

MARCO ANTONIO ARAP

**Estudo da proteína de choque térmico
GRP78 para o desenvolvimento de um
sistema de receptor-ligante para o
câncer de próstata**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Área de concentração:

Urologia

Orientador: Prof.Dr. Álvaro Sadek Sarkis

São Paulo
2003

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Arap, Marco Antonio

Estudo da proteína de choque térmico GRP78 para o desenvolvimento de um sistema de receptor-ligante para o câncer de próstata / Marco Antonio Arap. -- São Paulo, 2003.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Cirurgia.

Área de concentração: Urologia.

Orientador: Álvaro Sadek Sarkis.

Descritores: 1.NEOPLASIAS PROSTÁTICAS/diagnóstico 2.NEOPLASIAS PROSTÁTICAS/genética 3.EXPRESSÃO GÊNICA/genética 4.MARCADORES BIOLÓGICOS DE TUMOR/análise 5.METÁSTASE NEOPLÁSICA 6.ESTADIAMENTO DE NEOPLASIAS 7.BACTERIÓFAGOS/crescimento & desenvolvimento 8.BACTERIÓFAGOS/genética 9.IMUNOHISTOQUÍMICA / métodos 10.ELISA/métodos 11.SÍTIOS DE LIGAÇÃO (MICROBIOLOGIA)/genética 12.LIGANTES 13.CAMUNDONGOS NUS

USP/FM/SBD-410/03

“Há verdadeiramente duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe. A ciência consiste em saber; em crer que se sabe, reside a ignorância.”

(Hipócrates)

Aos meus amados e mais do que presentes pais, Astrid e Sami, pela sua dedicação, apoio, carinho e amor sem limites. Deles herdei o verdadeiro prazer pelo estudo da Medicina.

À minhas irmãs Francine e Astrid e aos meus cunhados Victor e Julio, pela amizade sincera.

À meus sobrinhos Victor e Stephanie, alegrias da família.

À meus queridos avós Wadih, Antonio, Zackie e Najla, exemplos a serem seguidos.

Aos pacientes que me deram o privilégio de poder acompanhá-los e aos que ainda hei de tratar, a quem espero poder ajudar com a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

- Ao meu pai e Prof. Sami Arap, a quem amo e admiro não só pela sua capacidade profissional, social e humana, que me dirigem e sempre hão de me inspirar em todas as dificuldades e conquistas de minha carreira, mas também pela sua dedicação à família, valor maior em minha vida.
- Ao meu Orientador, Prof. Dr. Álvaro Sadek Sarkis, a quem tenho profundo respeito e admiração pelo profissional e pela pessoa que representa, e a quem agradeço o apoio e aprendizado que me proporcionou.
- A meus orientadores americanos, Prof. Dr. Wadih Arap e Profa. Dra. Renata Pasqualini, cuja contribuição foi indispensável em todas as etapas deste trabalho, tanto do ponto de vista científico como operacional. Os Drs. Arap e Pasqualini são os diretores do Laboratório A/P, pertencente aos Departamentos de Biologia do Câncer e Oncologia Gêrito-Urinária do M. D. Anderson Cancer Center, Universidade do Texas (UT), Houston, onde todos os experimentos científicos desta Tese foram executados.
- Ao Prof. Dr. Christopher Logothetis, Chefe do Departamento de Oncologia Gêrito-Urinária do M. D. Anderson Cancer Center, Universidade do Texas, Houston, por me ter aceito como *fellow* em Uro-oncologia no seu programa e por me proporcionar total apoio em todos os momentos da minha estadia no exterior.
- Aos meus colegas no Laboratório de Oncologia Gêrito-Urinária da UT, pelas suas contribuições, ensinamentos, auxílio, atenção e simpatia: Johanna Lahdenranta, Amin Hajitou, Paul J. Mintz, Mikhail Kolonin, Amado Zurita, Limor Chen, Laura Bover, Akihiko Kunyiasu, Catherine

Moya, Marina Cardó-Vila, Connie Sun, Jessica Sun, Katherine Leskin, Michael Osawa e Israel Ramirez.

- Ao amigo Dr. Leopoldo Alves Ribeiro Filho, pelo auxílio e pelas sugestões na elaboração desta Tese, agradeço a amizade e o apoio, sempre presentes na realização deste trabalho.
- Aos Drs. Jose Roberto Colombo Jr., Luis Baltazar Saldanha e Ioannis Michel Antonopoulos, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelas contribuições na coleta do material estudado.
- Aos colegas médicos, enfermeiros, auxiliares e funcionários da Disciplina de Urologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela atenção e paciência na minha formação
- Aos Profs. Drs. Anuar Ibrahim Mitre, Flávio Eduardo Trigo Rocha e Emmanuel Dias Neto, pelas suas preciosas sugestões quando da aula de qualificação.
- À Dra. Kim-Anh Doh pela revisão da análise estatística empregada nesta Tese.
- À Elisa de Arruda Cruz da Silva e Maria de Fátima Diniz, pelo auxílio prestado durante a pós-graduação.
- Às Srta. Kay Brown e Sra. Monica Tucker, funcionárias do Departamento de Oncologia Gêrito-Urinária do M. D. Anderson Cancer Center, Universidade do Texas, Houston, pela sua atenção e ajuda durante todo o período que desenvolvi esta Tese no exterior.
- Aos pacientes, motivação principal de minha carreira, que gentilmente permitiram a obtenção das amostras teciduais utilizadas neste estudo
- A todas as outras pessoas que tenham participado direta ou indiretamente de qualquer etapa deste trabalho.

- O presente estudo foi financiado pelas bolsas de números CA90270, CA8297601, CA908001, do *National Institutes of Health*, EUA; por prêmios da Fundações Gillson-Longenbaugh, Fundação V, AngelWorks e CaP CURE.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

SUMMARY

| | |
|---|----|
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1 Câncer de próstata | 3 |
| 1.1.1 Epidemiologia | 3 |
| 1.1.2 Fatores de risco | 4 |
| 1.1.3 Patologia | 6 |
| 1.1.3.1 Tipos Histológicos | 6 |
| 1.1.3.2 Classificação e estadiamento | 6 |
| 1.1.4 Tratamento do câncer de próstata avançado | 9 |
| 1.2 Tecnologia de apresentação de bacteriófagos | 10 |
| 1.3 As proteínas reguladas pela glicose (Glucose-regulated proteins – GRP) | 17 |
| 1.4 Proteína-78 regulada pela glicose (Glucose-regulated protein-78 – GRP78) | 18 |
| 2. Objetivos | 20 |
| 3. Casuística e Métodos | 22 |
| 3.1 Clonagem dos peptídeos selecionados com afinidade à proteína GRP78 no vetor fUSE5 | 23 |
| 3.2 Testes de ligação dos fagos <i>in vitro</i> | 26 |
| 3.3 Inibição da ligação dos fagos <i>in vitro</i> com os peptídeos sintéticos | 27 |

| | | |
|------|---|----|
| 3.4 | Ligação dos fagos à células prostáticas malignas DU145..... | 28 |
| 3.5 | Inibição da ligação dos fagos às células prostáticas malignas DU145..... | 29 |
| 3.6 | Internalização dos fagos pelas células prostáticas DU145 | 30 |
| 3.7 | Estabelecimento dos modelos animais de câncer de próstata | 32 |
| 3.8 | Ensaio de rastreamento dos tumores prostáticos <i>in vivo</i> | 34 |
| 3.9 | Imunohistoquímica para detecção de fagos nos modelos animais de xeno-tumores prostáticos | 35 |
| 3.10 | Pacientes e espécimes teciduais | 36 |
| 3.11 | Ensaio de sobreposição de fagos em metástases ósseas de adenocarcinoma de próstata | 38 |
| 3.12 | Análise estatística..... | 39 |
| 4. | Resultados | 40 |
| 4.1 | Seleção de peptídeos, clonagem e amplificação dos fagos com afinidade à proteína de choque térmico GRP78..... | 41 |
| 4.2 | Ligação específica dos fagos à proteína GRP78 <i>in vitro</i> | 42 |
| 4.3 | Ligação específica dos fagos à células de câncer de próstata que expressam a GRP78 | 49 |
| 4.4 | Internalização dos fagos pelas células prostáticas malignas DU145 | 53 |
| 4.5 | Ligação dos fagos a tumores prostáticos <i>in vivo</i> | 55 |
| 4.6 | Ligação específica dos fagos à metástases ósseas de câncer de próstata | 57 |
| 5. | Discussão..... | 59 |
| 6. | Conclusões..... | 68 |
| 7. | Referências Bibliográficas | 70 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------|--|
| AJCC | <i>American Joint Committee on Cancer</i> |
| BSA | Albumina sérica bovina |
| DAB | 3,3 Diaminobenzidina tetrahidrocloreto |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| EDTA | ácido etileno diamino tetracético |
| et al. | e outros |
| FACS | Fluorescent activated cell sorting |
| g | gravidade |
| GRP78 | <i>Glucose regulated protein 78</i> |
| HSP70 | <i>Heat-shock protein 70</i> |
| HSP90 | <i>Heat-shock protein 90</i> |
| IgG | Imunoglobulina G |
| PBS | solução de NaCl a 0.9% tamponada com fosfato |
| PCR | Reação em cadeia de polimerase |
| PEG | Polietileno glicol |
| RGD | Arginina-Glicina-Aspártico, de acordo com o IUB-IUPAC (International Union of Biochemistry – International Union of Pure and Applied Chemistry - vide quadro 2). Idem para outras sequências mencionadas |
| TNM | Sistema de estadiamento (do inglês, <i>Tumor-Nodes-Metastasis</i>) |
| UT | Unidades transducentes |

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

