, Eu venho mais uma dizer-vos: grande é o Amor de Deus por vós, esse Amor que vos escolheu, que vos elegeru, que vos amou e que vos trouxe até Aqui para que pudésseis ser convertidos, purificados, santificados e salvos pelo Amor Misericordioso do Senhor. Esse Amor que é tão grande, agora vem novamente aos vossos corações e unicamente vos pede o vosso Sim, o vosso coração, que vós o deixeis entrar nas vossas almas e habitar convosco.

O Senhor quer viver juntamente convosco, Ele quer ser o vosso Rei, o vosso Salvador, o vosso Amigo e o companheiro que em todos os momentos vive convosco e ao qual vós deveis orientar toda a vossa vida, todo o vosso agir, todo o vosso ser para glorificá-Lo, amá-Lo e adorá-Lo, pois para isto vós fostes criados, fostes tirados do nada, para amardes a Deus, glorificá-Lo, amá-Lo e serdes participantes de sua eterna glória e felicidade um dia no Céu...

... Aos Meus filhos que obedecem as Minhas Mensagens, Eu prometo socorrê-los com graças especiais, que não socorrerei aqueles que não obedecem as Minhas mensagens, prometo lhes dar uma proteção especial e, sobretudo a paz contínua do Meu Imaculado Coração....”

*Parte da mensagem de Nossa Senhora Rainha e Mensageira da Paz
em Jacaré-SP,
dia 07/09/2013.
www.apparitionstv.com*

RESUMO

A incidência do câncer de tireoide vem aumentando nas últimas décadas no Brasil, assim como em quase todos os países do mundo. Novos marcadores para uso no diagnóstico e prognóstico são essenciais para diminuir o número de cirurgias desnecessárias e melhorar a qualidade do tratamento dos pacientes, sendo que as técnicas utilizadas ainda não conseguiram obter marcadores de ampla utilidade. Os objetivos principais foram validar o peptídeo CaT12, um ligante de carcinoma papilífero de tireoide (CP) selecionado por *Phage Display* e avaliar em nódulos tireoidianos os possíveis alvos deste peptídeo. O CaT12 foi tumor específico quando testado em imunohistoquímica, foram usados um total de 775 tecidos de lesões não neoplásicas e neoplásicas (benignas e malignas), sendo 232 nódulos tireoidianos (15 sem neoplasia, 53 bóciós, 54 adenomas, 69 carcinomas papilíferos e 41 carcinomas foliculares). O peptídeo CaT12 foi eficiente para identificar carcinomas papilíferos com 91,2% de sensibilidade e 85,1% de especificidade; este peptídeo também ajuda caracterizar lesões foliculares distinguindo carcinomas papilíferos de variante folicular (CPVF) de adenomas com 91,9% de acurácia. Tecidos benignos (nevos atípicos e nevos comuns) e não neoplásicos (vários tecidos sem neoplasia tais como mama, próstata, rim, cérebro, tireoide e outros) apresentaram apenas 13,74% de positividade, enquanto os carcinomas de mama, próstata e rim apresentaram 53,96%, 70,18% e 74,29% de positividade para o CaT12 respectivamente. Após verificar a eficiência do marcador CaT12 investigamos os possíveis ligantes que foram identificados como sendo queratinas (KRT), a expressão gênica de algumas dessas queratinas foram analisadas em tecidos micro dissecados de 114 nódulos tireoidianos, sendo 12 tecidos sem neoplasia, 38 com doença benigna (24 bóciós e 14 adenomas) e 64 com carcinomas papilíferos (32 de variante folicular e 32 de variante clássica). As queratinas KRT5 ($P=0,0002$) e KRT14 ($P<0,0001$) estão mais expressas em pacientes com doença maligna, enquanto as queratinas KRT2 ($P<0,0001$), KRT6A ($P=0,0014$) e KRT10 ($P<0,0001$) foram expressas preferencialmente nos pacientes com doenças benignas. Ensaios de citotoxicidade e indução de inflamação avaliaram o possível uso não só como marcador, mas como carreador de drogas para uso terapêutico. O CaT12 não foi citotóxico para as células NPA e TPC1 (linhagens celulares de carcinoma papilífero de tireoide) e não demonstrou resposta imunológica quando testado em leucócitos de camundongos isogênicos. Visando futura aplicação deste peptídeo como carreador de drogas testamos a prostaglandina 15-dPGJ₂ que foi tóxica para as células TPC1 ($IC_{50}=9,3$ uM) e poderá ser utilizada conjugada ao CaT12 para entregar a droga apenas para as células cancerígenas. Outros peptídeos foram selecionados (CaT19, CaT42 e CaT66) para reconhecimento da superfície celular e poderão ser utilizados como marcadores auxiliares no diagnóstico durante a biópsia por agulha fina. Concluímos que o peptídeo CaT12 foi eficiente para distinguir malignidade em lesões tireoidianas, podendo ser usado para identificar carcinomas diferenciando as lesões malignas das benignas. O CaT12 também reconheceu malignidade em tumores de próstata, mama e rim. Além disso, foi demonstrado que a expressão gênica das queratinas são importantes na tumorigênese tireoidiana.

ABSTRACT

Incidence of thyroid cancer has increased in Brazil, as well as in almost countries of the world. New diagnostic and prognostic markers are essential to reduce numbers of unnecessary surgeries and improve the quality of patient's care. Unfortunately, recent markers used are not prove broad utility. Aim was validate CaT12 peptide selected by Phage Display as a marker to separate benign from malignant follicular lesions and evaluate in thyroid nodules possible targets for CaT12. The antibody-like peptide CaT12 was tumor-specific, which was further tested by immunohistochemistry against tissue comprised of 775 human benign and malignant tissues, including 232 thyroid nodular lesions: 15 normal thyroid tissues, 53 nodular goiters, 54 follicular adenomas; 69 papillary thyroid carcinomas (PTC); and 41 follicular carcinomas. CaT12 was able to identify PTC among thyroid nodular lesions with 91.2% sensitivity and 85.1% specificity; this peptide helped characterize follicular lesions distinguishing the follicular variant of PTC (FVPTC) from FA with 91.9% accuracy. Benign tissues (nevus atypical and nevus communes) and non neoplastic tissues (different human non neoplastic tissues) showed only 13.74% positivity, while breast, prostate and kidney carcinomas showed respectively, 53.96%, 70.18% e 74.29% CaT12 positivity. After verifying the efficiency of marker CaT12 we investigated the possible ligands that have been identified as keratins (KRT), the mRNA expression these keratins were analyzed in microdissected tissues of 114 thyroid nodules: 12 tissues without cancer, 38 with benign disease (24 goiters and 14 adenomas) and 64 with papillary carcinomas (32 follicular variant and 32 classic variant). The KRT5 (P = 0.0002) and KRT14 (P <0.0001) were most expressed in patients with malignant disease, while KRT2 (P <0.0001), KRT6A (P = 0.0014) and KRT10 (P <0.0001) were preferentially expressed in patients with benign diseases. Cytotoxicity and induction of inflammation assays evaluated the possible use as a biomarker and therapeutic by drug delivery. We showed CaT12 was not cytotoxic to NPA and TPC1 cells (papillary thyroid carcinoma cell lines) and no immune response demonstrated when tested in leukocytes of inbred mice. To future application of this peptide as a carrier of drugs we tested prostaglandin 15-dPGJ₂ in TPC1 cells and was toxic to the cells (IC₅₀ = 9.3 μM), this drug may be used conjugate with CaT12 for 15-dPGJ₂ to be delivered only to cancer cells. Other peptides were selected (CaT19, CaT42 and CaT66) for recognition of cell surface and can be used as markers auxiliary to fine needle biopsy or drug deliveries. In conclusion, our CaT12 peptide was highly effective and resulted in a useful antibody-like biomarker that recognizes malignancy among thyroid nodules and may help distinguish follicular patterned lesions. CaT12 also recognized malignancy in prostate, breast and kidney tumors. Furthermore, it was demonstrated that the gene expression of keratins are important in thyroid tumorigenesis.

LISTA DE ABREVIATURAS

15-d PGJ2- 15-deoxy- Δ (12,14)-prostaglandin J2

ACIS- Do inglês Automated Cellular Imaging System

BSA- (Bovine Serum Albumin), Soro Albumina Bovina

CEP/UFU- Cômite de Ética e Pesquisa da UFU

CEP/UNICAMP- Cômite de Ética e Pesquisa da UNICAMP

C-erbB2- Oncogene, receptor fator de crescimento epidermal humano 2

CF- Carcinomas foliculares

CK- Citoqueratina

CP- Carcinomas papilíferos de tireoide

CPC- Carcinoma papilífero clássico

CPVF- Carcinoma papilífero de variante folicular

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

DNA- Ácido desoxiribonucléico

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

EUA- Estados Unidos da América

FCM- Faculdade de Ciências Médicas

Gal-3 - Galectina 3

GAPDH- Gene constitutivo, Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

HBME-1- Do inglês Hctor Battifora Mesothelial cell, marcador de células mesoteliais

HC- Hospital das Clínicas

HRP- (Horse radish peroxidase), marcação com peroxidase

INCA- Instituto Nacional do Câncer

kDa- Quilodaltons

KRT- Queratina

LPS- Lipopolissacarídeo

MTT- Ensaio de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

NIS- Transportador de sódio e iodo

NPA- Linhagem celular de carcinoma papilífero de tireoide

OD- Densidade ótica

OPD- Orto-fenilenodiamina

pIII- Proteína três do capsídeo do fago

pVI- Proteína seis do capsídeo do fago

pVII- Proteína sete do capsídeo do fago

pVIII- Proteína oito do capsídeo do fago

pIX – Proteína nove do capsídeo do fago

PAAF- Punção aspirativa por agulha fina

PAGE- Eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS- Tampão fosfato salino

PCR- Reação em cadeia da polimerase

PDS- Proteína pendrina

pH- Potencial Hidrogeniônico

Ph.D.- 12- Biblioteca comercial de Phage Display de 12 aminoácidos lineares

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

PSA- Antígeno Prostático Específico

RE- Receptor de estrôgeno

RP- Receptor de progesterona

RPMI- Meio para cultura de células

SDS- Dodecil Sulfato de Sódio

T3- Triiodotironina

T4- Tetraiodotironina ou tiroxina

TG- Tireoglobulina

TMA- (Tissue Micro Array)

TPC1- Linhagem celular de carcinoma papilífero de tireóide

TPO- Tireoperoxidase

UFU- Universidade Federal de Uberlândia

UNICAMP- Universidade Estadual de Campinas

UNIFESP- Universidade Federal de São Paulo

UNIPROT- (Universal Protein Resource)

US- ultrassom

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1- Casuística de pacientes que compõem os TMAs utilizados.	36
Tabela 2- Identificação de pacientes utilizados para a composição de <i>pools</i> de proteínas, utilizados para ensaios de captura de proteínas.	37
Tabela 3- Casuística de pacientes com nódulos tireoidianos microdissecados utilizados na extração de RNA para realização de PCR em tempo Real.	38
Tabela 4- Sondas usadas para analisar a expressão gênica das queratinas e do constitutivo (GAPDH).	43
Tabela 5- Positividade do clone CaT12 em nódulos benignos (bócio e adenoma folicular) e malignos considerando a análise visual e ACIS.	48
Tabela 6- Parâmetros de diagnóstico para análise da imunohistoquímica do fago CaT12 e peptídeo CaT12 em nódulos benignos (bócio nodular e adenoma folicular) e malignos (carcinoma diferenciado de tireoide e subtipos histológicos).	49
Tabela 7- Valores diagnósticos do fago CaT12 e do peptídeo CaT12 para discriminar os diferentes subtipos histológicos na análise ACIS.	50
Tabela 8- Análise visual da positividade do peptídeo CaT12 na imunohistoquímica em diversos tecidos. *Tecidos sem neoplasia de vários órgãos humanos.	53
Tabela 9- Proteínas identificadas por sequenciamento após a imunoprecipitação.	54
Tabela 10- Resultado do sequenciamento das proteínas capturadas pelo peptídeo CaT12 ligado aos <i>beads</i> magnéticos. Nas colunas <i>Pool Câncer</i> e <i>Pool Bócio</i> (Pacientes utilizados demonstrados na Tabela 1) podemos observar a quantidade de peptídeos encontrados que tinham similaridade com a proteína descrita (incluindo as repetições do mesmo peptídeo).	54
Tabela 11- Testes diagnósticos comparando os grupos maligno (carcinomas papilíferos clássico e de variante folicular) e benigno (bócio e adenoma) na quantificação relativa das queratinas KRT5 e KRT14.	57

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1- Síntese de hormônios da tireoide. Fonte: Medical Physiology: A cellular and molecular approach, Elsevier/Saunders, pp. 1300. Boron e Boulpaep, 2003.	23
Figura 2- Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo, exceto pele não melanoma. Figura retirada e adaptada do site: http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/ .	24
Figura 3- Desenho representativo de um bacteriófago filamentosso demonstrando o DNA fita simples e as proteínas do capsídeo. Figura retirada do site: http://bioinfo2010.wordpress.com/2009/07/08/vector-bacteriophage-lambda-and-m13-7th-april/ .	26
Figura 4- Esquema ilustrativo do processo de seleção por <i>Phage Display</i> utilizado para encontrar os peptídeos testados no presente trabalho. Ph.D.-12= Biblioteca comercial de <i>Phage Display</i> apresentando 12 aminoácidos lineares na região da p3. Ph.D.-C7C= Biblioteca comercial de <i>Phage Display</i> apresentando 7 aminoácidos conformacionais na p3. Figuras geométricas (triângulo, círculo, cruz, quadrado) = fagos apresentando diferentes peptídeos. ER2738= cepa de <i>E. coli</i> utilizada para amplificar os fagos. CaT1 a CaT55= diferentes clones selecionados com a biblioteca Ph.D.-12. CaT56 a CaT105= diferentes clones selecionados com a biblioteca Ph.D.=C7C.	28
Figura 5- Expressão de queratinas em órgãos específicos usadas no diagnóstico de carcinomas. Esquema mostrando as principais queratinas utilizadas para o diagnóstico de tumores malignos em diferentes órgãos. K= queratina. Fonte: Modificada de Karantza, 2011.	31
Figura 6- Imunohistoquímica com CaT12 em tecidos tireoidianos. A- Câncer papilífero de tireoide: A1- Peptídeo CaT12; A2- Fago CaT12; A3- Fago selvagem. B- Bócio Nodular: B1- Peptídeo CaT12; B2- Fago CaT12; B3- Fago selvagem. (400x).	48
Figura 7- Imunohistoquímica com peptídeo CaT12 em diferentes tecidos. Positivos: A1-Rim; A2-Próstata; A3- Mama. Negativo: B1-Rim; B2-Próstata; B3- Mama. Tecidos não neoplásicos: Positivos: C1- Bexiga; C2- Epitélio respiratório; C3- Intestino delgado. Negativo: D1- Paratireoide; D2- Nevo; D3- Músculo.	52
Figura 8- Quantificação relativa das queratinas em nódulos tireoidianos benignos (bócio e adenoma) e malignos (carcinomas papilíferos clássico e de variante folicular). A- quantificação relativa das queratinas. P= Teste Mann-Whitney. B- Curva ROC KRT5. C- Curva ROC KRT14. D- Dupla positividade das queratinas	56

KRT5 e KRT14 de todos os pacientes analisados (malignos e benignos). **E-** Dupla positividade das queratinas KRT5 e KRT14 dos pacientes com carcinoma (carcinomas papilíferos clássico e de variante folicular).

Figura 9- Quantificação relativa das queratinas nos grupos bócio, adenoma, carcinoma papilífero clássico (CPC) e carcinoma papilífero de variante folicular (CPVF). **A-** KRT2. **B-** KRT5. **C-** KRT6A. **D-** KRT10. **E-** KRT14. ANOVA e Teste de Bonferroni significativo $p < 0.05$ *.

Figura 10- Teste de viabilidade celular (MTT) em linhagens celulares de carcinoma papilífero de tireoide (NPA e TPC-1) **A-** Porcentagem de viabilidade celular em células NPA e **B-**TPC-1. **C-** Sequências dos peptídeos.

Figura 11- Células totais de baço de camundongo estimuladas com o peptídeo CaT12 e LPS.

Figura 12- Teste da droga 15d-PGJ₂ em linhagem celular TPC1. **A-** Células TPC1 sem adição de droga. **B-** Células TPC1 com 10 uM de 15d-PGJ₂. **C-** Gráfico com resultado da viabilidade celular (%). **D-** Teste de apoptose. Vermelho= Controle (células sem tratamento). Marrom= Células tratadas com 9.3 uM (IC50) de droga.

Figura 13- ELISA em células NPA e TPC1. **A-** com sobrenadante de fagos CaT da biblioteca de Ph.D. 12. **B-** com sobrenadante de fagos CaT da biblioteca de Ph.D. C7C. **C-** com fagos CaT purificados.

SUMÁRIO

	Página
1- INTRODUÇÃO	21
1.1 Tireoide normal	22
1.2 Carcinoma de tireoide: Epidemiologia e Diagnóstico	24
1.3 Obtenção de peptídeos por <i>Phage Display</i>	26
1.4 Biomarcadores para o câncer	29
1.5 Uso de peptídeos como carreadores de droga	31
2- OBJETIVOS	33
3- MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Amostras biológicas	36
3.1.1 Lâminas de <i>Tissue Micro Array</i> (TMA)	36
3.1.2 Cultivo de linhagens celulares	36
3.1.3 Tecidos tumorais: Extração de proteínas e RNA	37
3.1.4 Extração de proteínas da linhagem TPC1	38
3.2 Amplificação do fago CaT12 e síntese do peptídeo CaT12	38
3.3 Imunohistoquímica	39
3.3.1 Reação de imunohistoquímica	39
3.3.2 Análise das lâminas de imunohistoquímica	40
3.4 Ensaio de captura com <i>Bead</i> estreptavidina (MagnaBind™ Streptavidin Beads) para identificação do ligante	41
3.4.1 Proteínas das células TPC1	41
3.4.2 Proteínas de pacientes	41

3.4.3 Identificação das proteínas eluídas por sequenciamento LC-MS/MS	42
3.5 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real: KRT2, KRT5, KRT6A, KRT10 e KRT14	42
3.6 Teste de citotoxicidade do peptídeo CaT12 em células TPC1 e NPA (Ensaio de MTT)	43
3.7 Estímulo de células do baço de camundongo com peptídeo CaT12	43
3.8 Teste de citotoxicidade com a droga 15d-PGJ ₂ (15-deoxy- Δ (12,14)-prostaglandin J ₂) em células TPC1	44
3.9 Seleção de clones para reconhecimento de membrana das células TPC1 e NPA	44
3.9.1- Amplificação dos fagos para ELISA (<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>)	44
3.9.2- ELISA de células inteiras	45
4- RESULTADOS	46
4.1 Validação do biomarcador CaT12: Imunohistoquímica com fago e peptídeo em tecidos tireoidianos	47
4.2 Validação da imunohistoquímica: Tecidos normais, benignos e malignos de vários tecidos humanos	50
4.3 Identificação das proteínas ligantes ao peptídeo CaT12	53
4.4 Expressão gênica das queratinas (KRT2, KRT5, KRT6A, KRT10 e KRT14) em tecidos tireoidianos neoplásicos	55
4.5 Testes preliminares para verificar possibilidade de uso terapêutico	59
4.5.1 Teste de citotoxicidade (MTT) do peptídeo CaT12	59
4.5.2 Estimulo de leucócitos de camundongo isogênico com o peptídeo CaT12	60
4.5.3 Teste dose resposta (IC ₅₀) utilizando a 15d-PGJ ₂ (15-deoxy- Δ (12,14)-prostaglandin J ₂) em células TPC1	61
4.6 Peptídeos ligantes de superfície celular	62
5- DISCUSSÃO	65

6- CONCLUSÃO	71
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	72
ANEXO I: Aprovação do Comitê de Ética	80
ANEXO II: Patente	83
ANEXO III: Artigo publicado na revista <i>Cancer Letters</i>	85

INTRODUÇÃO

1- Introdução

1.1- Tireoide Normal

A tireoide é um dos maiores órgãos endócrinos e no homem adulto pesa entre 15 a 25 gramas; cada lobo mede de 2 a 2,5 cm de largura e de 3 a 5 cm de comprimento (1). É o primeiro órgão endócrino a se desenvolver no embrião humano: começa a surgir por volta do 24º dia após a fertilização, com onze semanas começa a aparecer colóide nos folículos tireoidianos sendo demonstradas concentrações de iodo e síntese de hormônios tireoidianos (2). Foi descrita por Wharton em 1656, recebendo essa denominação em função de sua localização junto à cartilagem tireoide, sua importância biológica foi percebida no início do século XX pelo cirurgião Emil Kocher, vencedor do prêmio nobel em 1909, que observou que a remoção desta glândula levava a um grave comprometimento do estado geral do organismo (3).

A tireoide é formada por dois lobos lateralizados, direito e esquerdo unidos por um istmo de parênquima glandular e apoiada sobre a traquéia anterior, os lobos laterais estão cobertos pelos músculos esterno-hióide e esternotireoide, é uma glândula muito vascularizada o que confere uma coloração avermelhada (1). Cada lobo possui numerosos folículos, que são as unidades estruturais e funcionais da glândula, essas unidades são revestidas por epitélio cúbico simples e interior preenchido pelo colóide, sendo a tireoglobulina (TG) a principal componente. A tireoglobulina é uma glicoproteína iodada sintetizada exclusivamente na célula tireoideana, com alto peso molecular (660 kDa) constituída de duas subunidades (3, 4). O epitélio folicular também contém aproximadamente 10% de células parafoliculares ou células C dispersas, estas produzem o hormônio calcitonina (4).

A partir da TG são produzidos os hormônios T3 (triiodotironina) e T4 (tiroxina), estes agem por meio de receptores nucleares e estimulam o metabolismo energético, especialmente no fígado e nos músculos (5). A TG é produzida no retículo endoplasmático e é secretada por exocitose para o lúmen do folículo (Figura 1). O iodeto inorgânico é captado pelo canal Na/I ou proteína NIS que apresenta 13 domínios transmembrana, promovendo a entrada de iodeto extracelular na célula folicular, esse iodeto se difunde para o coloide transportado pela proteína pendrina (PDS), no lúmen o iodeto é oxidado pela tireoperoxidase (TPO) e é incorporado aos resíduos de tirosina da molécula de TG. Em condições fisiológicas normais a reabsorção do

colóide ocorre por micropinocitose e formação de vesículas endocíticas; no interior da célula folicular a TG é hidrolisada e libera T3 e T4, que saem da célula por difusão simples e entram na corrente sanguínea (Figura 1) (1, 6).

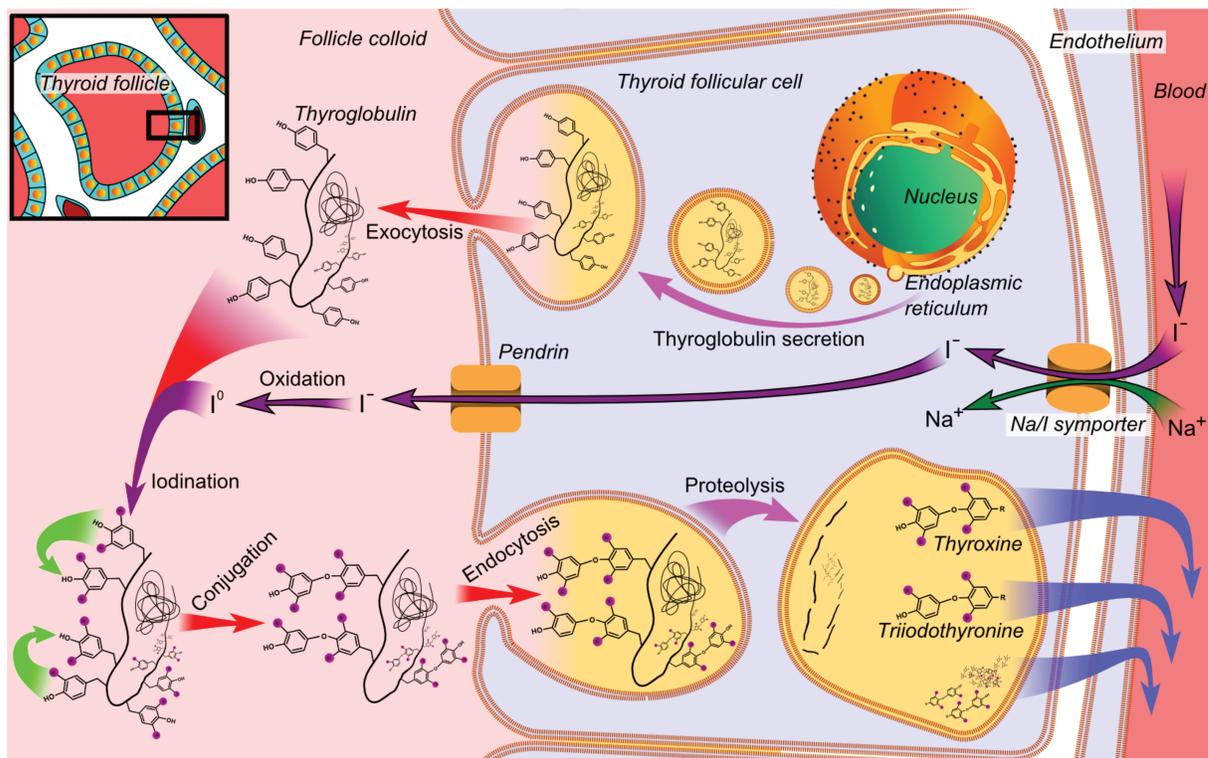


Figura 1- Síntese de hormônios da tireoide. Fonte: Medical Physiology: A cellular and molecular approach, Elsevier/Saunders, pp. 1300. Boron e Boulpaep, 2003 (6).

Esses hormônios (T3 e T4) depois de entrarem na corrente sanguínea irão agir em vários órgãos diferentes e atuar no metabolismo dos processos biológicos, são também fundamentais para o desenvolvimento. O hormônio tireoideano age por meio de ligação a receptores nucleares, denominados elementos responsivos ao hormônio tireoideano, podendo aumentar ou reprimir a transcrição gênica específica. Também exerce ações de estímulo da diferenciação e proliferação celulares, desempenhando provável papel na transformação neoplásica induzida por radiação ou substâncias carcinogênicas (3).

1.2- Carcinoma de Tireoide: Epidemiologia e Diagnóstico

O carcinoma de tireoide é o quarto mais comum em mulheres, sendo precedido pelo carcinoma de mama, colo do útero e cólon (7) (Figura 2). O câncer de tireoide pode originar-se das células tireoideanas foliculares (CP- carcinoma papilífero ou CF- carcinoma folicular) ou das células parafoliculares (carcinoma medular) (8). Os carcinomas que se originam de células foliculares são os mais comuns, compreendendo aproximadamente 90-95% do total dos carcinomas de tireoide.

Localização primária	casos novos	percentual			Localização primária	casos novos	percentual
			Homens	Mulheres	Mama Feminina	52.680	27,9%
Próstata	60.180	30,8%			Colo do Útero	17.540	9,3%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%			Cólon e Reto	15.960	8,4%
Cólon e Reto	14.180	7,3%			Glândula Tireoide	10.590	5,6%
Estômago	12.670	6,5%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.110	5,3%
Cavidade Oral	9.990	5,1%			Estômago	7.420	3,9%
Esôfago	7.770	4,0%			Ovário	6.190	3,3%
Bexiga	6.210	3,2%			Corpo do Útero	4.520	2,4%
Laringe	6.110	3,1%			Sistema Nervoso Central	4.450	2,4%
Linfoma não Hodgkin	5.190	2,7%			Linfoma não Hodgkin	4.450	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%					

Figura 2- Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo, exceto pele não melanoma. Fonte: Modificada de <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/> (7).

O CP representa o subtipo histológico mais freqüente (75-80%), seguido pelo CF (15%) e ambos são referidos como carcinomas diferenciados (9, 10). Os CP englobam um subgrupo com as formas variantes, correspondendo a 15 a 20% dos CP. Este subgrupo é composto pelos tumores mistos (papilífero associado a folicular) e pelas variantes folicular, esclerosante difusa, de células altas, de células colunares e encapsulada. A forma típica apresenta usualmente um bom prognóstico, com uma taxa de mortalidade inferior a 10% e uma taxa de sobrevida em 20 anos de 95%. Já as variantes esclerosante difusa, de células altas, de células colunares apresentam um

prognóstico mais reservado. No curso da doença, os CP apresentam recorrências locais em 5-20% dos casos e em 2/3 dos casos ocorre invasão de vasos linfáticos e da cadeia ganglionar ipsilateral com disseminação linfática. Metástases à distância ocorrem somente em 5 a 10% dos casos (11, 12).

Os CF têm incidência maior nas áreas iododeficientes, são considerados mais agressivos que os CP, no entanto, ambos apresentam prognóstico semelhante quando comparados com a idade e o estadio tumoral. Eles podem ser classificados como minimamente invasivo (encapsulado) ou muito invasivo, que modifica bastante o prognóstico. O tumor minimamente invasivo é definido como maligno, devido à invasão vascular e de toda espessura da cápsula. Pela citologia este tumor pode não ser distinguido de lesões benignas (13).

Os CF invadem vasos sanguíneos e raramente vasos linfáticos (10%). A disseminação é hematogênica, acarretando muito mais metástases à distância, sobretudo para pulmão, ossos e menos comumente para cérebro e fígado (14).

Os CF apresentam as variantes de células de Hürthle (células oxifílicas), de células claras e o carcinoma insular. Os CF apresentam sobrevida em torno de 70 a 80%. Já o carcinoma insular e a variante de células de Hürthle apresentam prognóstico menos favorável. Os carcinomas anaplásicos são indiferenciados, têm o pior prognóstico e incidem em menos de 1% dos casos. Os carcinomas medulares se originam a partir das células parafoliculares (células C) e apresentam incidência em torno de 5% do total dos tumores tireoidianos malignos (10). Por fim o linfoma tireoidiano, que é uma condição ainda mais rara, representa menos de 1% da casuística (15).

O exame de ultrassom (US) é muito empregado no diagnóstico dos nódulos tireoidianos benignos e malignos e das metástases cervicais. Muitas vezes o nódulo é descoberto a partir de um US de rotina. No entanto, seus achados são muito inespecíficos para caracterização do nódulo, quanto à sua natureza necessitando de confirmação citológica ou histológica (16). A aspiração por agulha fina (PAAF) é a forma mais acessível, do ponto de vista custo-efetividade, para distinguir lesões benignas de malignas, mas em alguns casos a punção não é conclusiva. Por exemplo, em 2010 Jo et al. (17) investigaram 3.080 casos de PAAF, 7% foram conclusivas para malignidade e 59% benignas, totalizando 66%. Os outros 34% foram de resultados inconclusivos, ou seja, lesões foliculares atípicas de significado indeterminado, suspeita de neoplasia ou suspeita de malignidade. Em 2011 Piana et al. (18) investigaram 18.359 PAAF e concluíram que 12,1% não foram diagnosticados e 7,9% foram indeterminados, totalizando 20%. Com base nestes dois

estudos podemos concluir que aproximadamente 20% dos casos não poderão ser diagnosticados com base na citologia, dependendo assim de tireoidectomia para a realização da biópsia conclusiva, portanto, é necessário o desenvolvimento de novos biomarcadores para auxiliar o diagnóstico do carcinoma de tireoide previamente à cirurgia. Muitas tecnologias têm sido usadas para a descoberta de novos marcadores tumorais, tais como hibridoma, SAGE, SELEX e *Phage Display*, essa última foi utilizada no presente trabalho.

1.3- Obtenção dos peptídeos por *Phage display*

Bacteriófagos ou fagos são vírus que infectam apenas bactérias, a partícula de fago M13 é formada por uma fita simples de DNA envolta por uma capa protéica constituída por cinco proteínas (p3, p6, p7, p8 e p9) (19) (Figura 3). Nas bibliotecas utilizadas no presente trabalho os peptídeos de 12 (Ph.D.-12) ou 7 (Ph.D.-C7C) aminoácidos foram apresentados na proteína 3 (p3).

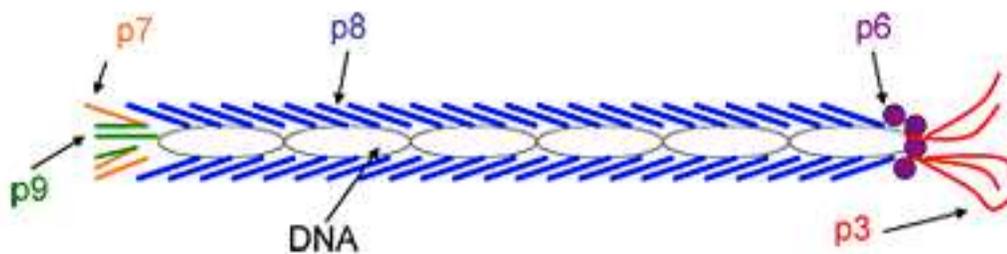


Figura 3- Desenho representativo de um bacteriófago filamentosso demonstrando o DNA fita simples e as proteínas do capsídeo. Figura retirada do site: [http://bioinfo2010.wordpress.com/2009/07/08/vector-bacteriophage-lambda-and-m13-7th-april/\(20\)](http://bioinfo2010.wordpress.com/2009/07/08/vector-bacteriophage-lambda-and-m13-7th-april/(20)).

Bibliotecas de peptídeos randômicos apresentados por fagos compreendem um vasto número (10^7 a 10^9) de peptídeos de um dado tamanho, onde suas seqüências são geradas aleatoriamente por uma variedade de resíduos de aminoácidos em cada posição. Os peptídeos expressos, em forma linear ou conformacional, são capazes de mimetizar estruturas conformacionais e epítomos contínuos ou descontínuos. A construção dessas bibliotecas é feita principalmente pela inserção de oligonuclotídeos degenerados, sintetizados quimicamente, no gene que codifica a proteína do capsídeo (21-23).

Essas bibliotecas podem ser adquiridas comercialmente o que garante a melhor manutenção da variabilidade. As bibliotecas de peptídeos comerciais de 7 e 12-mer apresentam uma complexidade de 2 bilhões de clones independentes, que contêm muitas se não todas as $1,28 \times 10^9$ possíveis sequências heptapeptídicas nas bibliotecas de 7-mer e C7C-mer e $4,1 \times 10^{11}$ sequências possíveis nas bibliotecas 12-mer (24).

Na seleção dos peptídeos ligantes à células de carcinoma papilífero de tireoide (linhagem celular NPA) foram utilizadas duas bibliotecas comerciais Ph.D.-12 e Ph.D.-C7C. O processo de seleção foi adaptado de Giordano et al. (25) e ocorreu conforme o esquema apresentado na Figura 4. Após a seleção e sequenciamento do DNA dos fagos estes foram testados e baseados em ensaios de *pre-screening* anteriormente realizados por meio da tecnologia de *Phage Display* (26, 27) o clone CaT12 demonstrou melhores resultados e por isso foi avaliado no presente trabalho.

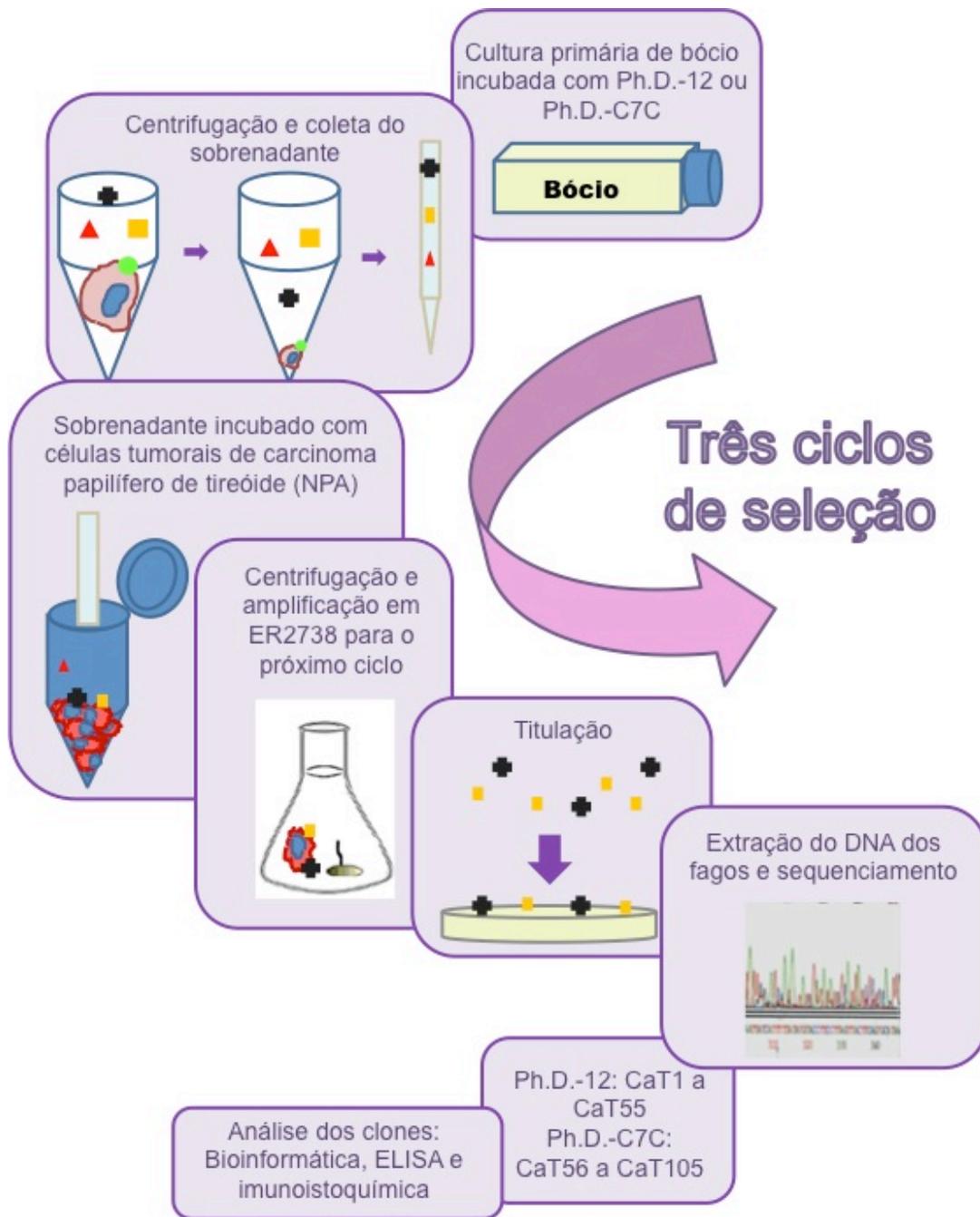


Figura 4- Esquema ilustrativo do processo de seleção por *Phage Display* utilizado para encontrar os peptídeos testados no presente trabalho. Ph.D.-12= Biblioteca comercial de *Phage Display* apresentando 12 aminoácidos lineares na região da p3. Ph.D.-C7C= Biblioteca comercial de *Phage Display* apresentando 7 aminoácidos conformacionais na p3. Figuras geométricas (triângulo, círculo, cruz, quadrado) = fagos apresentando diferentes peptídeos. ER2738= cepa de *E. coli* utilizada para amplificar os fagos. CaT1 a CaT55= diferentes clones selecionados com a biblioteca Ph.D.-12. CaT56 a CaT105= diferentes clones selecionados com a biblioteca Ph.D.=C7C.

1.4- Biomarcadores para o câncer

Muitos biomarcadores têm sido usados para ajudar no diagnóstico e prognóstico de diversos tipos de câncer, tais como o PSA, RE, RP, c-erbB-2, tireoglobulina e diversas citoqueratinas, por exemplo as CK7 e CK20. Para o câncer de os biomarcadores que até à data parecem produzir o maior sensibilidade e especificidade incluem HBME-1, CK19, Gal-3 e c-met proto-oncogene (28).

Em carcinomas em especial, as citoqueratinas têm um papel fundamnetal. As células epiteliais possuem três tipos principais de filamentos do citoesqueleto, são eles: microfilamentos, filamentos intermediários e microtúbulos (29). As citoqueratinas (KRT) são proteínas que fazem parte do filamento intermédiano do citoesqueleto e estão expressas de acordo com o tipo e com o grau de diferenciação celular dos epitélios (30). Essas proteínas primeiramente foram divididas em dois grandes subgrupos: queratinas do tipo I (ou ácidas) numeradas de 9 a 19 e do tipo II (básicas), numeradas de 1 a 8; outras queratinas foram sendo identificadas (31, 32), incluindo queratinas específicas de folículo (33). Depois de 30 anos de caracterização das queratinas são conhecidas 54, incluindo 28 do tipo I e 26 do tipo II (29).

Como parte do citoesqueleto, as queratinas fornecem estabilidade mecânica e integridade das células epiteliais e dos tecidos, essas proteínas funcionam como "andaimes" supra celulares capazes de ligar as aderências desmossomais célula a célula; além disso, as queratinas são responsáveis por proteger as células epiteliais contra o estresse mecânico e agem como plataformas de sinalização. Apesar do pouco conhecimento a respeito, alguns estudos têm demonstrado que queratinas distintas emergem como suportes altamente dinâmicos, em diferentes contextos, contribuindo para determinar o tamanho da célula, o controle na tradução, na proliferação e no transporte de organela tipo célula específica, e algumas queratinas estão envolvidas na transformação celular maligna em resposta a diversos estresses (34-36).

Queratinas funcionam como plataformas de sinalização devido sua interação com moléculas específicas e principalmente porque a expressão das queratinas mudam rapidamente durante a diferenciação, como por exemplo em injúria tecidual e metástase quando as células da camada basal da epiderme expressam KRT10, a expressão de KRT1/KRT10 impede a morte celular permitindo a diferenciação celular (37, 38).

Células epiteliais adultas são capazes de expressar mais de 10 tipos de diferentes

queratinas (39), mas os pares de queratinas são expressadas em tecidos específicos. Normalmente, células basais expressam as queratinas 5 e 14, epitélios estratificados em condições de hiperproliferação expressam as queratinas 6 e 16 e as queratinas 1 e 10 em diferenciação celular (35).

Devido ao perfil de expressão das queratinas nos diferentes tecidos epiteliais e a manutenção do perfil de expressão em determinados tumores, estas têm sido amplamente utilizadas para discriminar patologicamente os tumores em diagnósticos imunohistoquímicos, para selecionar o tratamento apropriado e até mesmo para descobrir a origem da metástase (29, 30).

Muitos adenocarcinomas expressam KRT8, KRT18 e KRT19, mas a expressão de KRT7 e KRT20 é variável, por exemplo em adenocarcinomas de cólon e reto mais avançados (30, 40) são expressas as queratinas KRT7 e KRT20, nos carcinomas de pâncreas, trato biliar, esôfago e estômago expressam KRT7 e mais de 65% expressam KRT20 (41), mas os adenocarcinomas de ovário, endométrio e pulmão são negativos para KRT20 (30), já os adenocarcinomas de próstata e fígado são negativos para ambas (42). Na Figura 5, estão apresentadas as principais queratinas utilizadas no diagnóstico de diferentes tumores malignos.

No câncer de tireoide a expressão de algumas queratinas já foram investigadas, Weber et al. (43), encontraram a citoqueratina 20 expressa no tecido dos carcinomas e o teste foi negativo para os nódulos benignos, também encontraram a KRT20 expressa no sangue periférico (43). Quase todos os tumores de tireoide (papilífero, folicular e subtipos do medular) e dois terços dos mesoteliomas malignos são positivos para KRT7 e negativos para KRT20 (44). A queratina 19 também consegue distinguir carcinomas papilíferos de adenomas e carcinomas foliculares (45). O uso combinado de KRT19, Gal-3 e HBME-1 têm valor diagnóstico prático na distinção de nódulos malignos de benignos (46-49). Mas, outros estudos devem ser feitos para analisar a expressão destas queratinas no câncer de tireoide, visto que estão sendo relacionadas a malignidade de outros tumores como adenocarcinoma de próstata (50), carcinoma oral (51), esôfago (52) e mama (53, 54).

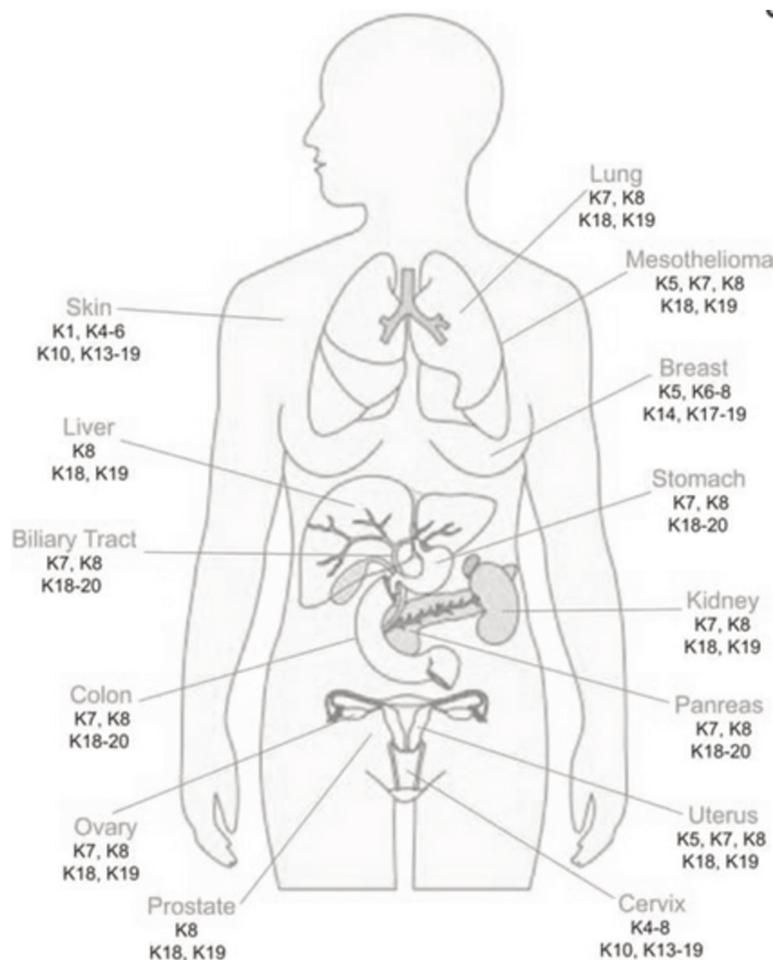


Figura 5- Expressão de queratinas em órgãos específicos usadas no diagnóstico de carcinomas. Esquema mostrando as principais queratinas utilizadas para o diagnóstico de tumores malignos em diferentes órgãos. K= queratina. Fonte: Modificada de Karantza, 2011; (29).

1.5- Uso de peptídeos como carreadores de drogas

Novos sistemas de entrega de drogas têm sido desenvolvidos para que a ação do medicamento seja mais específica, diminuindo os efeitos colaterais e potencializando a ação do princípio ativo. No tratamento dos cânceres isso seria ideal para que os tecidos saudáveis não tenham danos. Os tratamentos envolvendo os sistemas entregadores de drogas podem ser divididos em duas categorias: passivo e ativo. No tratamento passivo o agente terapêutico é incorporado dentro de uma macromolécula ou nanopartícula (podendo receber também o nome de nanocápsulas), que circulam na corrente sanguínea e são acumuladas dentro do tumor (55).

Para que as nanopartículas possam circular tempo suficiente dentro do organismo elas não

podem ser reconhecidas pelo sistema imunológico. Uma das técnicas mais utilizadas para aumentar o tempo de circulação no corpo é cobrir a nanopartícula com polietilenoglicol. Catéteres podem ser utilizados para injetar as nanopartículas com o agente terapêutico diretamente no tumor. No tratamento ativo, o agente terapêutico é conjugado com uma nanopartícula que possui um ligante (anticorpo) que reconhece especificamente os antígenos relacionados às células do câncer (56, 57).

Vários tipos de nanopartículas têm sido utilizados no diagnóstico e na terapia do câncer, como por exemplo, as inorgânicas (nanopartículas de ouro, nanopartículas magnéticas), poliméricas (micelas, quitosana), lipídicas sólidas, lipossomas, nanotubos de carbono, pontos quânticos, assim como os conjugados envolvendo essas nanopartículas (58).

Napimoga et al. desenvolveram uma nanocápsula contendo 15d-PGJ₂ em uma nova formulação conjugada com um polímero, essas nanocápsulas potencializaram a ação da droga produzindo maior efeito anti-inflamatório (59, 60).

Várias nanopartículas têm sido desenvolvidas para o tratamento de câncer, algumas utilizando anticorpos ou peptídeos para auxiliar na entrega específica do fármaco (61-67).

OBJETIVOS

2- Objetivos

2.1- Objetivos Gerais

Validar o peptídeo selecionado por *Phage Display* CaT12, ligante de carcinoma papilífero de tireoide e avaliar em nódulos tireoidianos os possíveis alvos deste peptídeo.

2.2- Objetivos Específicos

- Investigar qual(is) a(s) proteína(s) são reconhecida(s) pelo peptídeo CaT12.
- Verificar os níveis de transcrição dos genes que expressam as proteínas ligantes ao CaT12 por tempo real.
- Testar a citotoxicidade do peptídeo CaT12 (Ensaio de MTT).
- Promover o estímulo de células totais do baço de camundongos com o peptídeo CaT12.
- Testar a citotoxicidade da droga 15d-PGJ₂ em células da linhagem TPC1.
- Escolher outros clones reativos com membrana celular para uso em diagnóstico.

MATERIAL E MÉTODOS

3- Material e métodos

3.1- Amostras biológicas

3.1.1- Lâminas de *Tissue Micro Array* (TMA)

As lâminas de TMA foram doadas pelo Hospital A.C. Camargo depois que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética deste hospital e da Universidade Federal de Uberlândia (ANEXO I). Foram utilizadas 7 tipos de lâminas de TMA (Tabela 1) com os seguintes tecidos: carcinomas (tireoide, próstata, mama e rim), benignas (nevos atípicos e comum) e tecidos não neoplásicos.

Tabela 1- Casuística de pacientes que compõem os TMAs utilizados.

Número das lâminas de TMA	Conteúdo das lâminas	Número de pacientes
1	Nódulos tireoidianos	Normal - 15 Bócio- 53 Adenoma folicular- 54 Carcinoma papilífero- 69 Carcinoma folicular 41
2	Adenocarcinoma de próstata	57
3	Carcinoma de mama	53
4	Carcinoma de mama	136
5	Carcinoma de rim	35
6	Nevos comuns e atípicos	Comuns- 29 Atípicos- 12
7	Tecidos não neoplásico	Total de 206 tecidos sem neoplasia, sendo 5 amostras de cada tecido humano.

3.1.2- Cultivo de linhagens celulares

As linhagens celulares de carcinoma papilífero de tireoide (TPC1 e NPA) foram doadas pela professora Dra. Janete Cerutti da UNIFESP, ambas foram cultivadas em RPMI complementado com 10 % de soro fetal bovino.

3.1.3- Tecidos tumorais: Extração de proteínas e RNA

Os tecidos tumorais também foram coletados no Hospital A.C. Camargo e as extrações de proteína (Tabela 2) e RNA (Tabela 3) foram realizadas no Laboratório de Macromoléculas do mesmo, onde todos os casos foram revisados e microdissecados antes de serem separados para as extrações.

Tabela 2- Identificação de pacientes utilizados para a composição de *pools* de proteínas, utilizados para ensaios de captura de proteínas.

	Paciente	Diagnóstico
Pool Bócio Colóide	124	Bócio colóide
	125	Bócio colóide
	126	Bócio colóide
	127	Bócio colóide
	128	Bócio colóide
Pool Câncer papilífero	96	Carcinoma papilífero variante folicular
	101	Carcinoma papilífero clássico
	106	Carcinoma papilífero variante folicular
	108	Carcinoma papilífero variante folicular
	113	Carcinoma papilífero variante folicular

A extração das proteínas foi feita utilizando o kit ProteoJet Membran Protein Extraction (Fermentas). As proteínas extraídas foram quantificadas pelo método Bradford (Kit Biorad). Após isso foi feito um gel de SDS-PAGE poliacrilamida 12% para observar a qualidade das proteínas.

Para a extração de RNA foi utilizado o kit RNeasy (Qiagen, USA). Após a extração o RNA foi quantificado por Nanodrop.

Tabela 3- Casuística de pacientes com nódulos tireoidianos microdissecados utilizados na extração de RNA para realização de PCR em tempo Real.

Tipo de tecido	Tipo de carcinoma e número de pacientes	Total
Malignos	Carcinoma papilífero clássico- 32 Carcinoma papilífero de variante folicular- 32	64
Benignos	Bócio- 24 Adenoma- 14	38
Não neoplásico	12	12

3.1.4- Extração de proteínas da linhagem celular TPC1

As proteínas das células (TPC1) foram extraídas com o tampão TNN (100 mM TRIS-HCl pH8, 250 mM NaCl, 0,5% triton com adição de inibidores de protease imediatamente antes do uso), as células foram incubadas no tampão por 30 minutos no gelo e em seguida centrifugadas a 15500 g por 15 minutos, depois o sobrenadante foi coletado.

Em seguida as proteínas foram quantificadas pelo método Bradford (Kit Biorad). Após isso foi feito um gel de SDS-PAGE poliacrilamida 12% para observar a qualidade das proteínas.

3.2- Amplificação do fago CaT12 e síntese do peptídeo CaT12

O fago CaT12 foi amplificado em meio LB (0,2g LB + 20 mL de água destilada e posterior esterilização) com tetraciclina contendo uma colônia (isolada) de *Escherichia coli* linhagem ER2738 que havia sido previamente crescida sob agitação a 37°C até a fase *early-log* (OD₆₀₀ ~ 0,3). O *backup* contendo o fago CaT12 foi incubado com o meio a 37°C por 4-5 horas sob forte agitação. A cultura foi submetida à centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C e recentrifugada para total separação das bactérias. Logo após, 80% do sobrenadante foi transferido para um tubo esterilizado e adicionou-se 1/6 do volume de PEG/NaCl (20% de Polietilenoglicol 8000 e 2,5 M de NaCl – solução estéril). Essa mistura foi incubada por 12-16 horas a 4°C, decorrida a precipitação, centrifugou-se a solução a 10000 rpm por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e recentrifugado, brevemente, outra vez para remoção de sobrenadante residual. O precipitado foi suspenso em 1 mL de PBS 1X e precipitou-se

novamente com 1/6 do volume de PEG/NaCl incubando em gelo por uma hora. Centrifugou-se a solução por 10 minutos a 14000 rpm à 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 200 µL PBS, obtendo-se então o CaT12 amplificado, que foi utilizado para a realização da imunohistoquímica.

A síntese do peptídeo CaT12 biotilado foi realizada pela empresa Invitrogen™ (Carlsbad, California).

3.3- Imunohistoquímica

3.3.1- Reação de imunohistoquímica

Os cortes foram desparafinados em banho de xilol a 110°C e, a seguir, banhos subsequentes em xilol à temperatura ambiente. Logo após este processo, as lâminas foram hidratadas em álcool etílico nas concentrações decrescentes de 100%, 80%, 50% e lavadas por 5 minutos em água corrente e destilada.

A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com três banhos de água oxigenada a 10 volumes cada um, com duração de cinco minutos, seguidas de lavagens em água corrente e destilada.

Para a recuperação antigênica foi utilizada panela a vapor, as lâminas foram imersas em tampão citrato de sódio (10mM, pH 6,0) à 95°C durante 35 minutos. Após esfriarem, lavou-se por 5 minutos em água corrente e destilada.

Para as lâminas usadas na marcação com o peptídeo sintético foi acrescentado o bloqueio da avidina e biotina, utilizando um kit (Dako) 3 gotas de avidina por corte por 10 minutos a temperatura ambiente, uma lavagem com PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 12 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, pH 7.4) 5 minutos e 3 gotas de biotina por corte 10 minutos seguida de lavagem com PBS, as lâminas com o fago não passaram por este bloqueio.

Bloqueou-se por 30 minutos à temperatura ambiente com leite em pó 3% (Molico desnatado com cálcio) diluído em água destilada. Depois o excesso do leite foi retirado com água destilada e as lâminas foram colocadas em PBS.

Após esta etapa, os cortes foram incubados em câmara úmida com o fago CaT12 (6×10^{11}) ou peptídeo biotilado (10 μg) diluídos em tampão (Novocastra IHC Diluent) por 30 minutos à 37°C e posteriormente 4°C *overnight*.

No dia seguinte, as lâminas foram lavadas por quatro vezes em PBS por cinco minutos cada vez, e posteriormente incubadas por uma hora a 37°C com anti-M13 (fago) ou estreptavidina (peptídeo) marcados com HRP 1:650.

Depois de três lavagens em PBS, a revelação foi feita com DAB líquido (3-3' – diaminobenzidine tetrahydrochloride, Dako) durante cinco minutos a temperatura ambiente.

Após a revelação, as lâminas foram lavadas em água corrente e contra coradas com hematoxilina de Mayer durante 30 segundos. Os cortes foram desidratados em banhos de álcool etílico em concentrações crescentes e diafanizadas em três banhos de xilol, e a seguir foram montadas com lamínulas e resina *Entellan*.

3.3.2- Análise das lâminas de imunohistoquímica

As lâminas foram analisadas por dois métodos diferentes que nomeamos de Visual (escore dado baseado na observação do patologista) e ACIS (quantificação do equipamento). Para a análise visual consideramos a soma da intensidade (0=negativo, 1=positivo fraco, 2=positivo moderado e 3=positivo forte) e da porcentagem das células coradas (0=nenhuma célula corada, 1=<25% das células coradas, 2= entre 25% e 50% das células coradas, 3= entre 50% e 75% das células coradas e 4= entre 75% e 100% das células coradas), sendo o maior escore possível =7 e considerado positivo valores maiores ou iguais a 5. As lâminas também foram quantificadas pelo equipamento ACIS-III (Automated Cellular Imaging System; Chroma Vision Medical Systems, Inc, DAKO, San Juan Capistrano, CA, USA) de acordo com a intensidade e ambos os valores foram analisados no programa GraphPad Prism 5.0.

Foram calculadas as porcentagens de positividade dos escores visual e ACIS e as diferenças de reatividade entre os tecidos benignos e malignos de ambos os biomarcadores (fago CaT12 e peptídeo CaT12), foi utilizado Teste de Mann-Whitney (variáveis contínuas e análises não paramétricas). Curvas ROC (Receiver operating characteristics) foram construídas para avaliar sensibilidade, especificidade, acurácia e áreas sob a curva (AUCs) com 95% de intervalo de confiança (CI).

Na análise visual e ACIS, foi utilizado o teste de Fisher para determinar a relação entre fago CaT12 ou peptídeo sintético para os diferentes grupos de doenças. Foram usados os parâmetros de sensibilidade e especificidade do Teste de Fisher para determinar os valores de *cut-off* na análise da curva ROC. Probabilidades abaixo de 0,05 foram consideradas significativas.

Para as lâminas de outros tipos de tecidos (tecidos normais, neoplasias benignas e malignas) foram feitas apenas a análise visual e porcentagem de positividade.

3.4- Ensaio de captura com *Bead* estreptavidina (*MagnaBind™ Streptavidin Beads*) para identificação do ligante

3.4.1- Proteínas das células TPC1

Para identificar o ligante do peptídeo CaT12 foi feita a captura das proteínas com *beads* magnéticos conjugados com estreptavidina, como o peptídeo sintético tinha em sua composição biotina, essa biotina se liga a estreptavidina do *bead* e o peptídeo por sua vez captura as proteínas alvo.

Neste ensaio foram utilizados 200 µL de *bead*, que foram lavados com TBS (Tampão Tris salino) por três vezes. Em seguida foram incubados com 150 µg de peptídeo sintético biotinilado CaT12 por 1 hora a 4°C. Depois foram adicionadas as proteínas extraídas das células TPC1 (500 µg) por 4 horas a temperatura ambiente. Após esses procedimentos os *beads* foram lavados com TBS por quatro vezes e eluídos com tampão glicina pH=2,2 por duas vezes de 10 minutos cada.

3.4.2- Proteínas de pacientes

Para esse ensaio foi usado 100 µL de *bead* em duplicata (Pool Câncer/Pool Bócio- Tabela 2), que foram lavados com PBS por 3 vezes. Em seguida os *beads* foram incubados com 150 µg de peptídeo sintético CaT12 por 1 hora à 4°C. Após esta etapa foram adicionadas as proteínas de tumores de pacientes (Tabela 2- 500 µg) por 4 horas a 4°C. Após esses procedimentos os *beads* foram lavados com PBS por 3 vezes e eluídos (por duas vezes) com 100 µL de tampão glicina 0,1 M pH=3,0 por 10 minutos.

3.4.3- Identificação das proteínas eluídas por sequenciamento LC- MS/MS

As proteínas eluídas foram precipitadas usando o Kit ProteoExtract (Calbiochem) e o *pellet* foi liofilizado *overnight*. Após a liofilização o precipitado foi ressuscitado em bicarbonato de amônio (50 mM, pH 8.0) e em solução de tripsina (Mike Myers, Cold Spring Harbor modificado por Brett S. Phinney, UC Davis Proteomics Core, Davis, CA, USA).

Os peptídeos digeridos foram analisados usando LTQ-FT (Thermo Fisher Scientific) acoplado com MG4 HPLC (Michrom, Auburn, CA, USA). Os dados brutos foram analisados utilizando X! Tandem e visualizados usando Scaffold (Software Proteome, versão 3.01).

3.5- Análise da expressão gênica por PCR em tempo real: KRT2, KRT5, KRT6A, KRT10 e KRT14

A reação de transcriptase reversa (RT) foi preparada de acordo com as especificações do Kit RevertAid™ Premium First Strand cDNA Synthesis (Fermentas Life Sciences).

Os iniciadores e sondas TaqMan® inventoriadas estão demonstrados na Tabela 4 (Applied Biosystems Foster City, CA, USA), as reações foram executadas conforme as recomendações do fabricante.

Nesta análise foram utilizados 114 pacientes, sendo 12 controle negativos (usados como calibradores), 38 com doença benigna (24 com bócio e 14 com adenoma) e 64 com carcinoma papilífero (32 CPVF e 32 CPC).

As análises estatísticas foram feitas utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. Inicialmente foi realizado o teste de normalidade para verificar a distribuição da amostra e em seguida o teste de Mann-Whitney para comparar os grupos Maligno (carcinomas) e Benigno (bócio e adenoma). Para estabelecer o *cut-off* formador da tabela de contingência foi feita a curva ROC, sendo assim, foram calculados o risco relativo, *odds ratio*, sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo.

Na análise dos resultados com os grupos separadamente (bócio, adenoma, CPC e CPVF) foi usada ANOVA e o teste comparativo de Bonferroni.

Tabela 4- Sondas usadas para analisar a expressão gênica das queratinas e do constitutivo (GAPDH).

Tipo de gene	Gene	Código
Queratina tipo II	KRT2	Hs00166294_m1
	KRT5	Hs00361185_m1
	KRT6A	Hs04194231_s1
Queratina tipo I	KRT10	Hs01043114_g1
	KRT14	Hs00265033_m1
Constitutivo	GAPDH	Hs03929097_g1

3.6- Teste de citotoxicidade do peptídeo CaT12 em células TPC1 e NPA (Ensaio de MTT)

A citotoxicidade do peptídeo CaT12 foi avaliada pela viabilidade celular das culturas de células de câncer papilífero de tireoide (TPC-1 e NPA) utilizando o ensaio de MTT como descrito por Mosmann (68). Células (1×10^4 células/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços, em triplicata, com meio RPMI completo na ausência ou presença do peptídeo em diferentes concentrações por 72 horas a 37°C e 5% CO₂. Como controle foram usadas células sem tratamento ou apenas meio de cultura. Posteriormente, foi adicionado 20 µL de azul de tiazolil (MTT, Sigma Chemical Co.) e a placa foi incubada por 4 horas. O sobrenadante foi removido e as partículas insolúveis de coloração roxa produzidas por células viáveis que metabolizaram o MTT foram solubilizadas com 100 µL/poço de solução ácido clorídrico/isopropanol. Após 5 minutos de incubação, a densidade óptica foi determinada a 570 nm em leitor automático de placas (Biorad 2550 reader).

3.7- Estímulo de células do baço de camundongo com peptídeo CaT12

O baço de um camundongo lisogênico foi retirado, lavado em PBS e macerado em meio de cultura RPMI. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 1200 rpm por 10 minutos e o precipitado foi lavado com tampão de lise por 2 vezes. As células foram contadas, distribuídas em placas (10^6 células por poços) e incubadas por 72 horas com o peptídeo CaT12 nas concentrações

1 μM , 10 μM e 100 μM (foram feitos também os controles sem peptídeos e com LPS). Os sobrenadantes foram coletados e foi feita a dosagem do Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) utilizando o Kit ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) de acordo com as recomendações do fabricante.

3.8- Teste de citotoxicidade da droga 15d-PGJ₂ (15-deoxy- Δ (12,14)-prostaglandin J₂) em células TPC1

Células TPC1 foram cultivadas em placas de 96 poços em triplicata (1×10^4 células/poço), com meio RPMI completo na ausência ou presença do peptídeo CaT12 em diferentes concentrações (20, 10, 5, 2.5, 1.2 e 0.6 μM) por 72 horas a 37°C e 5% CO₂. Células sem tratamento ou apenas meio de cultura foram usadas como controle. Após, foi adicionado 20 μL de azul de tiazolil (MTT, Sigma Chemical Co.) e a placa foi incubada por 4 horas. O sobrenadante foi removido e as partículas insolúveis de coloração roxa produzidas por células viáveis que metabolizaram o MTT foram solubilizadas com 100 μL /poço de solução ácido clorídrico/isopropanol. Depois de 5 minutos de incubação, a densidade óptica foi determinada a 570 nm em leitor automático de placas (Biorad 2550 reader).

Foi feito também o ensaio de apoptose no citômetro de fluxo com Anexina V-FITC depois de incubar as células por 24 horas com a 15d-PGJ₂.

3.9- Seleção de clones para reconhecimento de membrana das células TPC1 e NPA

3.9.1- Amplificação dos fagos para ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*)

Os fagos utilizados no ensaio de ELISA com sobrenadantes foram amplificados em meio LB com tetraciclina e *Escherichia coli* linhagem ER2738 previamente crescida sob agitação a 37°C até a fase *early-log* (OD₆₀₀ ~ 0,3). O *backup* contendo os fagos para teste foram incubados separadamente em placas de 96 poços *overnight* a 37°C por 4-5 horas sob forte agitação. Posteriormente as placas centrifugação a 3700 rpm por 40 minutos a 4°C e recentrifugada para total separação das bactérias, esses sobrenadantes de cultura dos 105 diferentes fagos foram testados nas células TPC1 e NPA separadamente.

Para o ELISA com os fagos purificados foi utilizado o mesmo protocolo descrito no item 3.2 para cada clone a ser testado.

3.9.2- ELISA de células inteiras

As células NPA e TPC1 foram tripsinizadas, lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído 3,7% por 10 minutos, depois foram lavadas duas vezes com PBS e então divididas em placas de 96 poços, com 10^4 células em cada *well* e com volume final de 50 μ L. Depois adicionamos 100 μ L dos fagos a serem testados (sobrenadante ou 6×10^{11} fagos/poço) e as placas foram incubadas por 1,5 horas a 37°C.

Em seguida as placas foram lavadas três (ELISA com sobrenadante de fagos) ou quatro vezes (ELISA de fagos purificados) com PBS, para cada lavagem acrescentamos 200 μ L de PBS e centrifugamos as placas a 1200 rpm por 10 minutos para que o sobrenadante pudesse ser descartado. Posteriormente as placas foram incubadas por 1 hora a 37°C com anti-M13 marcado com peroxidase (Ge Healthcare), diluído em tampão bloqueio (PBS/BSA 3%) na concentração de 1:5000. Ao final da incubação, as placas foram novamente lavadas por duas vezes com PBS (três vezes para fagos purificados) e a revelação ocorreu pela adição de Tampão Citrato-Fosfato 0,1M pH 5,0 suplementado com H₂O₂ 0,03% e orto-fenilenodiamina (OPD) a 1 mg.mL⁻¹. A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 2 N e a OD foi obtida em leitor de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, USA) a 492 nm. Para a normalização dos resultados foi considerada a subtração dos valores do OD_{fago selvagem} (OD_{fago teste} - OD_{fago selvagem}).

RESULTADOS

4- Resultados

4.1- Validação do biomarcador CaT12: Imunohistoquímica com fago e peptídeo em tecidos tireoidianos

Foram utilizadas três lâminas de *Tissue Micro Array* contendo os mesmos tecidos tireoidianos de 232 pacientes (Tabela 1), foram testados além do fago CaT12 e peptídeo sintético biotilado CaT12 o fago selvagem (fago que não apresenta peptídeo na p3).

A reatividade do peptídeo CaT12 sem a presença das proteínas do fago foi confirmada utilizando peptídeo sintético e testado contra os mesmos tecidos de carcinoma papilífero de tireoide. A Figura 6 mostra a marcação positiva do peptídeo sintético CaT12 (6-A1) e do fago CaT12 (6-A2) contra o tecido de CP, e a ausência de coloração contra o tecido de bócio (6-B1 e 6-B2), respectivamente. Além disso, não foi observado nenhuma imunoreatividade do fago selvagem contra o tecido maligno e benigno como demonstrado na figura 6-A3 e 6 B3.

Ao analisarmos a reatividade da imunohistoquímica, tanto visual como pelo sistema ACIS (Tabela 5), foi verificado que houve uma maior positividade do peptídeo sintético quando comparado com o fago CaT12 para os tecidos de carcinomas papilíferos (clássico e de variante folicular) e uma menor porcentagem de positividade nos tecidos sem doença maligna (normal, bócio e adenoma). No entanto, para o CF foi observado uma menor positividade do fago CaT12 quando comparado com o peptídeo sintético CaT12, enquanto que para o adenoma folicular, o peptídeo sintético CaT12 apresentou uma maior positividade.

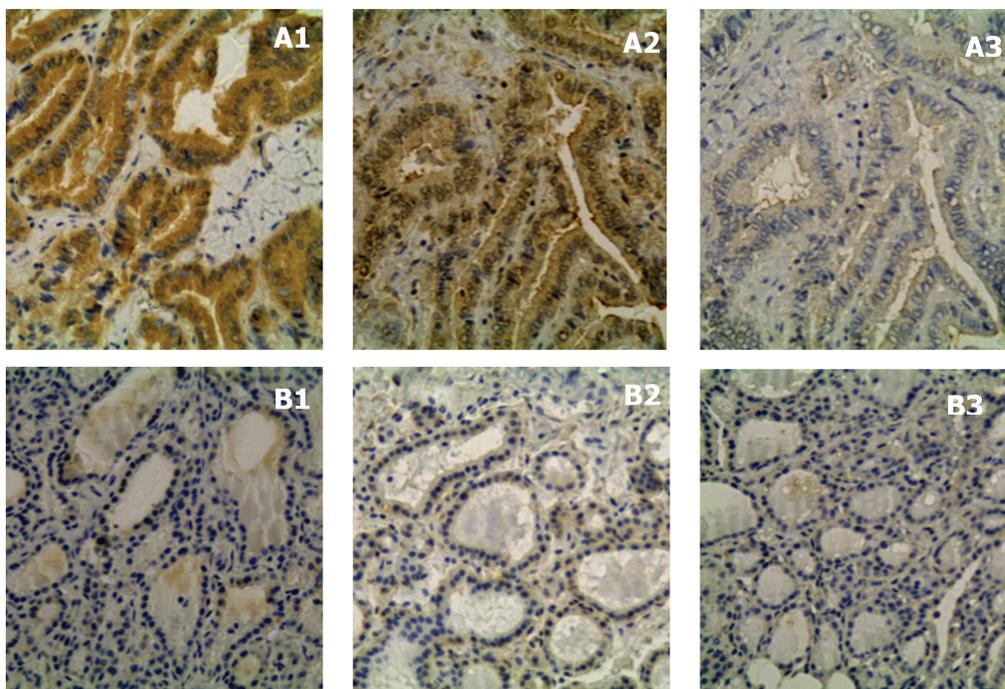


Figura 6- Imunohistoquímica com CaT12 em tecidos tireoidianos. **A-** Câncer papilífero de tireoide: A1- Peptídeo CaT12; A2- Fago CaT12; A3- Fago selvagem. **B-** Bócio Nodular: B1- Peptídeo CaT12; B2- Fago CaT12; B3- Fago selvagem. (400x).

Tabela 5- Positividade do clone CaT12 em nódulos benignos (bócio e adenoma folicular) e malignos considerando a análise visual e ACIS.

CaT12		BENIGNOS						MALIGNOS					
		NORMAL		BÓCIO		AF		CPC		CPVF		CF	
		P/N	Positivity	P/N	Positivity	P/N	Positivity	P/N	Positivity	P/N	Positivity	P/N	Positivity
VISUAL	FAGO	0/15	0%	9/53	16,98%	9/54	16,67%	36/36	100%	26/32	81,25%	7/41	20,00%
	PEPTIDEO	0/15	0%	12/42	28,57%	19/48	39,58%	31/33	93,94%	18/25	72,00%	27/39	69,23%
ACIS	FAGO	0/2	0%	13/47	27,66%	8/54	14,81%	34/36	94,44%	27/33	81,82%	10/41	24,39%
	PEPTIDEO	0/15	0%	12/44	27,27%	21/47	44,68%	32/35	91,43%	22/30	73,33%	28/40	70,00%

Abreviações: Normal= tecido não neoplásico; CP= carcinoma papilífero de tireoide; AF= adenoma folicular; CPC= tipo clássico CP; CPVF= variante folicular CP; CF= carcinoma folicular; P= número de pacientes positivos; N= número total de pacientes. *Cut-offs* para diferentes padrões de análise da positividade na imunoistoquímica. Peptídeo > 57,87. Fago > 45,68.

Em relação aos parâmetros diagnósticos (SEN, ESP, VPP e VPN), os valores de *cut-off* para o fago e peptídeo CaT12 foram escolhidos baseados na análise da curva ROC. Como pode ser observado na Tabela 6, tanto no método visual como no ACIS, o fago CaT12 apresentou uma melhor sensibilidade e especificidade para CPC e CPVF quando comparado com o peptídeo sintético CaT12. Contudo, quando se analisa todas variantes de câncer de tireoide juntas, o peptídeo sintético apresenta maior sensibilidade. Quando analisamos CPC, CPVF e CF juntos a sensibilidade do teste diminui comparado à análise do CPC.

Ambos, fago e peptídeo CaT12 foram capazes de identificar malignidade entre as lesões de padrão folicular (Bócio, AF, CPVF e CP) e discriminaram estas lesões com acurácia consideráveis, como demonstrado na Tabela 7.

Tabela 6. Parâmetros de diagnóstico para análise da imunohistoquímica do fago CaT12 e peptídeo CaT12 em nódulos benignos (bócio nodular e adenoma folicular) e malignos (carcinoma diferenciado de tireoide e subtipos histológicos).

CaT12		Cut-off	CPC			CPC e CPVF			CPC, CPVF e CF		
			SEN(%)	ESP (%)	VPP ^a /VPN ^b or ACC ^c (%)	SEN(%)	ESP (%)	VPP ^a /VPN ^b or ACC ^c (%)	SEN(%)	ESP (%)	VPP ^a /VPN ^b or ACC ^c (%)
VISUAL	FAGO	-	100	85,12	66,67 ^a 100 ^b	91,18	85,12	77,50 ^a 94,50 ^b	64,22	85,12	79,55 ^a 72,54 ^b
	PEPTIDEO	-	93,94	70,48	50,00 ^a 97,37 ^b	84,48	70,48	61,25 ^a 89,16 ^b	78,35	70,48	71,30 ^a 77,89 ^b
ACIS	FAGO	>45,68	94,44	79,61	94,17 ^c	88,41	79,61	91,15 ^c	55,00	79,61	72,50 ^c
	PEPTIDEO	>57,87	91,43	68,87	83,53 ^c	83,08	68,87	79,65 ^c	78,10	68,87	76,23 ^c

Abreviações: CPC= CP tipo clássico; CPVF= variante folicular do CP; CF= carcinoma foliculars), SEN= sensibilidade, ESP= especificidade, VPP^a= valor preditivo positivo, VPN^b= valor preditivo negativo, ACC^c= acurácia. O *cut-off* empregado para o escore Visual foi determinado pelo teste exato de Fisher, para a análise ACIS foi utilizado a análise da curva ROC.

CaT12 foi inversamente correlacionado com a idade dos pacientes (r de Spearman= -0.2469, $p= 0.0197$) e foi diretamente correlacionado com ocorrência de metástase (r de Spearman=0.3585, $p= 0.0039$). Com os testes realizados não foram encontradas nenhuma outra associação entre CaT12 e características clínicas e tumorais.

Tabela 7. Valores diagnósticos do fago CaT12 e do peptídeo CaT12 para discriminar os diferentes subtipos histológicos na análise ACIS.

	Variável	P*	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Acurácia(%)
FAGO	CPC x CPVF	0,2691	91,67	18,18	57,74
	CPVF x AF	<0,0001*	81,82	85,19	91,92
	CPVFX CF	<0,0001*	78,79	75,61	88,77
	CPVF x Bócio	<0,0001*	81,82	72,34	83,11
PEPTÍDEO	CPC x CPVF	0,0199*	91,43	26,67	66,86
	CPVF x AF	0,0254*	76,67	55,32	65,18
	CPVFX CF	0,8680	73,33	30,00	51,17
	CPVF x Bócio	<0,0001*	73,33	70,45	78,48

Abreviações: AF= adenoma folicular; CPC= tipo clássico CP; CPVF= variante folicular CP; CF= carcinoma folicular); *= $P<0,05$.

4.2- Validação da imunohistoquímica: Tecidos normais, benignos e malignos de vários tecidos humanos

Para validar o peptídeo CaT12 foram utilizados outros tecidos normais e tumores benignos e malignos como visualizados na Tabela 8 e Figura 7, demonstrando pouca ou nenhuma positividade nos tecidos normais e lesões benignas.

Na Figura 7 podemos observar em A1, A2 e A3 positividade e em B1, B2 e B3 negatividade, para carcinoma de mama, carcinoma de próstata e carcinoma de rim, respectivamente. As porcentagens podem ser visualizadas na Tabela 8, para tais valores consideramos a análise visual, exatamente igual a descrita para os tecidos tireoidianos. A lâmina

de TMA número 7 continha tecidos não neoplásicos com cinco amostras de indivíduos diferentes em duplicata. Existem exemplares de quase todos os tecidos corporais, como ossos, cartilagens, músculo, gordura, aparelho reprodutivo, digestório, respiratório, circulatório, nervoso, juntamente com glândulas e anexos, ao todo são 47 diferentes tipos teciduais.

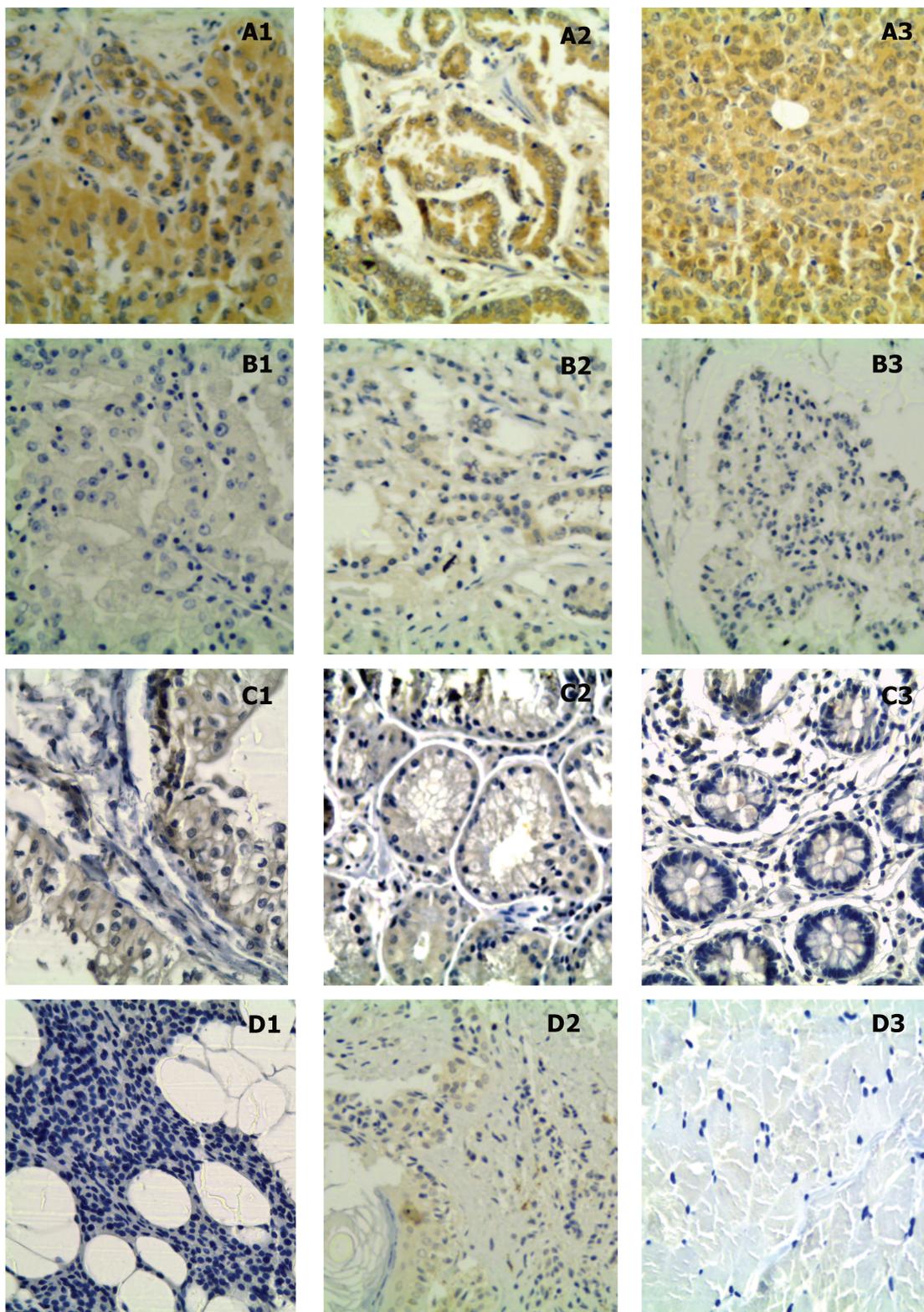


Figura 7. Imunohistoquímica com peptídeo CaT12 em diferentes tecidos. Positivos: A1-Rim; A2-Próstata; A3-Mama. Negativo: B1-Rim; B2-Próstata; B3- Mama. Tecidos não neoplásicos: Positivos: C1- Bexiga; C2- Epitélio respiratório; C3- Intestino delgado. Negativo: D1- Paratireoide; D2- Nevo; D3- Músculo.

Tabela 8. Análise visual da positividade do peptídeo CaT12 na imunistoquímica em diversos tecidos. *Tecidos sem neoplasia de vários órgãos humanos.

Diagnóstico histopatológico		Análise Visual	
		N	Positividade (%)
Não malignos	Nevos atípicos	12	0%
	Nevos comuns	29	3,45%
	Tecidos não neoplásicos *	206	15,53%
	Mama normal	5	0%
	Próstata normal	5	0%
	Rim normal	5	60%
	Total	262	13,74%
Malignos	Carcinoma de mama	189	53,96%
	Carcinoma de próstata	57	70,18%
	Carcinoma de rim	35	74,29%
	Total	281	59,79%

4.3- Identificação das proteínas ligantes ao peptídeo CaT12

Para a identificação das proteínas ligantes ao peptídeo CaT12 foram feitas dois ensaios separados, o primeiro com proteínas extraídas das células TPC1 (Tabela 9) e o segundo com proteínas extraídas de tecidos de pacientes com carcinomas e bócios (Tabela 10).

Comparando os resultados das duas tabelas (Tabela 9 e 10) podemos observar que as queratinas (KRT1, KRT2, KRT5, KRT6A, KRT9, KRT10 e KRT14) e a S100A18 se repetiram quando comparado com as proteínas identificadas no experimento utilizando as proteínas de pacientes. Outras proteínas também foram encontradas como demonstrado na Tabela 10.

Tabela 9. Proteínas identificadas por sequenciamento após a imunoprecipitação.

Nome da proteína	Número de acesso	MW (KDa)
Queratina, tipo II citoesqueleto 1	P04264	66
Queratina, tipo I citoesqueleto 9	P35527	62
Queratina, tipo I citoesqueleto 10	P13645	59
Queratina, tipo I citoesqueleto 14	P02533	52
Queratina, tipo II citoesqueleto 2	P35908	65
Hornerin (S100A18)	Q86YZ3	282
Queratina, tipo II citoesqueleto 6A	P02538	60
Queratina, tipo II citoesqueleto 5	P13647	62

Tabela 10- Resultado do sequenciamento das proteínas capturadas pelo peptídeo CaT12 ligado aos *beads* magnéticos. Nas colunas *Pool* Câncer e *Pool* Bócio (Pacientes utilizados demonstrados na Tabela 2) podemos observar a quantidade de peptídeos encontrados que tinham similaridade com a proteína descrita (incluindo as repetições do mesmo peptídeo).

Nome da proteína	Número de acesso	MW (KDa)	<i>Pool</i> câncer	<i>Pool</i> bócio
Vimentina	P08670	54	38	8
Proteína marcadora de olfato	P47874	19	3	0
Proteína queratinócito rica em prolina	Q5T749	64	1	1
Queratina, tipo II citoesqueleto 6A	P02538	60	2	7
Queratina, tipo II citoesqueleto 5	P13647	62	2	3
Queratina, tipo II citoesqueleto 2	P35908	65	14	38
Queratina, tipo II citoesqueleto 1	P04264	66	35	60
Queratina, tipo I citoesqueleto 9	P35527	62	67	30
Queratina, tipo I citoesqueleto 16	P08779	51	3	4
Queratina, tipo I citoesqueleto 14	P02533	52	0	3
Queratina, tipo I citoesqueleto 10	P13645	59	16	64
Hornerin (S100A18)	Q86YZ3	282	11	7
Histona H2B	O60814	14	10	3
Histona H2A	P04908	14	4	0
Histona H1x	Q92522	22	1	0
Histona H1.4	P10412	22	43	7
Histona H1.0	P07305	21	4	0
Proteína de alta motilidade HMGI	P52926	12	11	0
Ribonucleoproteína A3	P51991	40	1	0
Filagrina 2	Q5D862	248	1	0
Actina, citoplasmática 1	P60709	42	3	0
Proteína ribossomal 60S L31	P62899	14	4	0
Proteína ribossomal 60S L29	P47914	18	3	0
Proteína ribossomal 60S L28	P46779	16	1	0
Proteína ribossomal 60S L26-like 1	Q9UNX3	17	2	0
Proteína ribossomal 60S L26	P61254	17	7	0
Proteína ribossomal 60S L23	P62829	15	1	0
Proteína ribossomal 60S S23	P62266	16	3	0

4.4- Expressão gênica de queratinas (KRT2, KRT5, KRT6A, KRT10 e KRT14) em tecidos tireoidianos neoplásicos

Para verificar a expressão gênica das queratinas em pacientes com nódulos tireoidianos usamos PCR em tempo real, as sondas das queratinas KRT1 e KRT9, assim como S100A18 não funcionaram e não foi possível obter esses resultados. Na Figura 8A podemos observar o gráfico com a quantificação relativa das queratinas, demonstrando que as queratinas expressas preferencialmente nos pacientes com doenças benignas foram as queratinas KRT2 ($P < 0,0001$), KRT6A ($P = 0,0014$) e KRT10 ($P < 0,0001$), já as queratinas KRT5 ($P = 0,0002$) e KRT14 ($P < 0,0001$) estão mais expressas em pacientes com doença maligna.

A curva ROC foi construída para as queratinas 5 (Figura 8-B) e 14 (Figura 8-C) que foram as únicas com maior expressão nos pacientes com carcinoma, a partir da curva ROC foi possível determinar os valores de *cut-off* de 0,0721 para a KRT5 e 0,300 para a KRT14, e assim calcular os testes diagnósticos demonstrados na Tabela 11.

Quando ambas as queratinas 5 e 14 foram analisadas considerando a dupla positividade destas queratinas (Figura 8-D) observamos que 44,28% dos pacientes foram duplo positivos, sendo 77,42% pacientes com carcinoma, 22,58% bócio e 0% adenoma. E quando foram analisados apenas os pacientes com câncer (Figura 8-E) observamos que 55,81% são positivos tanto para KRT5 quanto para KRT14. Os valores de sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo foram superiores a 72% para KRT5 e KRT14 (Tabela 11).

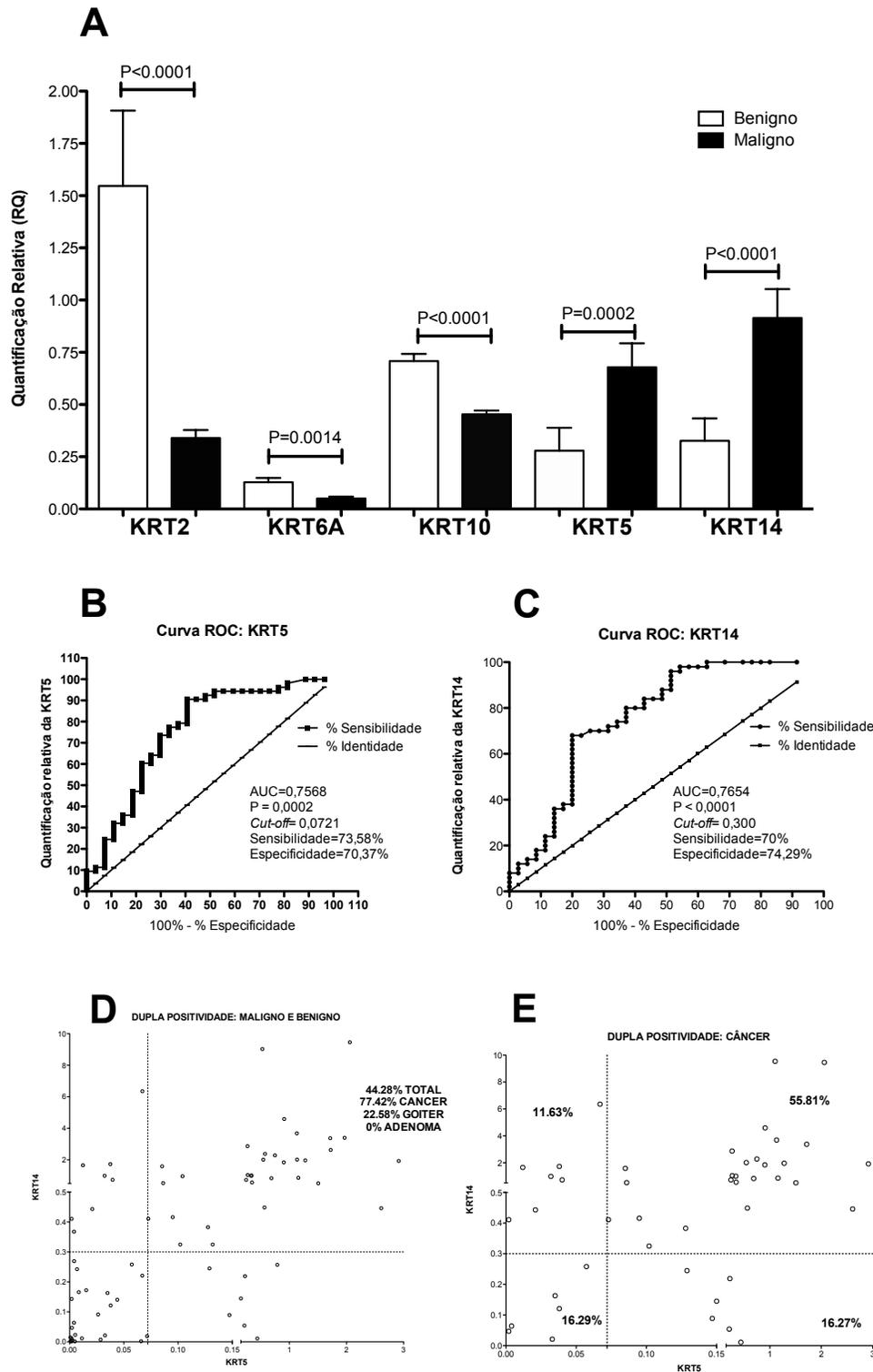


Figura 8- Quantificação relativa das queratinas em nódulos tireoidianos benignos (bócio e adenoma) e malignos (carcinomas papilífero clássico e de variante folicular). **A-** Quantificação relativa das queratinas. P= Teste Mann-Whitney. **B-** Curva ROC KRT5. **C-** Curva ROC KRT14. **D-** Dupla positividade das queratinas KRT5 e KRT14 de todos os pacientes analisados (malignos e benignos). **E-** Dupla positividade das queratinas KRT5 e KRT14 dos pacientes com carcinoma (carcinomas papilíferos clássico e de variante folicular).

Tabela 11- Testes diagnósticos comparando os grupos maligno (carcinomas papilíferos clássico e de variante folicular) e benigno (bócio e adenoma) na quantificação relativa das queratinas KRT5 e KRT14.

	KRT5	KRT14
P teste de Fisher	<0,0001	<0,0001
Risco relativo	2,160	2,386
Odds ratio	8,791	7,778
Sensibilidade	75,47	72,92
Especificidade	74,07	74,29
Valor preditivo positivo	85,11	79,55
Valor preditivo negativo	60,61	66,67

Na Figura 9 podemos observar os gráficos da expressão relativa das queratinas nos grupos bócio, adenoma e carcinomas (CPC e CPVF). A KRT2 (Figura 9-A) e a KRT10 (Figura 9-D) foram diferencialmente expressas em pacientes com adenomas e pacientes com CPVF.

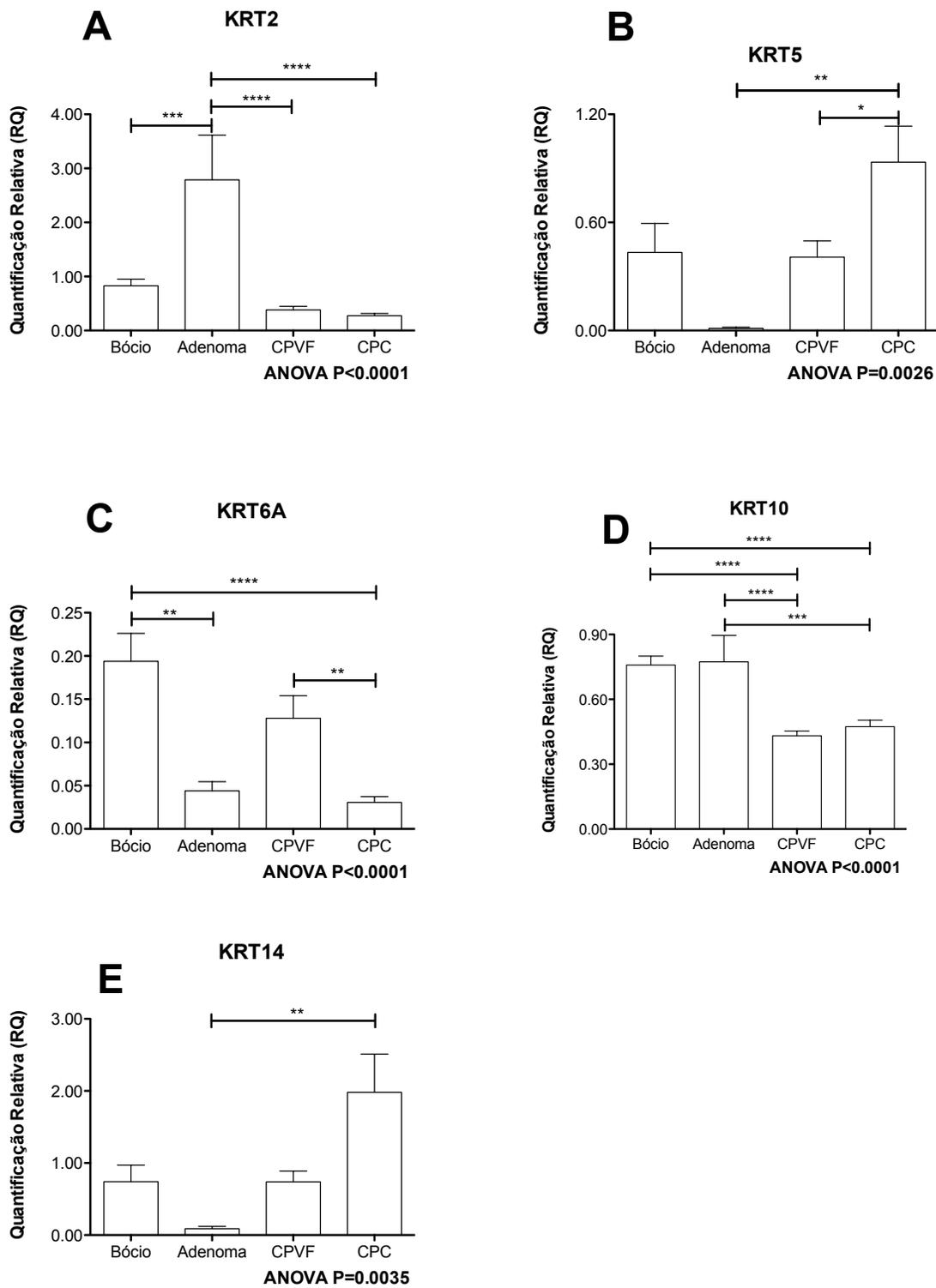


Figura 9- Quantificação relativa das queratinas nos grupos bócio, adenoma, carcinoma papilífero clássico (CPC) e carcinoma papilífero de variante folicular (CPVF). **A-** KRT2. **B-** KRT5. **C-** KRT6A. **D-** KRT10. **E-** KRT14. ANOVA e Teste de Bonferroni significativo $p < 0,05$ *.

4.5- Testes preliminares para verificar possibilidade de uso terapêutico

Para avaliar se o peptídeo CaT12 poderia ser usado como carreador de drogas para ajudar no tratamento deste carcinoma, e talvez até de outros tipos de adenocarcinomas (mama, próstata e rim), foram feitos testes para verificar se o peptídeo CaT12 seria citotóxico (Ensaio de MTT) para as células NPA e TPC1 e se seria reconhecido pelo sistema imune (produção de TNF- α). Também foi testada a droga 15d-PGJ₂ (15-deoxy- Δ (12,14)-prostaglandin J₂) em células de carcinoma de tireoide para verificar se era tóxica para as células cancerígenas.

4.5.1- Teste de citotoxicidade (MTT) do peptídeo CaT12

No teste de citotoxicidade o peptídeo foi testado em três concentrações diferentes e de três formas de síntese diferentes (Figura 10-C), foi observado que a presença ou ausência de biotina não alteram os resultados e que quando o peptídeo foi sintetizado repetidamente por 3 vezes e em altas concentrações poderia ser tóxico em células NPA (Figura 10-A). Também demonstramos que o peptídeo CaT12 não foi citotóxico para as células de carcinoma de tireoide, exceto em alta concentração (40 μ M) apenas nas células NPA e com o uso do peptídeo repetido por três vezes (Figura 10).

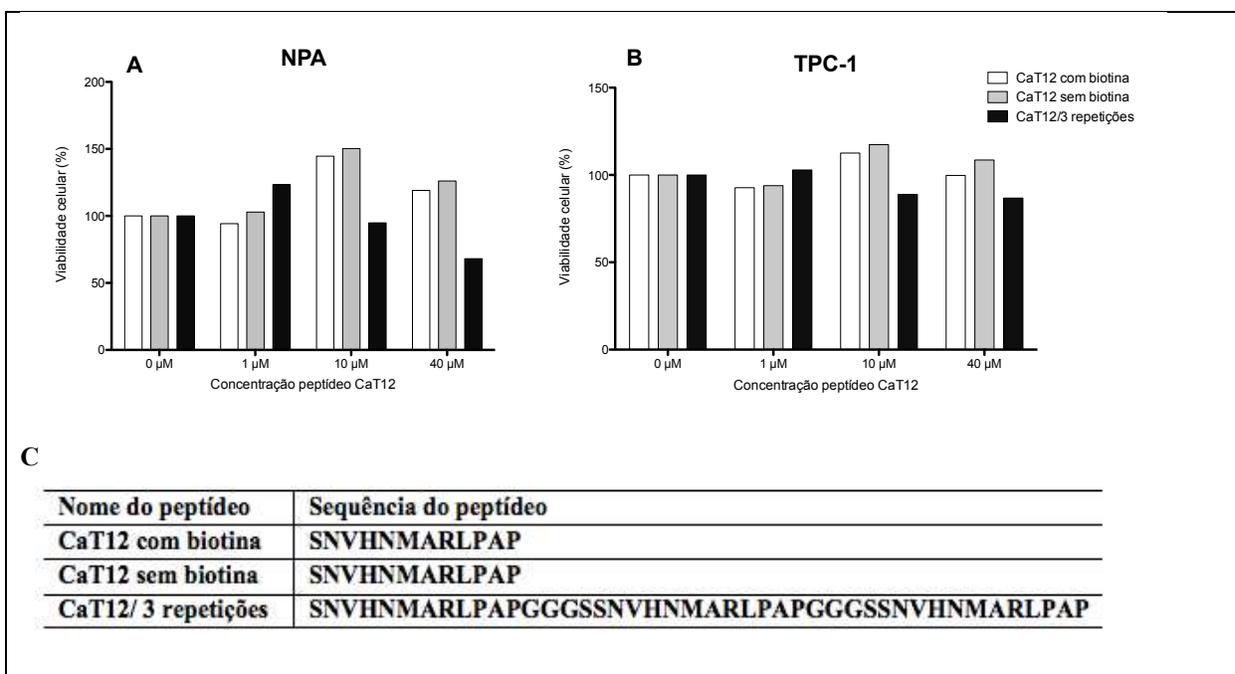


Figura 10- Teste de viabilidade celular (MTT) em linhagens celulares de carcinoma papilífero de tireoide (NPA e TPC-1) **A-** Porcentagem de viabilidade celular em células NPA e **B-**TPC-1. **C-** Sequências dos peptídeos.

4.5.2- Estímulo de leucócitos de camundongo isogênico com o peptídeo CaT12

Já a análise da produção de citocina inflamatória quando tratada com peptídeo, o tratamento de leucócitos (células totais do baço de camundongos) com o peptídeo CaT12 não induziu o aumento do Fator de Necrose Tumoral (TNF- α), na maior concentração (Figura 11).

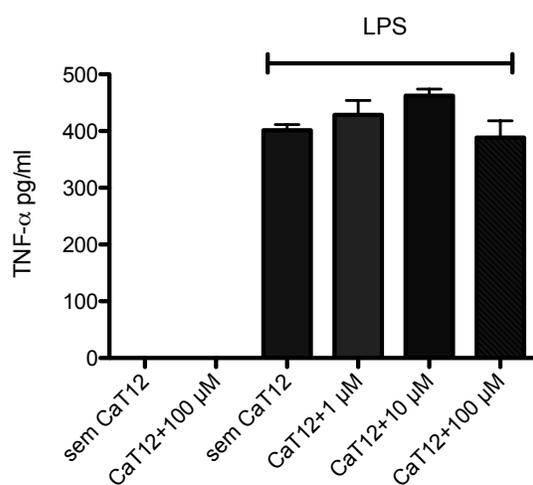


Figura 11- Células totais de baço de camundongo estimuladas com o peptídeo CaT12 e LPS.

4.5.3- Teste dose resposta (IC50) utilizando a 15d-PGJ₂ (15-deoxy- Δ (12,14)-prostaglandin J₂) em células TPC1

Para analisar a capacidade da molécula de 15d-PGJ₂ causar apoptose nas células de carcinoma papilífero de tireoide, foi feito um ensaio IC50 (Ensaio de MTT que calcula a quantidade da droga necessária para causar apoptose em 50% das células) . A Figura 12-A e 12-B mostra a diminuição da quantidade de células tratadas com a molécula de 15d-PGJ₂ quando comparada com as células não tratadas. Na Figura 12-C podemos observar que a partir de 10 uM houve uma porcentagem significativamente de morte das células. O ensaio de apoptose com a citometria de fluxo confirma os dados, quando verifica-se um deslocamento de fluorescência para a detecção de Anexina V (marcador de apoptose) quando tratada com 9,3 uM da droga (Figura 12-D) .

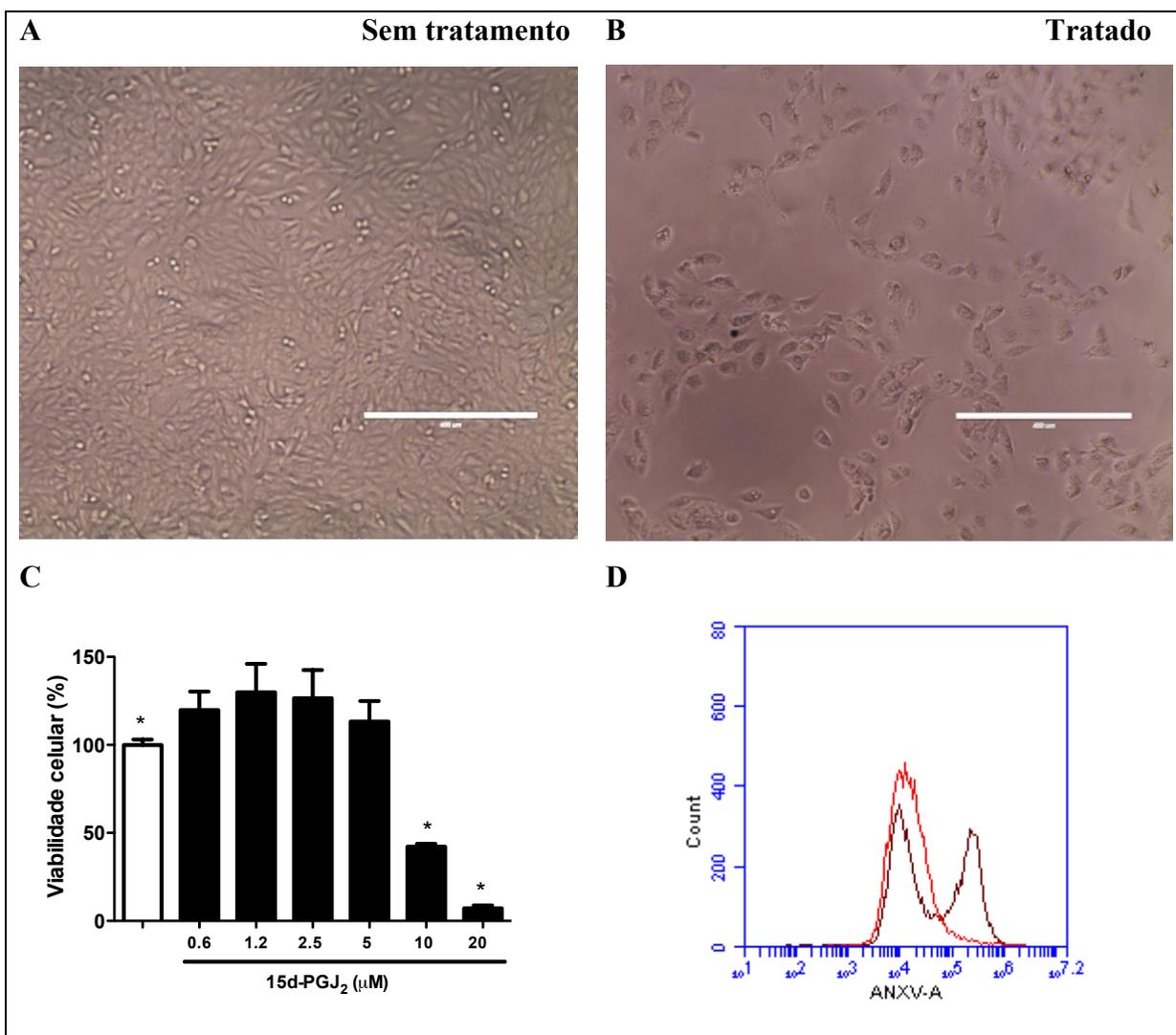


Figura 12- Teste da droga 15d-PGJ₂ em linhagem celular TPC1. **A-** Células TPC1 sem adição de droga. **B-** Células TPC1 com 10 uM de 15d-PGJ₂. **C-** Gráfico com resultado da viabilidade celular (%). **D-** Teste de apoptose. Vermelho= Controle (células sem tratamento). Marrom= Células tratadas com 9,3 uM (IC50) de droga.

4.6- Peptídeos ligantes de superfície celular

Na Figura 13 estão demonstrados os resultados do teste ELISA com diferentes fagos testados nas células TPC1 e NPA. O controle negativo foi o fago selvagem, o qual não apresenta peptídeo na PIII. Os valores da OD dos fagos testados foram subtraídos dos valores de OD do fago selvagem para normalizar os resultados.

Os vinte e seis fagos com maiores valores do OD (Figura 13-A e 13-B) foram purificados e novamente testados para comprovar a reatividade contra as células cancerígenas. Os três mais

reativos (Figura 13-C) foram CaT19, CaT42 e CaT66, estes serão sintetizados para serem testados como uso complementar na PAAF por imunocitoquímica e citometria de fluxo.

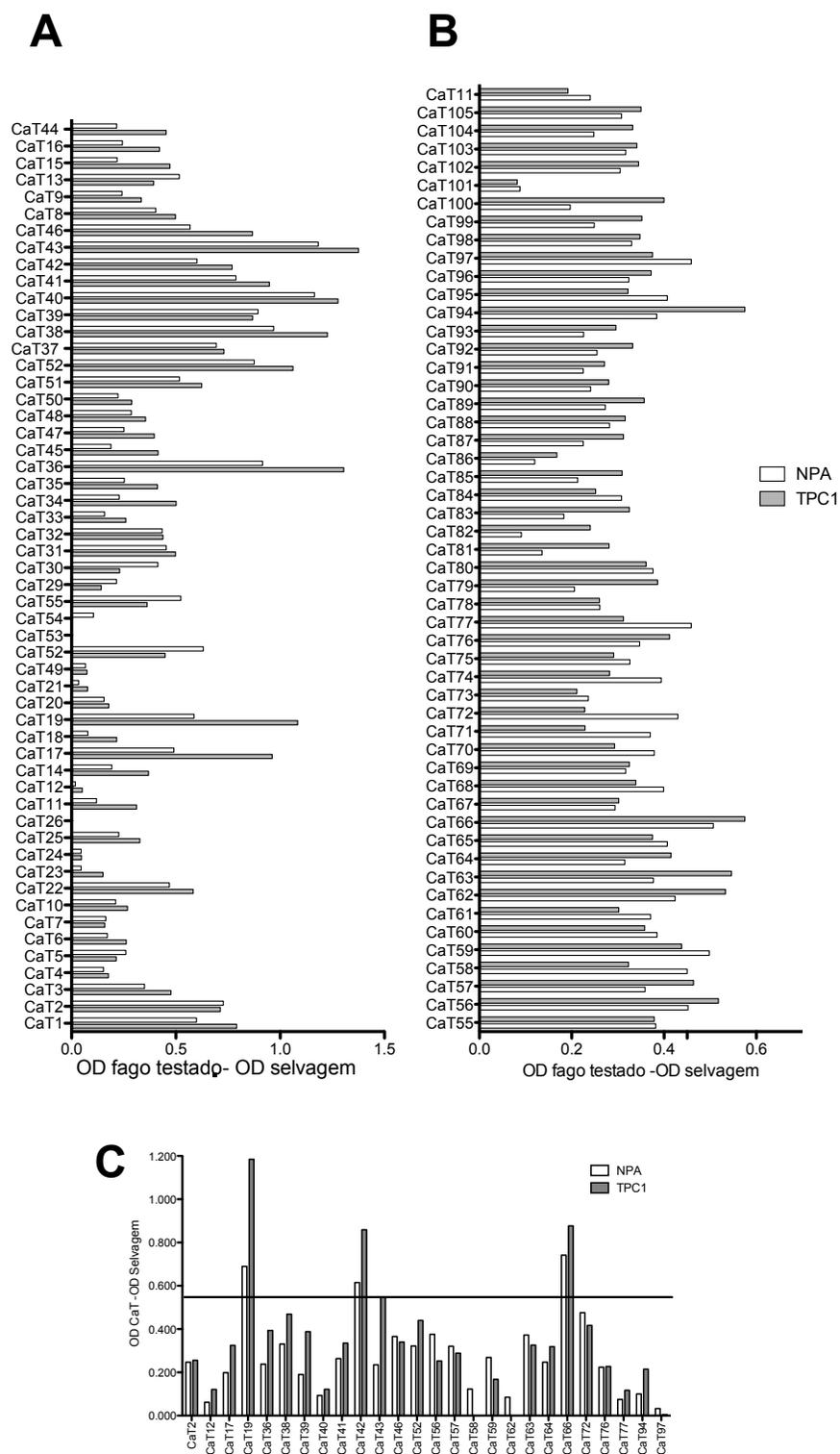


Figura 13. ELISA em células NPA e TPC1. **A-** com sobrenadante de fagos CaT da biblioteca de Ph.D. 12. **B-** com sobrenadante de fagos CaT da biblioteca de Ph.D. C7C. **C-** com fagos CaT purificados.

DISCUSSÃO

5- Discussão

A identificação de nódulos malignos em lesões foliculares indeterminadas é difícil e biomarcadores para ajudar distinguir variantes foliculares de carcinomas papilíferos da tireoide de uma simples hiperplasia benigna são escassos. Neste trabalho foram testados alguns peptídeos selecionados por *Phage Display* para tentar melhorar o diagnóstico do câncer de tireoide, além de analisar as proteínas ligantes ao peptídeo CaT12 por espectrômetro de massa e expressão gênica e verificar a possibilidade desse peptídeo vir a ser um carreador de drogas. Esta tecnologia foi escolhida pelo sucesso da descoberta e aplicação de biomarcadores selecionados, por exemplo os com a finalidade de atividade antitumoral (69) ou para entrega de drogas (58, 61, 66, 70).

O peptídeo CaT12, embora não seja específico para tecidos de tireoide, foi capaz de identificar malignidade entre lesões nodulares da tireoide e caracterizar lesões de padrão folicular. Na verdade, a sua precisão para identificar lesões foliculares é comparável com a maioria dos imunomarcadores utilizados e atualmente empregados no diagnóstico diferencial de nódulos com diagnóstico indeterminados (49, 71). Além disso, este peptídeo está associado à características de agressividade do carcinoma diferenciado de tireoide, tais como a idade e a ocorrência de metástases, sugerindo uma potencial utilização clínica.

CaT12 marcou fortemente o citoplasma das células de câncer papilífero de tireoide. Como as células da tireoide normais não coram, as proteínas alvo podem ser produzidas durante o crescimento celular. Lesões benignas da tireoide, como adenomas foliculares e hiperplasia apresentaram uma coloração muito fraca, o que reforça a hipótese de que as proteínas alvo estejam envolvidas no crescimento celular.

O clone CaT12 demonstrou uma maior positividade principalmente para os CPC quando comparada com outras variantes de carcinoma de tireoide, já que as células NPA utilizadas para a seleção do biomarcador são originárias de um CPC. Apesar dos CPCs terem os maiores índices de positividade (100% para a análise visual e 94,44% para valores de ACIS- Tabela 3) os CPVF também obtiveram aproximadamente 81% de positividade, visto que é uma variante do CP.

Observaram-se resultados relativamente diferentes ao fago recombinante CaT12 e o peptídeo sintético (Tabela 5), com o aumento da coloração e positividade para o clone no fago em amostras de carcinoma. Isto pode ter acontecido devido à conformação epitopo-específico gerado

pela fusão do peptídeo com a região N-terminal da proteína pIII do bacteriófago. Por outro lado, uma maior reatividade do peptídeo foi observado nas amostras benignas (bócio e adenomas), provavelmente devido a uma afinidade mais baixa do peptídeo sozinho, sem o rearranjo conformacional da fusão peptídeo-pIII. Portanto, existe uma contribuição potencial das proteínas de fagos para a afinidade de superfície do peptídeo (19, 72).

Em comparação com os resultados obtidos para os tecidos tireoidianos com o peptídeo sintético, (Tabela 5) os carcinomas de próstata (70,18%) e rim (74,29%) exibiram porcentagens de detecção de positividade (Tabela 8) muito parecidas com os CPVF (72%), isso indica que a proteína alvo não é exclusivamente de tireoide, mas pode estar presente em outros tipos de carcinomas epiteliais, outro dado importante é que nos tecidos benignos e também nos tecidos não neoplásicos não foram visualizadas positividade.

A positividade do peptídeo CaT12 nos adenocarcinomas de próstata e rim apresentaram marcação em aproximadamente 70% dos casos, pois por serem carcinomas epiteliais possuem características comuns, como por exemplo a expressão das KRT8, 18 e 19 (29), do antígeno carcinoembrionico (CEA), e de outras proteínas como o B72.3, Ber-Ep4 e LeuM1 (73-75) estes marcadores são expressos em muitos adenocarcinomas, mostrando as semelhanças destes tumores.

Em relação a espectrometria de massa feita com as proteínas provenientes das células TPC1 (Tabela 9) e proteínas de pacientes com CP ou bócio (Tabela 10), foram identificadas várias proteínas alvos do ligante CaT12, principalmente queratinas. As proteínas de células TPC1 capturadas e eluídas foram sequenciadas e resultaram na identificação das algumas proteínas, das quais sete delas são queratinas que atualmente estão sendo relacionadas a cânceres epiteliais, como cólon (76), boca (77) e mama (69, 78). De fato, os fragmentos de queratinas têm sido encontradas em soro de pacientes com nódulos da tiróide (79) e podem estar associados com o risco de metástases (80). Adicionalmente, a KRT19 é largamente utilizada em imunohistoquímica para o diagnóstico diferencial de lesões foliculares (49), embora não tenha sido encontrada neste trabalho na espectrometria de massa. As KRTs 7 e 20 também são utilizadas para o diagnóstico diferencial de muitos tumores (40-42, 51).

No entanto, devido à menor especificidade e afinidade de ligação do peptídeo sintético em comparação com o fago recombinante, é possível que o peptídeo se ligue a uma parte do conservada da queratina, o que pode explicar o alinhamento (ocorrências) de fragmentos da

proteína digerida com muitas seqüências de queratinas. Por outro lado, a maior especificidade encontrado para o fago CaT12 sugere que a sequência peptídica fundida na sequência amino-terminal da proteína pIII do capsídeo viral pode melhorar a afinidade de ligação.

A outra proteína hornerin ou S100A18 ainda é pouco estudada, mas outras proteínas da mesma família S100 já foram associadas indiretamente ao câncer, pois participam na ativação e inibição de genes associados as neoplasias como p53 e PTEN (81). Os padrões de expressão de S100A2 e S100A6 foram verificadas em neoplasias da tiróide e sugere-se que S100A2 e S100A6 possam contribuir para a progressão do carcinoma papilífero (82). O marcador S100 é utilizado na anátomo patológico para identificar melanomas (83).

Quando o experimento de captura das proteínas ligantes ao CaT12 foi repetido utilizando proteínas de pacientes com CP e bócio, outras proteínas além das queratinas e da S100A18 foram encontradas (Tabela 10) tais como vimentina, OMP, histonas, HMGI, filagrina 2, actina, proteínas ribossomais e nucleares, contudo, a possibilidade da proteína ligante ao CaT12 ser proteínas nucleares é pequena, já que a marcação observada foi principalmente citoplasmática.

Para as análise de expressão gênica, dos genes que codificam as proteínas que se repetiram nas duas análises de espectrometria de massa, verificou-se que as queratinas KRT5 e KRT14 foram mais expressas no CPC e no grupo maligno (CPC+CPVF). Pesquisas têm mostrado que ambas as queratinas estão envolvidas na manutenção da proliferação das células epiteliais (84), e podem ser co-expressas em muitos tumores, mas a expressão isolada de KRT5 ou de KRT14 também pode existir (85).

Existem dificuldades morfológicas em diferenciar adenomas de CPVF, nossos resultados demonstraram que a KRT2 e KRT10 podem auxiliar nesta diferenciação, podendo ser útil no diagnóstico diferencial dos adenomas, já que existe uma dificuldade de diferenciar durante a citologia (PAAF) adenomas dos carcinomas papilíferos de variante folicular. A KRT10 (Figura 9-B) também consegue diferenciar estas duas variantes; essas queratinas usadas em conjunto podem ajudar no diagnóstico antes da cirurgia de retirada da glândula.

O peptídeo CaT12, sintetizado em diferentes formas, foi também submetido aos ensaios de citotoxicidade e análise do perfil inflamatório (TNF- α) para verificar a possibilidade de seu uso como carreador de fármaco anti-tumoral. A maioria dos tratamentos com fármacos anti-neoplasicos, atualmente, ao serem administrados, exercem efeitos sistêmicos com baixa especificidade, promovendo, também, a morte de células normais. No entanto, a nanotecnologia

tem emergido rapidamente como um campo de pesquisa com potencial aplicação em diagnóstico e em terapia, a modificação de moléculas em nanocarreadores pode levar a inúmeras vantagens frente aos sistemas convencionais, como capacidade de atravessar barreiras biológicas, modular a distribuição do fármaco, diminuir a toxicidade, aumentar o tempo de circulação de substâncias lábeis ou rapidamente eliminadas (proteínas e peptídeos), veicular fármacos hidrofóbicos entre outras (86-88). Fármacos específicos para células tumorais têm sido ativamente buscados por muitos pesquisadores (89).

Recentemente, uma molécula derivada do ácido araquidônico a 15dixi^{12,14}prostraglandina₂ (15d-PGJ₂) tem demonstrado diversos efeitos biológicos de interesse médico (90-92), dentre eles uma atividade antiinflamatória e antitumoral. Entretanto, a 15d-PGJ₂ tem uma capacidade eletrofílica, podendo assim, se ligar a várias proteínas do meio extracelular como, por exemplo, na albumina que é uma proteína encontrada em maior concentração no plasma. Experimentos *in vitro* demonstram que mais de 90% da 15d-PGJ₂ é inativada no meio extracelular, de forma que apenas um pequeno percentual da 15d-PGJ₂ administrada tem uma atividade intracelular (93).

Napimoga et al. (60, 94) demonstraram que a eficácia da 15d-PGJ₂ encapsulada aumentou significativamente se comparada a 15d-PGJ₂ aplicada livremente, sendo necessária uma quantidade 33 vezes menor de 15d-PGJ₂ (1000 µg/kg de 15d-PGJ₂ pura contra 30 µg/kg de 15d-PGJ₂ encapsulada) a fim de obter a mesma eficácia terapêutica em diferentes modelos de inflamação (carragenina, LPS e inflamação imune). Além disso, observaram que a concentração plasmática de 15d-PGJ₂ permaneceu elevada por até 24 horas após a aplicação desta formulação (59).

Em relação, ao CaT12, a ausência de produção de citocinas inflamatórias e citotoxicidade, possibilita que este peptídeo possa ser utilizado como carreador de droga, principalmente, a 15d-PGJ₂, uma vez que essa molécula apresentou-se tóxica para as células cancerígenas. Além de causar apoptose nas células TPC1 como demonstrado neste trabalho, outros trabalhos também demonstraram que a 15d-PGJ₂ induz a apoptose em células cancerígenas K562, HL-60 (leucemia) e SNU-C4 (cólon retal) (95) e em outras células tumorais, tais como, estômago, pâncreas e pulmão (96-100).

Outros peptídeos ligantes de membrana, selecionados previamente também serão testados para uso diagnóstico e como carreador de drogas. De todos os 105 peptídeos selecionados o CaT19, CaT42 e CaT66 foram os melhores nos testes de ligação as células TPC1 e NPA e serão testados em outras plataformas de diagnóstico para que possam ser usados futuramente, se mostrarem resultados que favoreçam suas aplicações.

CONCLUSÃO

Concluiu-se que:

- O fago CaT12 selecionado por *Phage Display* mostrou-se reativo e diferencialmente expresso nas diferentes lesões foliculares tireoideanas.

- CaT12 foi útil para identificar adenocarcinomas de mama, próstata e de rim, mostrando não ser específico para tireoide, mas específico de malignidade.

- Os possíveis alvos do CaT12 são: KRT1, KRT2, KRT5, KRT6A, KRT9, KRT10, KRT14 e S100A18.

- As queratinas KRT5 e KRT14 foram mais expressas no CPC e no grupo maligno (CPC+CPVF), enquanto as KRT2, KRT6A e KRT10 foram mais expressas no grupo benigno (bócio e adenoma).

- As queratinas KRT2 e KRT10 podem ser útil no diagnóstico diferencial dos adenomas, já que existe uma dificuldade de diferenciar durante a citologia (PAAF) adenomas dos carcinomas papilíferos de variante folicular.

- O peptídeo CaT12 não é tóxico para as células NPA e TPC1.

- O peptídeo CaT12 não produz TNF- α quando usado para estimular células do baço de camundongo isogênico.

- A droga 15d-PGJ₂ causa apoptose em células TPC1.

- Os clones CaT19, CaT42 e CaT66 foram os mais reativos quando testados em células inteiras das linhagens TPC1 e NPA.

REFERÊNCIAS

1. Aires MM. Fisiologia. S.A. GK, editor. Rio de Janeiro 2008.
2. Moore KL. Embriologia Clínica. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004.
3. Volpi EF, C.; Kulcsar, M.A. Câncer da tireóide: Abordagem multidisciplinar. S.A. GK, editor 2010.
4. Kierszenbaum AL. Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia. Elsevier, editor. São Paulo 2008.
5. Nelson DLC, M.M. Bioquímica. Artmed, editor. Porto Alegre 2011.
6. Boron WFB, E.L. Fisiologia Médica. Elsevier, editor. São Paulo 2003.
7. INCA. Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil. 2013 [cited 2013 Julho 2013]; Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/>.
8. N. KVAAKF. Robbins e Cotran - Patologia - Bases Patológicas. Elsevier, editor. São Paulo 2005.
9. Society AC. Thyroid cancer. 2013 [cited 2013 Agosto 2013]; Available from: <http://www.cancer.org>.
10. Parthasarathy KL, Crawford ES. Treatment of thyroid carcinoma: emphasis on high-dose 131I outpatient therapy. Journal of nuclear medicine technology. [Review]. 2002 Dec;30(4):165-71; quiz 72-3.
11. Sawka AM, Prebtani AP, Thabane L, Gafni A, Levine M, Young WF, Jr. A systematic review of the literature examining the diagnostic efficacy of measurement of fractionated plasma free metanephrines in the biochemical diagnosis of pheochromocytoma. BMC endocrine disorders. 2004 Jun 29;4(1):2.
12. Torlontano M, Attard M, Crocetti U, Tumino S, Bruno R, Costante G, et al. Follow-up of low risk patients with papillary thyroid cancer: role of neck ultrasonography in detecting lymph node metastases. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. [Clinical Trial Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2004 Jul;89(7):3402-7.
13. van de Graaf SA, Ris-Stalpers C, Pauws E, Mendive FM, Targovnik HM, de Vijlder JJ. Up to date with human thyroglobulin. The Journal of endocrinology. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2001 Aug;170(2):307-21.
14. DeGroot LJ, Kaplan EL, Shukla MS, Salti G, Straus FH. Morbidity and mortality in follicular thyroid cancer. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1995 Oct;80(10):2946-53.

15. L.M. SCAD. Laboratory Support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease. 2002.
16. Barraclough BM, Barraclough BH. Ultrasound of the thyroid and parathyroid glands. World journal of surgery. [Review]. 2000 Feb;24(2):158-65.
17. Jo VY, Stelow EB, Dustin SM, Hanley KZ. Malignancy risk for fine-needle aspiration of thyroid lesions according to the Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. American journal of clinical pathology. 2010 Sep;134(3):450-6.
18. Piana S, Frasoldati A, Ferrari M, Valcavi R, Froio E, Barbieri V, et al. Is a five-category reporting scheme for thyroid fine needle aspiration cytology accurate? Experience of over 18,000 FNAs reported at the same institution during 1998-2007. Cytopathology : official journal of the British Society for Clinical Cytology. 2011 Jun;22(3):164-73.
19. Barbas C.F.; Burton DRS, J.K.; Silverman, G.J. Phage Display a Laboratory Manual2004.
20. Bioinformatic. Vector: Bacteriophage lambda and M13. 2010 [cited 2013 Abril 2013]; Available from: <http://bioinfo2010.wordpress.com/2009/07/08/vector-bacteriophage-lambda-and-m13-7th-april/>.
21. Romanov VI, Durand DB, Petrenko VA. Phage display selection of peptides that affect prostate carcinoma cells attachment and invasion. The Prostate. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 2001 Jun 1;47(4):239-51.
22. Azzazy HM, Highsmith WE, Jr. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. Clinical biochemistry. [Review]. 2002 Sep;35(6):425-45.
23. Dybwad A, Lambin P, Sioud M, Zouali M. Probing the specificity of human myeloma proteins with a random peptide phage library. Scandinavian journal of immunology. [In Vitro Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2003 Jun;57(6):583-90.
24. Biolabs NE. Phage Display Peptide Library. 2013 [cited 2013 Abril 2013]; Available from: <http://www.neb.com>.
25. Giordano RJ, Cardo-Vila M, Lahdenranta J, Pasqualini R, Arap W. Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands. Nature medicine. [Research Support, Non-U.S. Gov'tResearch Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 2001 Nov;7(11):1249-53.
26. Reis CF. Seleção e identificação de peptídeos ligantes à carcinoma papilífero de tireóide por Phage Display. Campinas-SP: Universidade Estadual de Campinas; 2009.
27. Reis CF, Carneiro AP, Vieira CU, Fujimura PT, Morari EC, Silva SJ, et al. An antibody-like peptide that recognizes malignancy among thyroid nodules. Cancer letters. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2013 Jul 28;335(2):306-13.
28. Ruggeri RM, Campenni A, Baldari S, Trimarchi F, Trovato M. What is New on Thyroid Cancer Biomarkers. Biomark Insights. 2008;3:237-52.

29. Karantza V. Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. *Oncogene*. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2011 Jan 13;30(2):127-38.
30. Moll R, Divo M, Langbein L. The human keratins: biology and pathology. *Histochemistry and cell biology*. [Review]. 2008 Jun;129(6):705-33.
31. Moll R, Schiller DL, Franke WW. Identification of protein IT of the intestinal cytoskeleton as a novel type I cytokeratin with unusual properties and expression patterns. *The Journal of cell biology*. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1990 Aug;111(2):567-80.
32. Takahashi K, Paladini RD, Coulombe PA. Cloning and characterization of multiple human genes and cDNAs encoding highly related type II keratin 6 isoforms. *The Journal of biological chemistry*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1995 Aug 4;270(31):18581-92.
33. Winter H, Langbein L, Praetzel S, Jacobs M, Rogers MA, Leigh IM, et al. A novel human type II cytokeratin, K6hf, specifically expressed in the companion layer of the hair follicle. *The Journal of investigative dermatology*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1998 Dec;111(6):955-62.
34. Magin TM, Reichelt J, Hatzfeld M. Emerging functions: diseases and animal models reshape our view of the cytoskeleton. *Experimental cell research*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2004 Nov 15;301(1):91-102.
35. Magin TM, Vijayaraj P, Leube RE. Structural and regulatory functions of keratins. *Experimental cell research*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2007 Jun 10;313(10):2021-32.
36. Pallari HM, Eriksson JE. Intermediate filaments as signaling platforms. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*. [Review]. 2006 Dec 19;2006(366):pe53.
37. Venetianer A, Schiller DL, Magin T, Franke WW. Cessation of cytokeratin expression in a rat hepatoma cell line lacking differentiated functions. *Nature*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1983 Oct 20-26;305(5936):730-3.
38. Santos M, Paramio JM, Bravo A, Ramirez A, Jorcano JL. The expression of keratin k10 in the basal layer of the epidermis inhibits cell proliferation and prevents skin tumorigenesis. *The Journal of biological chemistry*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2002 May 24;277(21):19122-30.
39. Schweizer J, Bowden PE, Coulombe PA, Langbein L, Lane EB, Magin TM, et al. New consensus nomenclature for mammalian keratins. *The Journal of cell biology*. 2006 Jul 17;174(2):169-74.
40. Hernandez BY, Frierson HF, Moskaluk CA, Li YJ, Clegg L, Cote TR, et al. CK20 and CK7 protein expression in colorectal cancer: demonstration of the utility of a population-based tissue microarray. *Human pathology*. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 2005 Mar;36(3):275-81.
41. Chu JJ, Chiang CD, Rao CS, Chang WM, Lai YK. Establishment and characterization of a paclitaxel-resistant human non-small cell lung cancer cell line. *Anticancer research*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2000 Jul-Aug;20(4):2449-56.

42. Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology*. [Review]. 2002 May;40(5):403-39.
43. Weber T, Lacroix J, Weitz J, Amnan K, Magener A, Holting T, et al. Expression of cytokeratin 20 in thyroid carcinomas and peripheral blood detected by reverse transcription polymerase chain reaction. *British journal of cancer*. 2000 Jan;82(1):157-60.
44. Yaziji H, Battifora H, Barry TS, Hwang HC, Bacchi CE, McIntosh MW, et al. Evaluation of 12 antibodies for distinguishing epithelioid mesothelioma from adenocarcinoma: identification of a three-antibody immunohistochemical panel with maximal sensitivity and specificity. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2006 Apr;19(4):514-23.
45. Schelfhout LJ, Van Muijen GN, Fleuren GJ. Expression of keratin 19 distinguishes papillary thyroid carcinoma from follicular carcinomas and follicular thyroid adenoma. *American journal of clinical pathology*. 1989 Nov;92(5):654-8.
46. Cui W, Sang W, Zheng S, Ma Y, Liu X, Zhang W. Usefulness of cytokeratin-19, galectin-3, and Hector Battifora mesothelial-1 in the diagnosis of benign and malignant thyroid nodules. *Clinical laboratory*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2012;58(7-8):673-80.
47. Mataraci EA, Ozguven BY, Kabukcuoglu F. Expression of cytokeratin 19, HBME-1 and galectin-3 in neoplastic and nonneoplastic thyroid lesions. *Polish journal of pathology : official journal of the Polish Society of Pathologists*. 2012 Mar;63(1):58-64.
48. Zhu X, Sun T, Lu H, Zhou X, Lu Y, Cai X, et al. Diagnostic significance of CK19, RET, galectin-3 and HBME-1 expression for papillary thyroid carcinoma. *Journal of clinical pathology*. [Evaluation Studies Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010 Sep;63(9):786-9.
49. de Matos PS, Ferreira AP, de Oliveira Facuri F, Assumpcao LV, Metze K, Ward LS. Usefulness of HBME-1, cytokeratin 19 and galectin-3 immunostaining in the diagnosis of thyroid malignancy. *Histopathology*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2005 Oct;47(4):391-401.
50. Leite KR, Mitteldorf CA, Srougi M, Dall'oglio MF, Antunes AA, Pontes J, Jr., et al. Cdx2, cytokeratin 20, thyroid transcription factor 1, and prostate-specific antigen expression in unusual subtypes of prostate cancer. *Annals of diagnostic pathology*. 2008 Aug;12(4):260-6.
51. Kitamura R, Toyoshima T, Tanaka H, Kawano S, Kiyosue T, Matsubara R, et al. Association of cytokeratin 17 expression with differentiation in oral squamous cell carcinoma. *Journal of cancer research and clinical oncology*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2012 Aug;138(8):1299-310.
52. Ono M, Kijima H, Seino H, Hakamada K, Igarashi Y. Expression of cytokeratin 34betaE12 is a good indicator of tumor progression in esophageal squamous cell carcinoma. *Biomed Res*. 2012 Jun;33(3):183-9.
53. Androulakis N, Agelaki S, Perraki M, Apostolaki S, Bozionelou V, Pallis A, et al. Clinical relevance of circulating CK-19mRNA-positive tumour cells before front-line treatment in patients with metastatic breast cancer. *British journal of cancer*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2012 Jun 5;106(12):1917-25.

54. Tunca B, Egeli U, Cecener G, Tezcan G, Gokgoz S, Tasdelen I, et al. CK19, CK20, EGFR and HER2 status of circulating tumor cells in patients with breast cancer. *Tumori*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2012 Mar-Apr;98(2):243-51.
55. Jain KK. *Handbook of Nanomedicine*. Press H, editor. Estados Unidos 2008.
56. Shekhar C. Lean and mean: nanoparticle-based delivery improves performance of cancer drugs. *Chemistry & biology*. 2009 Apr 24;16(4):349-50.
57. Singh R, Lillard JW, Jr. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and molecular pathology*. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Review]. 2009 Jun;86(3):215-23.
58. Faraji AH, Wipf P. Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorganic & medicinal chemistry*. [Research Support, N.I.H., Extramural Review]. 2009 Apr 15;17(8):2950-62.
59. Alves C, de Melo N, Fraceto L, de Araujo D, Napimoga M. Effects of 15d-PGJ(2)-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanocapsules on inflammation. *British journal of pharmacology*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011 Feb;162(3):623-32.
60. Napimoga MH, da Silva CA, Carregaro V, Farnesi-de-Assuncao TS, Duarte PM, de Melo NF, et al. Exogenous administration of 15d-PGJ2-loaded nanocapsules inhibits bone resorption in a mouse periodontitis model. *J Immunol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2012 Jul 15;189(2):1043-52.
61. Brown KC. Peptidic tumor targeting agents: the road from phage display peptide selections to clinical applications. *Current pharmaceutical design*. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2010;16(9):1040-54.
62. Gray BP, Li S, Brown KC. From phage display to nanoparticle delivery: functionalizing liposomes with multivalent peptides improves targeting to a cancer biomarker. *Bioconjugate chemistry*. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2013 Jan 16;24(1):85-96.
63. Alley SC, Okeley NM, Senter PD. Antibody-drug conjugates: targeted drug delivery for cancer. *Current opinion in chemical biology*. [Review]. 2010 Aug;14(4):529-37.
64. Barry MA, Dower WJ, Johnston SA. Toward cell-targeting gene therapy vectors: selection of cell-binding peptides from random peptide-presenting phage libraries. *Nature medicine*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1996 Mar;2(3):299-305.
65. Loi M, Marchio S, Becherini P, Di Paolo D, Soster M, Curnis F, et al. Combined targeting of perivascular and endothelial tumor cells enhances anti-tumor efficacy of liposomal chemotherapy in neuroblastoma. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010 Jul 1;145(1):66-73.
66. Lowery A, Onishko H, Hallahan DE, Han Z. Tumor-targeted delivery of liposome-encapsulated doxorubicin by use of a peptide that selectively binds to irradiated tumors. *Journal of controlled release :*

official journal of the Controlled Release Society. [Research Support, N.I.H., Extramural]. 2011 Feb 28;150(1):117-24.

67. Reichert JM, Valge-Archer VE. Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics. *Nature reviews Drug discovery*. [Review]. 2007 May;6(5):349-56.

68. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.

69. Matsuo AL, Tanaka AS, Juliano MA, Rodrigues EG, Travassos LR. A novel melanoma-targeting peptide screened by phage display exhibits antitumor activity. *J Mol Med (Berl)*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010 Dec;88(12):1255-64.

70. Du B, Han H, Wang Z, Kuang L, Wang L, Yu L, et al. targeted drug delivery to hepatocarcinoma in vivo by phage-displayed specific binding peptide. *Molecular cancer research : MCR*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010 Feb;8(2):135-44.

71. Sethi K, Sarkar S, Das S, Mohanty B, Mandal M. Biomarkers for the diagnosis of thyroid cancer. *Journal of experimental therapeutics & oncology*. [Review]. 2010;8(4):341-52.

72. Zwick MB, Bonnycastle LL, Noren KA, Venturini S, Leong E, Barbas CF, 3rd, et al. The maltose-binding protein as a scaffold for monovalent display of peptides derived from phage libraries. *Analytical biochemistry*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1998 Nov 1;264(1):87-97.

73. Esteban JM, Yokota S, Husain S, Battifora H. Immunocytochemical profile of benign and carcinomatous effusions. A practical approach to difficult diagnosis. *American journal of clinical pathology*. [Comparative Study Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1990 Dec;94(6):698-705.

74. Nance KV, Silverman JF. Immunocytochemical panel for the identification of malignant cells in serous effusions. *American journal of clinical pathology*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1991 Jun;95(6):867-74.

75. Silverman JF, Nance K, Phillips B, Norris HT. The use of immunoperoxidase panels for the cytologic diagnosis of malignancy in serous effusions. *Diagnostic cytopathology*. 1987 Jun;3(2):134-40.

76. Hu S, Guo X, Xie H, Du Y, Pan Y, Shi Y, et al. Phage display selection of peptides that inhibit metastasis ability of gastric cancer cells with high liver-metastatic potential. *Biochemical and biophysical research communications*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2006 Mar 24;341(4):964-72.

77. Liang S, Lin T, Ding J, Pan Y, Dang D, Guo C, et al. Screening and identification of vascular-endothelial-cell-specific binding peptide in gastric cancer. *J Mol Med (Berl)*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2006 Sep;84(9):764-73.

78. Mazuet C, Lerouge D, Poul MA, Blin N. Breast carcinoma specific antibody selection combining phage display and immunomagnetic cell sorting. *Biochemical and biophysical research communications*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2006 Sep 22;348(2):550-9.

79. Giovannella L, Ceriani L, Ghelfo A, Maffioli M. Circulating cytokeratin 19 fragments in patients with benign nodules and carcinomas of the thyroid gland. *The International journal of biological markers*. [Comparative Study]. 2008 Jan-Mar;23(1):54-7.
80. Appetecchia M, Mecule A, Ducci M, Palma L, Castelli M. Serum cytokeratins determination in differentiated thyroid carcinoma. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. [Comparative Study]. 2001 Jun;20(2):253-6.
81. Jia WD, Sun HC, Zhang JB, Xu Y, Qian YB, Pang JZ, et al. A novel peptide that selectively binds highly metastatic hepatocellular carcinoma cell surface is related to invasion and metastasis. *Cancer letters*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2007 Mar 18;247(2):234-42.
82. Oyama T, Sykes KF, Samli KN, Minna JD, Johnston SA, Brown KC. Isolation of lung tumor specific peptides from a random peptide library: generation of diagnostic and cell-targeting reagents. *Cancer letters*. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 2003 Dec 30;202(2):219-30.
83. Ortiz B, Vazquez C, Martinez C, Gimenez J, Sanmartin O, de los Dolores V, et al. [S100 protein as tumoral marker in melanoma patients. Comparative study with sentinel node biopsy and whole body FDG-PET]. *Revista espanola de medicina nuclear*. [Comparative Study]. 2003 Mar-Apr;22(2):87-96.
84. Alam H, Sehgal L, Kundu ST, Dalal SN, Vaidya MM. Novel function of keratins 5 and 14 in proliferation and differentiation of stratified epithelial cells. *Molecular biology of the cell*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011 Nov;22(21):4068-78.
85. Laakso M, Loman N, Borg A, Isola J. Cytokeratin 5/14-positive breast cancer: true basal phenotype confined to BRCA1 tumors. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2005 Oct;18(10):1321-8.
86. Kreuter J. Nanoparticles--a historical perspective. *International journal of pharmaceutics*. [Historical Article Portraits]. 2007 Feb 22;331(1):1-10.
87. Kreuter J, Hekmatara T, Dreis S, Vogel T, Gelperina S, Langer K. Covalent attachment of apolipoprotein A-I and apolipoprotein B-100 to albumin nanoparticles enables drug transport into the brain. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2007 Mar 12;118(1):54-8.
88. Morales L, Canney P, Dyczka J, Rutgers E, Coleman R, Cufer T, et al. Postoperative adjuvant chemotherapy followed by adjuvant tamoxifen versus nil for patients with operable breast cancer: a randomised phase III trial of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Breast Group. *Eur J Cancer*. [Clinical Trial, Phase III Multicenter Study Randomized Controlled Trial Research Support, N.I.H., Extramural]. 2007 Jan;43(2):331-40.
89. Hait WN. Anticancer drug development: the grand challenges. *Nature reviews Drug discovery*. 2010 Apr;9(4):253-4.

90. Haskew-Layton RE, Payappilly JB, Xu H, Bennett SA, Ratan RR. 15-Deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 (15d-PGJ2) protects neurons from oxidative death via an Nrf2 astrocyte-specific mechanism independent of PPARgamma. *Journal of neurochemistry*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2013 Feb;124(4):536-47.
91. Li H, Pauza CD. Effects of 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 (15d-PGJ2) and rosiglitazone on human gammadelta2 T cells. *PloS one*. [Research Support, N.I.H., Extramural]. 2009;4(11):e7726.
92. Quinteiro MS, Napimoga MH, Mesquita KP, Clemente-Napimoga JT. The indirect antinociceptive mechanism of 15d-PGJ2 on rheumatoid arthritis-induced TMJ inflammatory pain in rats. *Eur J Pain*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2012 Sep;16(8):1106-15.
93. Oh JY, Giles N, Landar A, Darley-USmar V. Accumulation of 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2 adduct formation with Keap1 over time: effects on potency for intracellular antioxidant defence induction. *The Biochemical journal*. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2008 Apr 15;411(2):297-306.
94. Clemente-Napimoga JT, Moreira JA, Grillo R, de Melo NF, Fraceto LF, Napimoga MH. 15d-PGJ2-loaded in nanocapsules enhance the antinociceptive properties into rat temporomandibular hypernociception. *Life sciences*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2012 Jun 14;90(23-24):944-9.
95. Shin SW, Seo CY, Han H, Han JY, Jeong JS, Kwak JY, et al. 15d-PGJ2 induces apoptosis by reactive oxygen species-mediated inactivation of Akt in leukemia and colorectal cancer cells and shows in vivo antitumor activity. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 Sep 1;15(17):5414-25.
96. Chen YX, Zhong XY, Qin YF, Bing W, He LZ. 15d-PGJ2 inhibits cell growth and induces apoptosis of MCG-803 human gastric cancer cell line. *World journal of gastroenterology : WJG*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2003 Oct;9(10):2149-53.
97. Hashimoto K, Farrow BJ, Evers BM. Activation and role of MAP kinases in 15d-PGJ2-induced apoptosis in the human pancreatic cancer cell line MIA PaCa-2. *Pancreas*. [Research Support, Non-U.S. Gov't; Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 2004 Mar;28(2):153-9.
98. Kanunfre CC, da Silva Freitas JJ, Pompeia C, Goncalves de Almeida DC, Cury-Boaventura MF, Verlengia R, et al. Ciglitazone and 15d PGJ2 induce apoptosis in Jurkat and Raji cells. *International immunopharmacology*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2004 Sep;4(9):1171-85.
99. Wang JJ, Mak OT. Induction of apoptosis by 15d-PGJ2 via ROS formation: an alternative pathway without PPARgamma activation in non-small cell lung carcinoma A549 cells. *Prostaglandins & other lipid mediators*. 2011 Apr;94(3-4):104-11.
100. Xiang Z, Lin T, Reeves SA. 15d-PGJ2 induces apoptosis of mouse oligodendrocyte precursor cells. *Journal of neuroinflammation*. [Comparative Study]. 2007;4:18.

ANEXO I:
Aprovação do Comitê de Ética

São Paulo, 14 de Setembro de 2009.

Ao
Dr. Fernando Augusto Soares

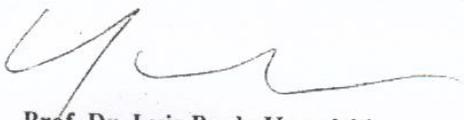
Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1259/09
“Análise de Biomarcadores de Resposta Imunológica em Carcinoma bem Diferenciado da Tireóide”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 08/09/2009, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 23/06/2009, aprovaram a realização do estudo em referência, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com Resoluções do CNS;
- Declaração sobre o plano de recrutamento dos sujeitos de pesquisa, circunstâncias e responsáveis pela obtenção do TCLE;
- Orçamento Financeiro detalhado;
- Ofício/DPR/CAPES/Nº 170/2008;
- Declaração sobre os dados coletados, publicação dos dados e propriedade das informações geradas;
- Declaração sobre uso e destino do material biológico, publicação dos dados e propriedade das informações geradas;
- Declaração de infra-estrutura e instalações;
- Carta de responsabilidade da Chefe do Laboratório de Genética Molecular do Câncer – UNICAMP;
- Acordo de Cooperação entre o Laboratório de Investigação em Patologia/Patologia Molecular (LIP-PM) do Centro de Investigação em Pediatria (CIPED) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e o Laboratório de Patologia Investigativa (LPI) do Departamento de Anatomia Patológica (CAP) do Hospital do Câncer de São Paulo, A.C. Camargo;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 06 meses.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131
e-mail: cep@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº. 249/09 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO REGISTRO
CEP/UFU 026/09

Projeto Pesquisa: SELEÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E VALIDAÇÃO CLÍNICA DE PEPTÍDEOS
MIMÉTRICOS E LIGANTES DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS A TUMORES DE CABEÇA E
PESCOÇO OBTIDOS POR PHAGE DISPLAY.

Pesquisador Responsável: LUIZ RICARDO GOULART FILHO

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.
O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Data de entrega do primeiro relatório parcial: fevereiro de 2010
Data de entrega do segundo relatório parcial: fevereiro de 2011
Data de entrega do terceiro relatório parcial: fevereiro de 2012
Data de entrega do relatório final: fevereiro de 2013.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO

O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA
IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 19 de junho de 2009.

Profa. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado
Coordenadora do CEP/UFU

Orientações ao pesquisador

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

ANEXO II:

Patente

RESUMO

“ANTICORPOS E PEPTÍDEOS LIGANTES À TECIDOS TUMORAIS E SUAS APLICAÇÕES”

A presente invenção refere-se ao uso da técnica de *Phage Display* para a seleção, caracterização e utilização de fragmentos de anticorpos scFv (single-chain variable fragments) e peptídeos ligantes à tecidos cancerígenos, em particular câncer de tireoide. Os fragmentos de anticorpos e os peptídeos selecionados, por serem ligantes específicos de câncer, podem ser potencialmente usados em imunodiagnósticos, como carreadores de drogas ou como biomarcadores.

Prezado Professor,

A Diretoria de Inovação e Transferência de Tecnologia, cuja missão é gerir as diretrizes políticas de propriedade intelectual, de inovação e transferência de tecnologia na UFU, informa que o depósito do Pedido de Patente de sua autoria e outros, protocolado no Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI recebeu despacho, conforme dados:

Patente	PI 1103676-1 A2
Inventor(a)	Luiz Ricardo Goulart Filho e outros
Título	“ Anticorpos e Peptídeos Ligantes À Tecidos Tumorais E Suas Aplicações”
Natureza	Patente de Invenção
Data	08/04/2011
Despacho	2.1 Notificação de Depósito de Pedido de Patente (Revista RPI n. 2141– 17/01/2012)

ANEXO III:

**Artigo publicado na revista *Cancer
letters***



An antibody-like peptide that recognizes malignancy among thyroid nodules



Carolina Fernandes Reis^a, Ana Paula Carneiro^a, Carlos Ueira Vieira^b, Patrícia Tiemi Fujimura^b, Elaine Cristina Morari^a, Sindeval José da Silva^c, Luiz Ricardo Goulart^{b,*}, Laura Sterian Ward^{a,*}

^aLaboratory of Cancer Molecular Genetics, Faculty of Medical Sciences (FCM), University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

^bLaboratory of Nanobiotechnology, Federal University of Uberlândia, Institute of Genetics and Biochemistry (INGEB), Uberlândia, MG, Brazil

^cDepartment of Head and Neck Surgery, Clinical Hospital of Federal University of Uberlândia (HC-UFU), Uberlândia, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 September 2012

Received in revised form 1 February 2013

Accepted 18 February 2013

Keywords:

Thyroid cancer

Phage display

Biomarker

Papillary tumor

ABSTRACT

There is an urgent need for biomarkers to identify malignant thyroid nodules from indeterminate follicular lesions. We have used a subtractive proteomic strategy to identify novel biomarkers by selecting ligands to goiter tissue from a 12-mer random peptide phage-displayed library using the BRASIL method (Biopanning and Rapid Analysis of Selective Interactive Ligands). After three rounds of selection, two highly reactive clones to the papillary thyroid tumor cell line NPA were further evaluated, and their specific binding to tumor proteins was confirmed using phage-ELISA. The antibody-like peptide CaT12 was tumor-specific, which was further tested by immunohistochemistry against TMAs (tissue microarrays) comprised of 775 human benign and malignant tissues, including 232 thyroid nodular lesions: 15 normal thyroid tissues, 53 nodular goiters (NG), 54 follicular adenomas (FA); 69 papillary thyroid carcinomas (PTC); and 41 follicular carcinomas (FC). CaT12 was able to identify PTC among thyroid nodular lesions with 91.2% sensitivity and 85.1% specificity, despite its non-specificity for thyroid tissues. Additionally, the CaT12 peptide helped characterize follicular lesions distinguishing the follicular variant of PTC (FVPTC) from FA with 91.9% accuracy; FVPTC from NG with 83.1% accuracy; FVPTC from the classic PTC with 57.7% accuracy; and FVPTC from FC with 88.7% accuracy. In conclusion, our strategy to select differentially expressed ligands to thyroid tissue was highly effective and resulted in a useful antibody-like biomarker that recognizes malignancy among thyroid nodules and may help distinguish follicular patterned lesions.

© 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Thyroid cancer incidence rates have steadily increased over the past few decades all over the world [1] and 56,460 new patients are estimated to be diagnosed during 2012 in the USA [2]. The accessible use of sensitive imaging detection methods is mainly responsible for this increased incidence [3]. However, there are evidences that other factors, including the exposure to environmental carcinogenic factors, may have also contributed to this phenomenon [3,4]. We have actually experienced real epidemics of thyroid nodules referred to specialized diagnosis, and the cytological exam of fine-needle cell aspiration is the recommended meth-

od by current guidelines to distinguish benign from malignant lesions [5].

In most cases, the clinical features of the patients based on ultrasonography and cytological findings enable appropriate case management [5]. However, up to one third of the nodules submitted to fine needle aspiration biopsies may present an "indeterminate" cytology, a pattern that remains burdened with inter-observer variability and uncertainty regarding management [6]. Even the most experienced pathologists may have difficulties distinguishing cases of follicular variants of papillary thyroid carcinomas from simple benign hyperplasia, and many cases of follicular adenomas are submitted to unnecessary surgeries because it is virtually impossible to eliminate the risk of a follicular carcinoma in cytological analyses [7]. A series of molecular markers for malignancy have been proposed and many of them appear to be effective in reducing uncertainties [8,9]. However, clinical problems concerning diagnosis of thyroid malignancies are not solved, and certainly are not appropriate to large populations.

In the present investigation, we have used a different approach to distinguish thyroid malignancies. We employed phage display

* Corresponding authors. Addressess: Laboratory of Nanobiotechnology, Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia (UFU), Campus Umuarama, Bl 2E, R. 248, 38400-902 Uberlândia, MG, Brazil (L.R. Goulart), Laboratory of Cancer Molecular Genetics, School of Medical Sciences, University of Campinas (FCM-UNICAMP), Rua Tessalia Vieira de Camargo 126, Barão Geraldo, 13083-887 Campinas, SP, Brazil. Tel.: +55 19 35218954; fax: +55 19 35218925 (L.S. Ward).

E-mail address: ward@unicamp.br (L.S. Ward).