SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS LIGANTES A PROTEÍNAS TECIDUAIS DO CÂNCER DE MAMA POR PHAGE DISPLAY

Dra. Cristina Soares de Sousa [1]
Dr. Carlos Ueira Vieira [2]
Dr. Rone Cardoso [3]
Caxias Arlen Graciano de Souza [4]
Dra. Ana Maria Bonetti [5]
Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho [6]

RESUMO

O câncer de mama é uma das principais causas de morte em mulheres e ainda não existem medidas específicas de prevenção primária. A detecção precoce é o objetivo principal, visando à diminuição da mortalidade e aumento da sobrevida. Nesse trabalho foi utilizada a técnica de *Phage Display* para isolar peptídeos ligantes às proteínas do tecido câncer de mama para obtenção de biomarcadores que possam ser utilizados no diagnóstico e tratamento dessa patologia. Para seleção desses peptídeos foi realizado um *Bioppaning* subtrativo, no qual duas bibliotecas de peptídeos *Ph.D.-7* e *Ph.D.-12* expressas na superfície de fago filamentoso M13 foram colocadas primeiramente em contato com proteínas de tecido de mama normal, para que os fagos ligantes a proteínas do tecido normal fossem eliminados nessa etapa, e depois foram submetidas a três ciclos de seleção. O DNA dos fagos selecionados foi sequenciado e traduzido. As sequências peptídicas selecionadas foram analisadas por bioinformática e pelas técnicas ELISA, *dot-blotting*, *wertern-blotting* e imunohistoquímica para confirmar o sucesso da estratégia de seleção e para fornecer novos subsídios quanto aos prováveis alvos biológicos. A análise imunohistoquímica foi realizada com seis dos fagos selecionados (BC04, BC05, BC07, BC11, BC12, BC17) em câncer de mama e com a mistura de três deles (BC11, BC12, BC17), em câncer de mama, câncer de ovário, linfoma não-hodgkine melanoma. Todos os fagos selecionados apresentaram alto grau de informação e Razão do Indice ELISA acima de 1, o que é considerado significativo. Tanto em *Dot-blotting* quanto em *wertern-blotting*, os fagos se ligaram apenas a proteínas do tumor. Na imunohistoquímica pode-se observar marcação apenas de células tumorais. A mistura de fagos reconheceu proteínas do câncer de mama, câncerde ovário e linfoma maligno não-Hodgkin e não reconheceu proteínas do melanoma. Três fagos selecionados, BC04, BC05 e BC07 marcaram especificamente a parede vascular de células tumorais. Os fagos selecionados nesse trabalho podem, em um futuro próximo, ser utilizados como biomarcadores teciduais, podendo ajudar tanto no diagnóstico, quanto no tratamento do câncerde mama. O elevado grau de informação de cada peptídeo selecionado obtido pelas análises de bioinformática e os resultados obtidos nos testes ELISA, *Dot- blotting*, *Western-blotting* e imunohistoquímica validam os dados de *bioppaning* subtrativo e comprovam a eficiência da técnica de *Phage Display*.

Palavras-chave: Câncer de mama, *Phage Display*

ABSTRACT

Breast cancer is one of the main causes of death among women, as thereis no primary prevention. Early detection is the main objective aiming decrease mortality and increase survival.

1-Professora no Centro Universitário Mário Palmério
2-Professor na Universidade Federal de Uberlândia
3-Professor na Universidade Federal de Uberlândia
4-Professor no Centro Universitário Mário Palmério
5-Professora na Universidade Federal de Uberlândia

We used phage display technology to isolateligand peptides to breast cancer tissues in order to select potential biomarkers for the improvement of diagnosis and treatment. Two random peptide libraries with seven and twelve residues expressed in fusion with the pIII protein of the M13 bacteriophage, *Ph.D.-7* and *Ph.D.-12*, respectively, were firstly submitted to a pre clearing by placing them in contact with proteins of normal breast tissues, in oderto eliminate peptides that may recognize healthy tissues. Remaining phages in thesupernatant was further selected through three rounds of positive selection. DNA of selected phage were sequenced and translated. Peptide sequences were then submitted to bioinformatic analyzes, ELISA, *Dot-blotting*, *western-blotting* and immunohistochemistry assays to confirm the selection strategy and to provide further evidences of the putative biological targets. The immunohistochemistry analysis was performed with six selected phage (BC04, BC05, BC07, BC11,BC12, BC17) in breast cancer, and a mixture of three phage (BC11, BC12, BC17) has been tested in breast and ovary cancers, non-Hodgkin lymphoma, and melanoma. All phages presented high information content with significant ELISA indexes. The *Dot-blotting* and *western-blotting* assays have validated the selection by demonstrating high specificity to tumor proteins. The immunohistochemistry analyzes have shown specific binding only to tumor cells. The mixture of phages has recognized all types of tumor tissues, except melanoma. Three selectedphage, BC04, BC05 and BC07 have specifically marked the vascular walls of tumor cells. The selected phage may be used in the future as tissue biomarkersfor diagnosis and therapeutic procedures in breast cancer. The high information content and the significant data presented by all immunological assays havevalidated the *Phage Display* subtractive selection strategy.
Keywords: Breast cancer, Phage Display

INTRODUÇÃO

No Brasil, o câncer de mama feminino, se constitui na patologia maligna mais incidente nesta população, tem o seu quadro agravado pelo fato do diagnóstico ser estabelecido, na maioria das vezes, numa fase tardia da doença. Na grande maioria das instituições de câncer, os estadiamentos III e IV apresentam a cerca de 60% dos diagnósticos iniciais (1).

A busca do diagnóstico do câncer de mama em fases iniciais juntamente à incorporação e adoção de condutas terapêuticas sempre atualizadas pode aumentar e melhorar a sobrevida das mulheres com câncer de mama. O diagnóstico precoce possibilita o tratamento precoce podendo oferecer uma possibilidade de cura para o câncer de mama. Além da redução da mortalidade, o diagnóstico precoce facilita o tratamento do câncer, diminui sua morbidade e possibilita cirurgias mais conservadoras e mais estéticas (2). Atualmente, as formas mais eficazes para detecção precoce do câncer de mama são o exame clínico da mama e a mamografia (3).

As pesquisas em oncologia apontam que, no futuro, o diagnóstico precoce do câncer e os critérios de prognósticos serão guiados, principalmente, pelo monitoramento de marcadores tumorais. Muitos desses marcadores, os quais foram inicialmente identificados através de estudos moleculares ou bioquímicos, podem agora ser localizados em cortes de tecido pelo uso da imuno-histoquímica ou da hibridização *in situ*. Incluem-se uma variedade de proteínas, algumas das

quais associadas aos oncogenes e medidores da atividade proliferativa do tumor (4). Dentre os marcadores tumorais para o câncer de mama encontram-se os receptores hormonais (receptores de estrogênio e receptores de progesterona); c-erbB-2; catepsina D; MIB-1; PCNA e p53 (5).

A obtenção de novos biomarcadores que sirvam tanto como alvos diagnósticos como terapêuticos para o câncer de mama junto às metodologias já existentes para esse fim pode melhorar significativamente a qualidade de vida dasmulheres portadoras dessa patologia.

A tecnologia *Phage Display* pode beneficiar diagnósticos através da identificação de moléculas atualmente impossíveis de se obter por métodos tradicionais. Anticorpos recombinantes contra antígenos tóxicos ou sequências conservadas e carboidratos podem ser isolados (6).

Peptídeos obtidos pela tecnologia de *Phage Display* podem exercer um efeito anticarcinogênico, por inibição de angiogênese, decréscimo na atividade metastática ou inibição de enzimas importantes para disseminação de células neoplásicas. Podem, ainda, ser usados como componentes de vacinas antitumor ou veículos para carrear citocinas, quimioterápicos ou oligonucleotídeos anti- senso para tumor. Essa tecnologia permite o desenvolvimento de anticorposrecombinantes anticâncer, mais comumente usados como moléculas *scFv* (*single chain fragment variable*), as quais podem ser modificadas para aumentar sua afinidade e avidez e podem, ainda, ser conjugados com moléculas que induzem diferentes efeitos antigênicos (7).

A técnica *Phage Display* foi utilizada nesse trabalho para isolar peptídeos ligantes às proteínas teciduais do câncer de mama, buscando identificar novos biomarcadores para essa patologia.

MATERIAL E MÉTODOS

1.0-Material biológico

Foi utilizado tecido tumoral de mama de 50 mulheres com idade entre 35 e 70 anos, diagnosticadas com carcinoma ductal invasivo graus I, II e III e que passaram por mastectomia (Tabela1). As neoplasias malígnas da mama foram classificadas de acordo com a sexta edição do Sistema TNM (Classificação de tumores malignos), da American Joint Comittee on Câncer. Os tecidos foram obtidos junto ao serviço de Mastologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia-MG, Brasil. Todas as pacientes assinaram Termo de Consentimento e o Projeto foi aprovado pela Comissão de Ética da Universidade Federal de

Uberlândia (Processo nº 0013/2000). O grupo controle foi constituído por 50 amostras de tecido de mama de mulheres clinicamente sadias com idade entre 20 e 45 anos obtidas junto ao Serviço de Cirurgia Plástica da UFU.

Os procedimentos experimentais foram realizados nos Laboratórios de Genética e Genética Molecular do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia-MG.

2.0-Extração de Proteínas

Fragmentos de tecidos tumorais foram macerados em cadinho com bastão de porcelana em nitrogênio líquido e em seguida foi adicionado Tampão deExtração (Tris-HCL 20mM pH7,2, EDTA 10mM, EGTA 2mM, sacarose 250mM, DTT 1mM, Benzamidina 1mM). O material foi colocado em microtubo e centrifugado por 30 min a 20.000 g max à temperatura ambiente. Após esse procedimento o sobrenadante foi coletado e a concentração de proteínas totais foi quantificada pelo método de Bradford (8).

3.0- *Biopanning*

Para seleção de fagos ligantes a proteínas de câncer de mama foram utilizadas duas bibliotecas comerciais de peptídeos apresentadas em fago M-13: *Ph.D.-7* (complexidade: 2,28 x 10^9 transformantes) e *Ph.D.-12* (complexidade: 2,7 x 10^9 transformantes), com peptídeos fusionados a proteína pIII (5 cópias por partícula de fago) da New England BioLabs, Schwalbach, Alemanha.

Para o procedimento foi utilizada uma placa de microtitulação (NUNC maxisorp ^{rt} Nalge Nunc International Co., Rochester, NY, USA), onde 3 poços foram sensibilizados com 75 µg de proteínas de mama sadia (“pool” de 50 amostras) e 1 poço sensibilizado com 75 µg de proteínas de tecido tumoral (“pool”de 50 amostras) diluídas em tampão bicarbonato pH 8,6.

A placa foi agitada em câmara úmida *overnight* a 4ºC e em seguida o excesso de proteínas, que não se ligou, foi descartado. Ao final da sensibilização, a placa foi bloqueada com Tampão (0,1M $NaHCO_3$ pH 8,6; 5mg/mL BSA e NaN_3 0,02%) por 1 hora a 4º C. Terminado o bloqueio a placa foi lavada por seis vezes em TBS contendo 0.1% de TWEEN 20 (TBST). As proteínas do tecido normal, presentes no 1° poço foram incubadas com 2 x 10^{10} partículas de fagos de cada biblioteca e incubado por uma hora à temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e adicionado ao 2° poço que, também, continha proteína normal e, novamente, incubado por 1 hora. Esse procedimento foi repetido mais uma vez para subtrair os ligantes das proteínas normais. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e adicionado ao poço contendo proteína tumoral, sendo incubado por 1 h à temperatura ambiente. Os fagos não ligantes foram removidos

por lavagem por 10 vezes com TBS-Tween 0,1% no primeiro *round* e 0,5% nos seguintes e eluidos com 50 mM de Tampão Glicina (pH 2,0). Os fagos recuperados foram amplificados em *Escherichia coli* ER2738. A seleção foi repetida por mais duas vezes usando sempre o eluato anterior ao *round* em questão como representante da biblioteca de fagos.

4.0-Titulação

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

A solução de fagos a ser titulada foi submetida a diluições seriais de 10 vezes em meio LB. Para eluatos não amplificados foram utilizadas as diluições de 10^{-1} até 10^{-4}; para soluções com fagos amplificados a faixa de diluição utilizada foi de 10^{-8} a 10^{-11}. Cada diluição foi acrescida de 200mL da cultura de ER2738 na fase *mid-log* (OD_{600} ~0,5). A mistura foi agitada brevemente e incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. As células, agora infectadas, foram transferidas para tubos de cultura contendo 3mL de Agarose Top a 45ºC e espalhadas sobre placa de Petri contendo meio LB sólido, com IPTG/X-Gal e tetraciclina. Para cada diluição foi preparada uma placa.

As placas foram incubadas à 37ºC, durante 16 horas, após o qual, foram contadas as colônias das placas que apresentavam aproximadamente 100 colônias. Multiplicou-se cada número pelo fator de diluição de cada placa para obter o título dos fagos.

5.0- Amplificação dos fagos

Para a amplificação, uma colônia de ER2738 foi inoculada em 20mL de meio LB e incubada sob agitação a 37ºC por 14 horas, e 1mL dessa cultura foi diluído em 120mL de meio LB (autoclavado e com tetraciclina-100µl/mL) distribuindo-se 1 mL em cada poço da placa *Deepwell*.

Usando palitos de dente esterilizados, colônias azuis (bactérias infectadas com fagos) foram retiradas da placa de *Petri* (3º ciclo não-amplificado) e transferidas para um poço da placa *Deepwell* contendo cultura diluída. Esta foi vedada com um adesivo próprio e incubada, por 5 horas sob agitação a 37ºC. Para manutenção, foram retirados 100µl de cada poço, e transferidos para uma placa de microtitulação *Corning Incorporated Costar*® 3591 e adicionado 100µl de glicerol 50%. Após a incubação, a placa foi centrifugada por 20 minutos a 3700 rpm, transferindo seu sobrenadante para uma outra *Deepwell* estéril. Foi adicionado 1/6 do volume em PEG/NaCl e incubado por 14 horas a 4ºC. Em seguida a placa foi centrifugada por 1hora a 3700 rpm e todo o sobrenadante dispensado, secando-se a placa sobre papel-toalha (trocado várias vezes para

evitar contaminação cruzada). O precipitado foi resuspendido em 200µl de PBS1X (Tampão Fosfato Salina).

6.0-ELISA

Uma placa de alta afinidade (Costar-Corning 3590, NY, USA) foisensibilizada com proteína total extraída de tecido tumoral ("pool de 50 amostras) e outra com tecido controle ("pool" de 50 amostras) na concentração de 1µg/poço,em Tampão Bicarbonato 0,006M pH 9,6, durante 16 horas a 4°C. Em seguida, as placas foram bloqueadas durante 1 hora, utilizando leite desnatado 5% (Molico). As placas foram lavadas por 3 X com PBST e incubadas por 1 hora a 37°C com 1x 10^{11} por poço dos fagos selecionados e do fago helper (fago que não expressaa proteína exógena). Posteriormente as placas foram lavadas em PBS-T 6x e incubadas por 2 horas a 37°C com anti-M13 (SIGMA) conjugado com peroxidase, diluído em Tampão Bloqueio na concentração de 1:5000. Ao final da incubação, as placas foram novamente lavadas por 6X em PBS-T e a reação ocorreu pela adição de Tampão Citrato-Fosfato 0,1M pH 5,0 suplementado com H_2O_2 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 obtida em leitor de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, USA) a 492 nm.

Foi calculado o valor *cut off* para cada amostra, segundo a fórmula: (cutoff= média Helper + 3X desvio padrão). O índice ELISA foi calculadoconsiderando-se OD/ cut off. Em seguida, foi calculada a razão do índice ELISA tumor/controle. Valores acima de 1 foram considerados positivos.

7.0-Extração de DNA do fago

Para a extração do DNA dos fagos, colônias isoladas de uma placa oriundado 3º ciclo de *Biopanning* foram transferidas para poços de 2mL em placas de cultura tipo *Deepwell*, contendo 1mL de cultura de ER2738 em fase *early-log* (OD_{600} ~ 0,3). A cada poço foi adicionada apenas uma colônia de bactéria infectada com fago.

A placa foi vedada com adesivo próprio e incubada a 37ºC, por 24 horas, sob agitação (250 rpm). Para isolar os fagos das bactérias, a placa foi centrifugada a 3700 rpm, a 20ºC, durante 10 minutos. 800mL do sobrenadante da centrifugação foram transferidos para outra placa e incubados, por 10 minutos, com 350mL de PEG/NaCl. Após incubação, a placa foi centrifugada a 3700 rpm, a20ºC, durante 40 minutos, para precipitação dos fagos. O sobrenadante foi descartado e 100mL de Tampão iodeto (10mM de Tris-HCl pH 8,0, 1mM de EDTAe 4M de NaI) foram adicionados ao precipitado de fagos.

A placa foi agitada vigorosamente e, em seguida, 250mL de Etanol absoluto foram acrescentados. Após incubação de 10 minutos, à temperatura ambiente, a placa foi centrifugada

(3700 rpm, 20ºC, 10 minutos) e o sobrenadante descartado. O precipitado de fagos foi lavado com 500mL de Etanol 70% e recentrifugado. O precipitado remanescente foi diluído em 20mL de água Milli-Q.A qualidade do DNA fita simples foi verificada pela separação eletroforética em gel de Agarose 1% corado com solução de Brometo de Etídeo.

8.0-Sequenciamento do DNA e dedução de aminoácidos

Na reação de sequenciamento, foram utilizados 500ng de DNA molde, 5pmol do *primer* -96 gIII (5'-^{OH} CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3' - Biolabs) e Premix (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit. – Amersham Biosciences). A reação de 35 ciclos foi realizada em Termociclador de placas (MasterCycler - Eppendorf) nas seguintes condições: desnaturação (a 95ºC por 20 segundos); anelamento do *primer* (a 58ºC por 15 segundos) e extensão (a 60ºC por 1minuto). O DNA sequenciado foi precipitado com 1mL de acetato de amônio e etanol 7,5M, homogeneizando a placa com leve agitação. Foram acrescentados 27,5 □l de etanol absoluto e a placa foi centrifugada por 45 minutos, a 4000 rpm e o sobrenadante descartado. Foi adicionado 150mL de etanol 70% ao DNA precipitado e a placa centrifugada por 10 minutos, a 4000 rpm. A solução de etanol foi descartada, a placa permaneceu invertida sobre um papel toalha e nesta posição foi pulsada a 800 rpm, durante um segundo. A placa foi coberta com um papel alumínio, permanecendo por cinco minutos a temperatura ambiente para evaporar o Etanol. Os precipitados resultantes foram ressuspendidos em tampão de diluição (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit. – Amersham Biosciences). A leitura do sequenciamento foi realizada em um sequenciador automático MegaBace 1000 (Amersham Biosciences) no laboratório de Genética Molecular (UFU) .

9.0- Bioinformática

A tradução da sequência de aminoácidos obtida no sequenciamento se deu pelo programa DNA2PRO12. Este programa é designado para tradução de sequências. De insertos tanto de bibliotecas da New England Biolabs (Ph.D.-12^{TM} or Ph.D.-7^{TM}) quanto de outras bibliotecas de interesse que contiverem as sequências inicial e final do vetor. O programa automaticamente localiza a posição do inserto, traduz o mesmo e indica qualquer erro possível na sequência do inserto (tais como códons inesperados ou erros na sequência próxima) (http://relic.bio.anl.gov/dna2pro12.aspx).

O alinhamento dos peptídeos com proteínas humanas foi feito utilizando osprogramas *Blast* (www.ncbi.nlm.nih.gov) e *immunepitope* (www.immunepitope.org) e o cálculo da freqüência de aminoácidos dentro da população de peptídeos foi realizado utilizando o programa AAFREQ (http://relic.bio.anl.gov/aafreq.aspx).

O programa CLUSTAL W foi utilizado para análise do pareamento entre os peptídeos recombinantes selecionados e o cálculo da frequência e da medida de informação de cada um dos peptídeos dentro da biblioteca original foi feita pelo programa INFO (http://relic.bio.anl.gov/info.aspx).

10.0-*Western Blotting*

Proteína total (40µg) de tecido tumoral ("pool" de 50 amostras) e sadio ("pool" de 50 amostras) foram separadas em SDS-PAGE e foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose *Hybond*, 0,22µm. A transferência foi confirmada corando a membrana com Ponceau. Em seguida as membranas cortadas em tiras contendo proteínas do tecido tumoral e de tecido sadio foram bloqueadas com Tampão Bloqueio TBS-T Molico 5%. Foram acrescentados 4 x 10^{12} partículas de cada fago selecionado e incubado por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, a membrana foi lavada 5 X por 5 min com TBS-T. Em seguida, foi adicionado anti-M13 (SIGMA) marcado com peroxidase diluído em tampão bloqueio na diluição de 1:5000 e incubados por 1 hora a temperatura ambiente. As membranas foram lavadas 5 vezes com TBS-Te reveladas com tabletes de 3,3' diaminobenzidina (*Sigma Fast, Sigma Chemical Co*.).

11.0- *Dot-blotting*

Em membranas de nitrocelulose *Hybond* 0,22µm (Amersham Biosciences), foram adicionados 40 µg de proteína do tecido tumoral ("pool" de 50 amostras) e e40 □g de proteína do tecido sadio ("pool" de 50 amostras). Após secagem das proteínas, a membrana foi bloqueada com leite desnatado 5% diluído em TBS-T 0.5% por 1 hora. Em seguida, o tampão bloqueio foi trocado e adicionados 4 x10^{12} de cada fago selecionado, incubando por 1 hora. Depois de lavada 3 vezes com TBS-T 0.5%, a membrana foi incubada com anti-M13 (Biolabs) conjugado com peroxidase diluído 1:5000 em solução bloqueio, por 1hora. Após a ligação do anticorpo anti-M13, a membrana foi lavada 10 vezes com TBS-T 0.5% e revelada com Sigma Fast 3,3'-Diaminobenzidine tablets sets (SIGMA). A revelação foi interrompida com lavagens da membrana em água destilada. Todos os procedimentos de incubação foram processados à temperatura ambiente.

12.0- Imunohistoquímica

A imunohistoquímica foi processada utilizando os fagos: BC04, BC05, BC07, BC11, BC12, BC17 individuais e a mistura dos fagos (BC11, BC12, BC17)e o fago Helper, em corte histológico de tecido com câncer de mama, câncer de ovário, melanoma e linfoma maligno não hodgkin obtidos no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

Rotineiramente, no Laboratório de Patologia do Hospital de Clínicas da UFU, são

realizadas análises de imunohistoquímica utilizando marcadores específicos de cada tipo de câncer para caracterização do tumor . Os marcadores analisados em câncer de mama foram: Receptor de Estrogênio, Receptor de Progesterona, c-erbB-2, P53 e Ki67. No caso do câncer de ovário foram analisados os marcadores: Citoqueratinas, Vimentina, Actina de músculo liso, Desmina humana, proteína S100, Ki67 e MIC2. Para analisar o linfoma maligno não-hodgkin foram utilizados os seguintes marcadores: Vimentina, CD20, Cd3, CD5, CD10, CD23, CD43, Cd15, CD30, CD45 e Ki67. O Melanoma não foi analisado por imunohistoquímica porque este procedimento foi desnecessáriopara sua caracterização.

A metodologia usada foi o método indireto, seguindo os seguintes procedimentos: desparafinização em 3 banhos de xilol de 1 minuto cada e reidratação em série de álcoois (100%, 85% e 70%), seguido de lavagem em água corrente. O resgate antigênico foi feito em microondas com EDTA (9), sendo 3 ciclos de 5 minutos em alta potência. As lâminas foram mantidas em repouso à temperatura ambiente por 20 minutos e lavadas em água corrente por 10 minutos. A atividade de peroxidase endógena foi bloqueada com quatro banhos de três minutos em água oxigenada 10 volumes. Em seguida as lâminas foram lavadas em água corrente por 10 minutos e imersas em PBS (Tampão Fosfato Salino) pH 7,4 por 5 minutos. Para bloquear a coloração de fundo, devido à interações hidrofóbicas entre tecidos e proteínas reagentes, foi utilizada solução de albuminabovina a 1% com azida sódica a 0,1% em PBS para diluir os fagos. Subsequentemente foi feita a incubação com 300µL de cada fago e do "pool" de fagos (1/30, ou 10^{11} partículas virais/clone) por 24 horas a 4ºC, permanecendo em repouso à temperatura ambiente por 30 minutos. Três lavagens de 5 minutos cada, em (PBS 0,1M, pH 7,4) foram realizadas antes e depois da incubação, por 40 minutos a 37º C, com o anticorpo anti-M13 de camundongo (1/1000) por 40 minutos a 37º C. A incubação com o anticorpo anti-camundongo conjugado com peroxidase (1/150) e três lavagens de 5 minutos cada, em PBS 0,1M, pH 7,4 foram realizadas antes da incubação por 3 minutos em solução reveladora- substrato cromogênico, constituída de água oxigenada 10 volumes adicionada à solução 3', 3' Diaminobenzidina tetrahidrocloride (DAB) em tampão PBS. As lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos. A contra-coloração foifeita com Hematoxilina de Harris durante 10 segundos e, posteriormente, a lâminafoi passada por diluições em série de etanol (70%, 85% e 100%) e em banhos de xilol. A montagem permanente foi realizada com goma de Damar.

RESULTADOS

1.0-Sequenciamento

Confirmada a qualidade do DNA, foi realizado o sequenciamento de 80 clones. Os cromatogramas gerados pelo sequenciador foram analisados peloprograma *Phred basecalling* para análise da qualidade. Nos 80 clones sequenciados, foi possível identificar 40 peptídeos.

2.0-Análise dos dados por bioinformática

Após a tradução das sequências de DNA pelo programa DNA2PRO12, o cálculo da frequência de cada aminoácido nos peptídeos sequenciados foi realizado pelo programa AAFREQ. Pode-se observar na Tabela 4 que os aminoácidos mais freqüentes foram: Leucina, Histidina, Prolina e Serina, sugerindo que esses aminoácidos estão envolvidos na maioria das interações peptídeo-proteína.

TABELA 1- Frequência dos aminoácidos dos clones sequenciados. Em verde estão representados os aminoácidos mais freqüentes.

Aa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Total	Frequência
A (Alanina)	1	2	2	0	0	0	2	2	3	1	1	0	14	0,0574
C (Cisteína)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0,0041
D (Aspartato)	1	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	5	0,0205
E (Glutamato)	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	3	0,0123
F (Fenilanina)	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	4	0,0164
G (Glicina)	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0,0082
H (Histidina)	9	0	0	2	5	1	0	0	0	0	3	0	20	0,082
I (isoleucina)	0	0	0	0	1	0	4	0	0	3	1	1	10	0,041
K (Lisina)	5	0	0	6	0	0	0	0	0	0	1	1	13	0,0533
L (Leucina)	0	2	8	1	7	1	0	4	7	6	1	1	38	0,1557
M (Metionina)	0	0	0	2	0	0	1	0	0	1	0	1	5	0,0205
N (Asparagina)	2	0	1	1	0	5	3	1	0	1	0	0	14	0,0574
P (Prolina)	0	1	2	3	1	6	2	2	3	2	2	0	24	0,0984
Q (Glutamina)	1	0	0	0	2	0	1	3	0	0	2	1	10	0,041
R (Arginina)	0	0	0	2	0	1	1	2	2	0	3	1	12	0,0492
S (Serina)	0	9	0	1	1	3	2	1	1	0	1	5	24	0,0984
T (Treonina)	1	2	0	1	1	1	2	0	1	1	1	3	14	0,0574
V (Valina)	0	4	0	2	1	0	1	1	1	1	0	2	13	0,0533
W (Triptofano)	1	1	7	1	0	0	0	0	0	1	0	0	11	0,0451
Y (Tirosina)	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	2	7	0,0287
Consenso	**H**	**S**	**L**	**K**	**L**	**P**	**I**	**L**	**L**	**L**	**H/ R**	**S**	**244**	

Na busca para identificação de sequências consenso entre os peptídeos selecionados foi utilizado o programa CLUSTAL W (18.1) que revelou dois motivos mais freqüentes (Figura 1). Entre os peptídeos, seis deles apresentam o motivo HSL, presente na sequência consenso formada

pelos aminoácidos de maior frequência.

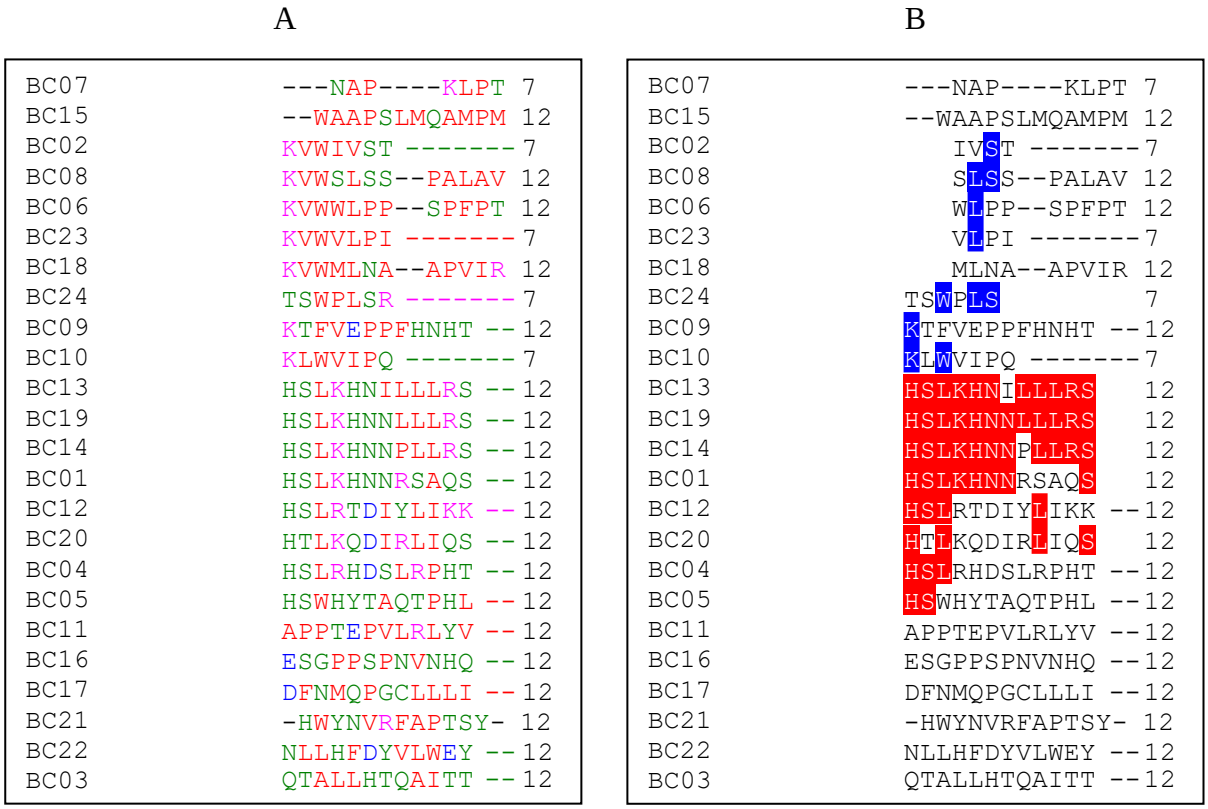


Figura 1: Alinhamento dos peptídeos selecionados por Clustal W. **A:** vermelho: aminoácidos hidrofóbicos, incluindo aromáticos; azul: ácidos; rosa: básicos; verde: Hydroxila+ Amina + Basica **B:** Motivos em comum entre os clones selecionados.

As análises realizadas para observar a similaridade entre os peptídeos selecionados e outras proteínas revelaram que todos os peptídeos estudados nesse trabalho foram similares a proteínas expressas em câncer (Tabela 2).

Tabela 2- Análise da similaridade dos peptídeos selecionados com proteínas humanas

CLONE	PEPTÍDEO	MOTIVOS PROVÁVEIS (em azul)	PROVÁVEIS PROTEÍNAS	NÚMERO DE ACESSO	IDENTIDADE %
BC01	**HSLKHNNRSAQS**	ISLKHNNRALAQ	-shugoshin-like 2	NP_689737.3|	58,33
		HSLKHNKRVLFS	-oxygen regulated protein precursor variant	|BAD96476.1|	66,67
		HSLKHNKRVLFS	-HYOU1 protein	|AAH72436.1|	66,67
		RSLRHNNRRLQA	-signal-induced proliferation-associated protein	|NP_006738.2|	58,33
BC02	**KVWIVST**	KIWIVSF	-WDSUB1	|AAH29520.1|	71,43
		KVWIVTS	-TGF-beta resistance-associated protein TRAG	|AAL03983.1|	71,43
		KVWIVTS	-rabconnectin-3 beta isoform 1	|NP_056100.2|	71,43
		CVWIVVT	-intrinsic factor-vitamin B12 receptor	|AAK61830.1|	71,43
BC03	**QTALLHTQAITT**	QTALAHTQHAAR	-golgi autoantigen, golgin subfamily a, 2	|CAI13842.1|	58,33
		QAELLHSQARLA	-FBF1 protein	|AAH07570.1|	50,00
		QAELLHSQARLA	-zinc finger protein 462, isoform	|AAH23549.1|	50,00
		NTALLNTQTPIY	-Fas (TNFRSF6) binding factor	|EAW59011.1|	50,00
BC04	**HSLRHDSLRPHT**	SLLKHQSLRPDE	-kallikrein 2, prostatic isoform 3	|NP_001002232.1|	50,00
		LSLRNNSLRTFT	-insulin-like growth factor binding protein, acid -- labile subunit	|NP_004961.1|	58,33
		HQLRLGSLHPHT	-UFO_HUMAN Tyrosine-protein kinase receptorUFO precursor (AXL oncogene)	|P30530|	66,67
		HGLRHDSSGEG	-IGHMBP2 protein	|AAH00290.1|	50,00

BC05	**HSWHYTAQTPHL**	QLV**HYTAQ**PLF**L** TCQ**H**WS**AQTPH**T **HSWHY**HWPSWL**L** PEN**HYT**N**QT**DMP	-(Heat shock transcription factor 1) (HSTF 1) -plasminogen -similar to iGb3 synthase -orphan G-protein coupled receptor isoform 2	|XP_001127807.1| |AAA36451.1| |XP_060537.10 |AAS13466.1|	50,00 50,00 50,00 41,67
BC06	**KVWWLPPSPFPT**	PIPVG**PPSPFPT** PIPVG**PPSPFPT** SS**W**N**LPP**G**PFP**L WT**WWL**K**PSP**AAW	- KIAA1675 protein -transcription factor MEL1 -Cytochrome P450, family 2 -G-protein	|BAB21766.2| |BAB84297.1| |AAH67435.1| |CAI17542.1|	58,33 58,33 58,33 50,00
BC07	**NAPKLPT**	**NAPKLP**K **NAPKLP**K D**APKLP**E IE**PKLPT**	-AN1, ubiquitin-like -ANUBL1 protein -SREBP cleavage-activating protein -Ras protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 1 isoform 2	|CAH72966.1| |AAH48968.1| |NP_036367.2| |NP_722522.1|	85,71 85,71 71,43 71,43
BC08	**KVWSLSSPALAV**	CQGI**LS**T**PALAV** **KVWSL**T**S**SSART VKV**S**A**SSP**S**LAV** **K**NQQS**SS**LS**LAV**, **K**IH**S**G**S**VT**AL**H**V**	-KIAA 0133, isoform CRA_a -G-protein coupled receptor GPR133 -glucocorticoid receptor -telomerase-associated protein 1	|EAW69904.1| |AAP35063.1| |CAJ65924.1| |EAW66475.1|	58,33 50,00 58,33 50,00

BC09	**KTFVEPPFHNHT**	**KTFEEPPF**EKEA **KTFEEPPF**EKEA **KTFEEPPF**EKEA KTFEEPPFEKEA	-spectrin repeat containing, nuclear envelope 2, - AF435011_1 NUANCE - nesprin-2 - spectrin repeat containing, nuclear envelope 2	|EAW80842.1 |AAL33548.1| |AAN60443.1| |EAW80844.1|	58.33 58,33 58,33 58,33
BC10	**KLWVIPQ**	**KLWVI**EA **KLWA**L**PQ** F**LWVIP**I **KLWVI**EA	-DOC-2/DAB2 interactive protein -Transducin (beta)-like 3 -histamine receptor H1 -KIAA1743 protein	|AAM00371.1| |AAH35409.1| |NP_000852.1| |BAB21834.2|	71,43 71,43 71,43 71,43
BC11	**APPTEPVLRLYV**	G**PP**S**EPVL**TQTS LA**PT**D**PVLR**EME HRAE**EPVLRL**DP **APPT**Q**PVL**PPQT	-protein tyrosine phosphatase receptor type D -KIAA1991 protein - sema domain, immunoglobulin domain (Ig), -YTH domain family	|BAE79816.1| |BAC02700.1| |EAW65062.1| |NP_689971.4|	50,00 50,00 50,00 58,33
BC12	**HSLRTDIYLIKK**	F**GLRTDIY**SK**KT** F**GLRTDIY**SK**KT** **LLLR**N**DIALIKL** **QPLQTDIY**GLA**K**	-SWI/SNF -SMARCC1 protein -chymotrypsin C (caldecrin), isoform CRA_a -LAG1 longevity assurance homolog 3	|EAW64831.1| |AAH39843.1| |EAW51725.1| |NP_849164.2|	58,33 58,33 58,33 50,00
BC13	**HSLKHNILLLRS**	**HSLKHN**KRV**LFS** **HSLKHN**KRV**LFS** R**SLKQNI**F**L**FYV L**SLVHA**I**LLLRL**	-oxygen regulated protein precursor variant -HYOU1 protein -KIAA0802 protein -seven transmembrane helix receptor	|BAD96476.1| |AAH72436.1| |AAH40542.2| |BAC05914.1|	66,67 50,00 66,77 66,77
BC14	**HSLKHNNPLLRS**	A**SLKE**N**SPLL**H**S** **HSLKHN**KRV**LFS** I**SLKHNN**RA**L**AQ PLHSV**NNPI****LR**K	-catenin (cadherin-associated protein), alpha 3, isoform CRA_a -oxygen regulated protein precursor variant -shugoshin-like 2 -mitogen activated protein kinase activated	|EAW54249.1| |BAD96476.1 |NP_689737.3| |AAC39863.1|	66,67 66,67 58,33 41,67

			protein kinase		
BC15	**WAAPSLMQAMPM**	SPL**PSLM**VV**MP**L Q**A**V**PSL**L**SA**P**P**P**K **WAAPSL**PSGVRE GQS**PS**M**M**VG**MPM**	-breast carcinoma amplified sequence 3, isoform -Tripartite motif-containing protein 66 -Melanoma associated antigen (mutated) -stromal membrane-associated protein 1, isoform CRA_c	|EAW51413.1| |O15016| |AAI10875.1| |EAW48807.1|	50,00 50,00 50,00 50,00
BC16	**ESGPPSPNVNHQ**	PP**GPPSP**S**V**TTE **ESGPP**A**P**SKPRR L**S**T**PPS**S**NVN**S**I Q**SGPPS**GD**VN**SL	- zinc finger protein 276, isoform CRA_g - SCC-112 protein - TIPARP protein - A-kinase anchor protein 13 isoform 2	|EAW66693.1| |AAH09650.1| |AAH34397.1| |NP_009131.2|	50,00 50,00 58,33 58,33
C17	**DFNMQPGCLLLI**	V**FNMQP**SPSTSS **DF**E**M**SKHPG**LL**L N**F**HL**QP**DGC**LL**V RYLQ**QPGCLL**VG	- DOCK4 protein - SWI/SNF chromatin remodeling complex subunit OSA1 - cadherin-like 23, isoform CRA_a - hypothetical protein LOC283871	|AAI17690.1| AF521670_1 |EAW54426.1| NP_001035830.1	41,67 41,67 41,67 50,00
BC18	**KVWMLNAAPVIR**	Y**VWML**D**A**EDLAD **KVWML**TGDKLET **KVWM**GPIF**PVIR** VY**W**L**L**DG**APV**QD	- F-box and leucine-rich repeat protein - ATP9A protein - cytochrome P-450 - PTK7 protein	|AAH30656.1| |AAI10593.1| |AAC08589.1| |AAH46109.1|	41,67 41,67 66,67 41,67

BC19	**HSLKHNNLLLRS**	**HSLKHN**KRV**L**F**S** **HSLKHN**KRV**L**F**S** RD**LK**P**NNLLL**DE P**SLKHN**D**LL**SWF	- HYOU1 protein - oxygen regulated protein precursor - Cyclin-dependent kinase 7 - C12orf29 protein	|AAH72436.1| |NP_006380.1| |AAH05298.1| |AAH35136.2|	66,67 66,67 58,33 58,33
BC20	**HTLKQDIRLIQS**	AKEN**QDIRL**L**Q**A P**TLKQDI**LEEIK **H**ES**K**IP**I**L**LIQ**Q, **H**ANLKQ**IRLI**EK G**TLKQ**N**I**PRLKL	- pre-B-cell leukemia transcription factor interacting protein 1, isoform CRA_a - KIAA0061 - von Willebrand factor - semaphorin 3D	|EAW53174.1| |BAA06543.1| |AAA61295.1| |NP_689967.2|	50,00 50,00 41,67 41,67
BC21	**HWYNVRFAPTSY**	**HWYNVR**YRGNAF K**WYNV**HS**AP**GGP **HWY**D**V**EGGMQD**Y** **HWY**RALLLE**T**FR, D**WY**D**VR**MLLPQF	- DNA polymerase epsilon catalytic subunit protein isoform a - anaphase promoting complex subunit 1 - Carboxypeptidase D - tumor domain containing 6	| AAD44690.1| |EAW52095.1| |AAH45549.1| |NP_001010870.1|	50,00 50,00 41,67 33,33
BC22	**NLLHFDYVLWEY**	EEGAS**DYVLW**KE **NS**ILL**DYYLW**D**Y** T**LL**NY**DYV**WDTV **NL**HFP**DYVL**D**E**V	- similar to G protein-coupled receptor 108 isoform - C9orf64 protein - amine oxidase, copper containing 3 (vascular adhesion protein 1) - kelch-like 15	XP_946818.1| |AAH04407.1| |EAW60897.1| |NP_085127.1|	41,67 50,00 41,67 58,33

BC23	**KVWVLPI**	CK**WVLPI** A**VWVLP**L **KVWVL**TG **KVWVL**TG	- PRAME family member 5 - EI24_HUMAN Etoposide-induced protein 2.4 (p53-induced protein 8) - KIAA1021 protein - ATPase, Class VI, type 11A isoform a	|AAI01343.1| |O14681| |BAA82973.2| |NP_056020.1|	71,43 71,43 71,43 71,43
BC24	**TSWPLSR**	T**AWPLS**L **TSWPL**LG **TSWPL**GS LH**WPLSR**	-glycophorin C isoform 1 -cytochrome P450, family 2 4 precursor - PCLO_HUMAN Protein piccolo (Aczonin) - histone deacetylase 7A isoform a	NP_002092.1| |NP_000773.2| |Q9Y6V0| |NP_056216.1|	71,43 71,43 71,43 71,43

5.0-ELISA

A técnica ELISA foi utilizada para pré-seleção dos fagos a serem estudados mais detalhadamente.

A Figura 3 apresenta um gráfico representativo da reatividade dos clones selecionados.

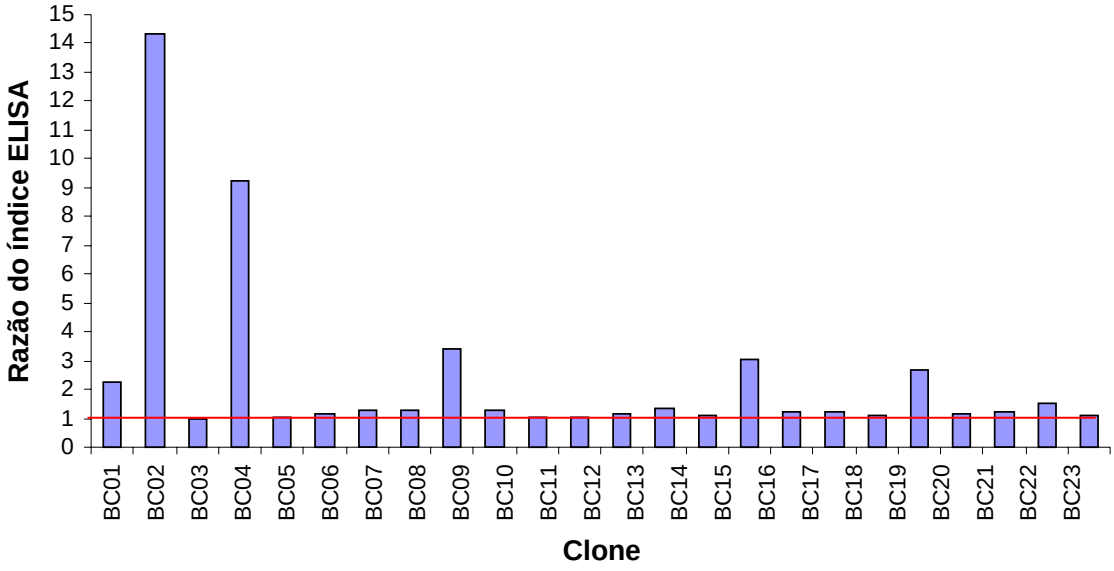


Figura 3: Gráfico representativo das leituras a 492nm do ensaio ELISA mostrando a reatividade dos clones de fagos capturados por anticorpo anti-M13 contra proteína total de mulheres com câncer de mama.

6.0-*Blotting*

Dos clones sequenciados e validados por ELISA, cinco foram utilizados aleatoriamente para análise por *western blotting* e 14 por *dot-blotting*. Todos os clones testados ligaram-se especificamente a proteínas do tecido tumoral, confirmando a seleção de peptídeos ligantes a proteínas do tecido tumoral e o resultado do teste ELISA.

As análises de *western blotting* mostraram que os ligantes dos fagos são proteínas de grande massa molecular, variando entre 116 e 205 kDa (Figura 4).

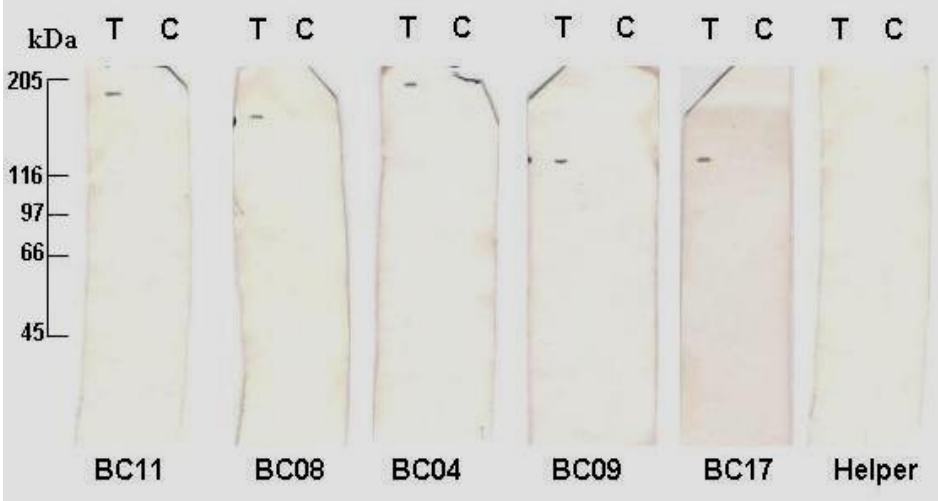


Figura 4: Análise por *western blotting* da expressão dos ligantes em "pools" de proteínas de tecido de pacientes com tumor (T) e de indivíduos saudáveis controles (C). Os fagos ligantes BC11, BC08, BC04, BC09, BC17 e o Helper (controle da reação) foram detectados com anti-M13conjugada com peroxidase.

As análises de *dot blotting* mostraram que todos os ligantes dos fagos foram expressos somente em proteínas do tecido tumoral, comprovando a eficiência da seleção de peptídeos ligantes específicos ao câncer de mama (Figura 5).

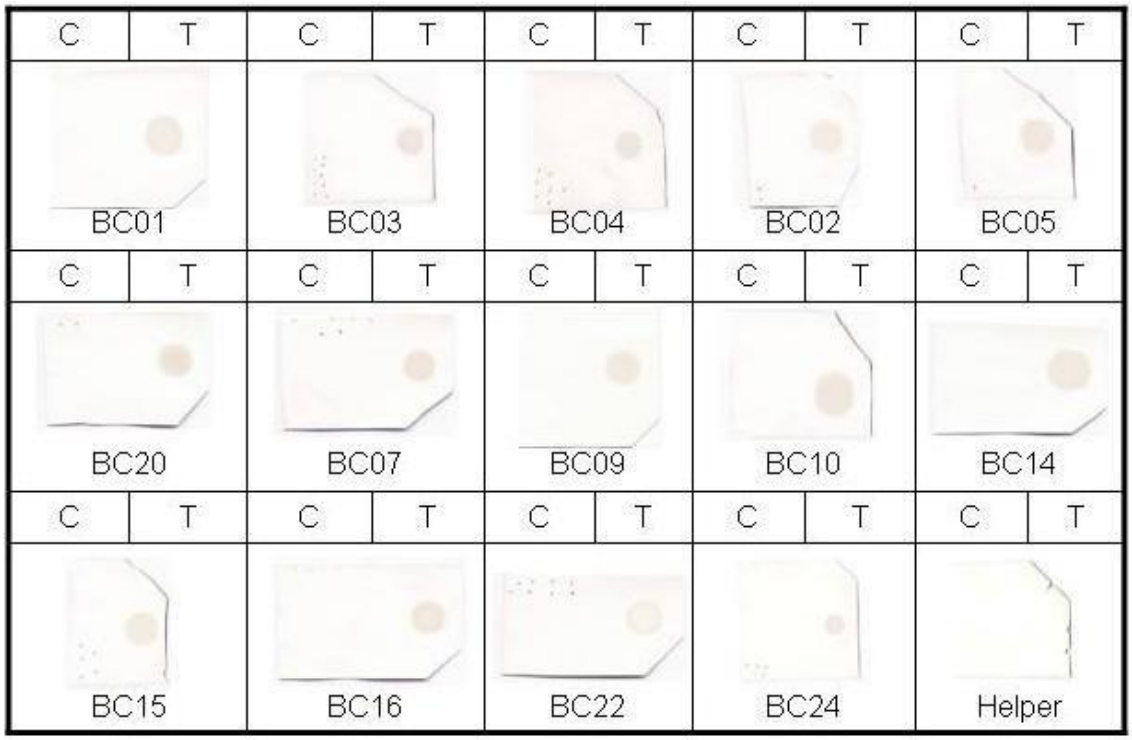


Figura 5: Análise da expressão dos ligantes em "pools" de proteínas de tecido de pacientes com tumor (T) e de indivíduos saudáveis controles (C). Os fagos ligantes BC01, BC03, BC04, BC02, BC05, BC20, BC07, BC09, BC10, BC14, BC15, BC16, BC22, BC24 e o Helper (controle da reação) foram detectados com anti-M13 conjugada com peroxidase.

7.0-Imunohistoquímica

Ensaios de imunohistoquímica foram realizados para avaliar a capacidade de ligação

do peptídeo expresso no fago ao tecido tumoral. Todos os ensaios até o momento haviam sido realizados com proteína total extraída das células tumorais, sendo necessário avaliar o comportamento dos peptídeos em um sistema mais complexo com o tecido sadio ou tumoral.

O teste imunohistoquímico realizado no tecido neoplásico de mama utilizando individualmente os fagos BC11, BC12 e BC17 (Figuras 6A, 6B e 6C), mostrou marcação somente de células tumorais, porém, não em 100% delas. Utilizando a mistura deles, ocorreu a marcação de todo o tecido neoplásico (Figuras 6D), provavelmente devido a soma das marcações. Devido a esse resultado, os testes imunohistoquímicos realizados em tecidos de outros tipos de tumores foram feitos com a mistura dos fagos.

Interessantemente, os fagos BC05, BC04 e BC07 marcaram células neoplásicas e, também, a parede vascular, no tecido tumoral (Figura 6E, 6F e6G).

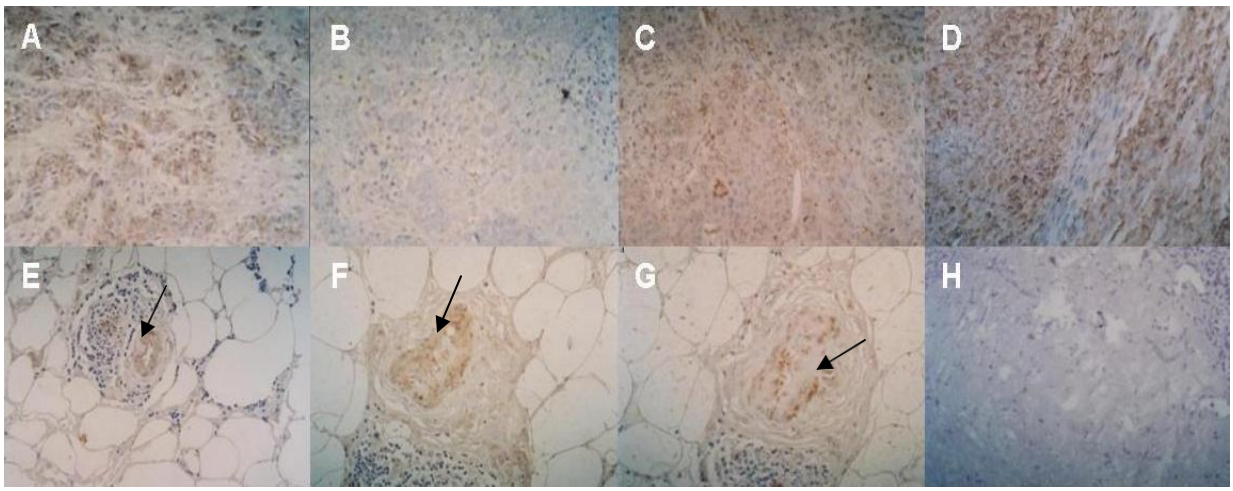


Figura 6: Imunohistoquimica realizada em tecido com carcinoma ductal infiltrante de mama utilizando a marcação indireta de fagos recombinantes revelados com anti-M13 conjugado com peroxidase. **A**: clone BC11; **B**: clone BC17; **C**: BC12; **D**: mistura dos fagos (BC11, BC17 e BC12) **E**:BC05; **F**: BC07; **G**: BC04; **H** : helper (controle da reação).

Foi realizado testes de imunohistoquímica em tumor de ovário, linfoma não-Hodgkin (rim direito) e melanoma, para verificar a especificidade da ligação dos peptídeos ao tumor de mama. Pode-se observar na figuras 7 (A a D), que a mistura de fagos (BC11, BC17 e BC12) marcou também os outros tipos de cânceres testados, com exceção do melanoma.

No caso do câncer de mama, ovário e linfoma não-Hodgkin a imunohistoquímica realizada utilizando a mistura dos fagos, apresentou marcação de todo o tecido neoplásico e células sadias não foram marcadas (Figura 7). Nas células tumorais do câncer de mama houve marcação do núcleo e citoplasma, no caso do câncer de ovário houve marcação de núcleo e membrana e no linfoma foram marcados núcleo, citoplasma e membrana.

Quando a imunohistoquímica foi realizada utilizando o fago Helper não houve

marcação de nenhum tecido analisado, descartando a possibilidade da interação peptídeo-proteína está ocorrendo com outra proteína do capsídeo viral enão com a proteína exógena (7F, 7G, 7H).

Segundo as análises imunohistoquímicas realizadas no laboratório de Patologia do Hospital de clínicas da UFU, as células neoplásicas de mama apresentaram os seguintes resultados: o tumor foi diagnosticado como carcinoma ductal invasor grau III, apresentando positividade para proteínas p53 e para antígeno Ki-67 em mais de 40% das células neoplásicas e negatividade para receptores de estrógeno, progesterona e para o produto do oncogene c-erb-2.

O câncer de ovário trata-se de um tumor de células da granulosa e as análises de imunohistoquímica mostraram positividade para antígeno Ki-67 em menos de 10% das células neoplásicas, para o produto do gene MIC2 e para vimetina (V9) e negatividade para citoqueratinas (AE1-AE3), actina de músculo liso, desmina humana (D33) e proteína S100.

O tumor no rim direito foi diagnosticado como linfoma não- Hodgkin, mostrando marcação positiva para os marcadores: vimetina, CD20, Ki67 (positivo em mais de 90% das células neoplásicas).

Quanto ao melanoma, os testes preliminares foram suficientes para diagnosticar a doença, não precisando realizar o teste imunohistoquímico.

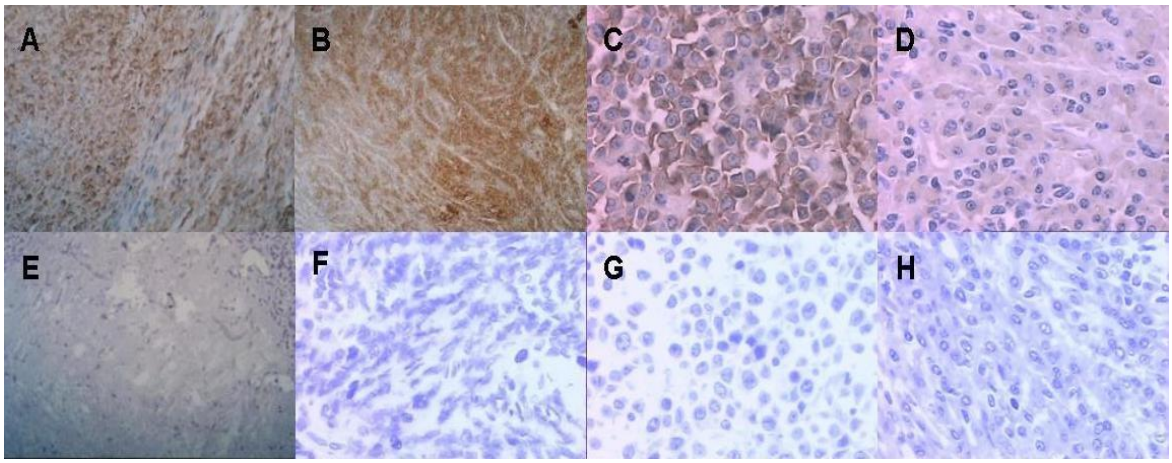


Figura 7: Imunohistoquímica realizada com a mistura de fagos (BC11, BC12, BC17) em diferentes tipos de cânceres, utilizando a marcação indireta de fagos recombinantes revelados com anti-M13 conjugado com peroxidase. A: Câncer de mama; B: Câncer de ovário; C: linfoma não- Hodgkin; D: melanoma; Controles negativos: Helper incubado com: E) Câncer de mama; F) Câncer de ovário; G) Linfoma não- hodgkin, H) Melanoma.

DISCUSSÃO

Foram utilizadas duas bibliotecas comerciais de peptídeos apresentados na superfície de fago M-13 para selecionar peptídeos específicos ligantes a proteínas de tumor de mama, pela tecnologia de *Phage Display*. A vantagem de usar a mistura de bibliotecas foi a economia no tempo de seleção de ligantes e reagentes, porém, pode ocorrer competição entre os peptídeos das bibliotecas. Esse inconveniente não ocorreu na nossa investigação, visto que a proporção dos peptídeos selecionados de cada biblioteca foi muito parecida, sendo 17 da biblioteca de 7 aminoácidos e 23, da biblioteca de 12.

Como tumores possuem uma grande quantidade de proteínas diferentes que são capazes de interagir com os peptídeos da biblioteca, um simples *biopanning* contra proteínas de células tumorais poderia resultar em um grande número de peptídeos sem especificidade. Para evitar esse problema, utilizou-se proteína total de tecido de mama sadia para "subtrair" fagos que se ligam a proteínas expressas nesse tecido. Essa metodologia de subtração, também, foi utilizada com sucesso para identificar peptídeos ligantes específicos aos neurônios de camundongo (11). Para essa seleção, os autores realizaram um passo de subtração, colocando a biblioteca de fagos primeiro em contato com células da glia. Os fagos que não se ligaram a essas células foram colocados em contado com cultura de neurônios, possibilitando assim a seleção de ligantes específicos. O *biopanning* subtrativo também foi utilizado para identificar peptídeos com capacidade de promover a invasão metastática em carcinoma hepatocelular (12).

O elevado grau de informação de cada peptídeo selecionado obtido pelas análises de bioinformática e os resultados obtidos nos testes ELISA, *Dot-blotting* e*Western-blotting* validam os dados de *bioppaning* subtrativo e comprovam a eficiência da técnica de *Phage Display*.

O peptídeo BC02, em nossa análise, apresentou a maior frequência, alto grau de informação e o motivo mais freqüente KVW. Esses dados somados as outras análises realizadas, sugerem que esse peptídeo pode ser um potencial biomarcador tecidual para utilização em diagnósticos e em processos terapêuticos como carreador de drogas.

Observou-se, ainda, que houve um grande enriquecimento de todos os peptídeos selecionados em relação as suas frequências esperadas na biblioteca de fagos, sugerindo que são específicos para câncer. Além disso, todos os peptídeos selecionados tiveram similaridades com proteínas expressas em câncer (Tabela 4).

Bibliotecas apresentadas na superfície de fagos podem conter mais de um bilhão de sequências de peptídeos aleatórios, sendo uma técnica eficiente na "sondagem" da superfície

de células malignas. Essa técnica não é somente promissora para identificar alvos na superfície celular mas, também, é adequada para identificação de peptídeos ligantes a receptores desconhecidos.

Um ligante que ataca apenas o tumor pode abrir caminhos promissores para o tratamento do câncer, podendo carrear drogas não-tóxicas que se tornam ativas quando atingem o alvo. Esta técnica pode evitar que as células saudáveis sejam danificadas, ao usar um ligante específico das células tumorais. Se bem sucedida em humanos, a técnica pode melhorar muita a qualidade de vida de pacientes com câncer. Os peptídeos selecionados nesse trabalho poderão se tornar importantes marcadores tumorais, para utilização no estadiamento, prognóstico e tratamento do câncer. Para isso mais testes são necessários.

Um dado interessante foi o de que os tumores de mama, ovário e o linfoma apresentaram positividade para Ki-67 que é uma proteína expressa no núcleo das células (13) e a mistura dos três fagos marcou núcleo e membrana desses três tumores.

A positividade para Ki-67 em menos de 20% das células neoplásicas caracteriza o tumor como de baixo índice proliferativo, entre 20 e 40% o índice proliferativo é moderado, sendo alto quando a positividade para esse marcador formaior que 40%. O índice de proliferação, como determinado pelo Ki-67, é um marcador bastante útil em avaliar a possibilidade de recidiva tumoral em pacientes com estadiamento inicial. Tumores com índice proliferativo≥ 40% apresentam alta probabilidade de recidiva (14).

O perfil de proteínas expressas na superfície das células pode fornecer um melhor entendimento da maneira como o proteoma da superfície celular é regulado e como é responsável pela variedade de sinal intra e extra-celular (15). Esse compartimento é rico em alvos terapêuticos, como por exemplo, o receptor de fator de crescimento (HERB2) que é amplificado no tumor de mama. Foi identificado um peptídeo ligante à proteína de membrana *glucose-regulated protein-7*8 (GRP78) e construída uma molécula quimera com motivo ligante a GRP78 fusionado a uma seqüência que induz a morte celular programada, que foi capaz de inibir o crescimento do tumor em modelos de camundongos isogênicos, com câncer de próstata e mama (16).

Foram identificados peptídeos ligantes em diversos tumores utilizando *Phage Display in vivo* por administração intravenosa de biblioteca de peptídeos e de scFv. Em três pacientes foi possível repetir os ciclos do *biopanning*. Nenhum efeito colateral grave foi observado, inclusive reações alérgicas, demonstrando que a técnica pode ser utilizada no carreamento de drogas sem prejuízo ao paciente (17).

Os clones BC05, BC04 e BC07 (figura 6E 6F, 6G) marcaram a parede vascular de tecido tumoral de mama. A angiogênese é essencial para o desenvolvimento do tumor.

Mudanças moleculares estágios-específicas na parede vascular podem acompanhar a progressão da carcinogênese, culminando em metástase. Estratégia baseada na inibição da angiogênese é uma área promissora (18). Peptídeos ligantes a vasos sanguíneos de diferentes tecidos foram isolados utilizando *Phage Display in vivo* em humano (19). A diversidademolecular e estrutural de ligantes a marcadores tumorais expressos na parede vascular poderá contribuir para seleção de alvos de diagnóstico e tratamento (20). A identificação de marcadores tecido-específicos é importante para o desenvolvimento de terapias baseadas em proteínas diferencialmente expressas na superfície vascular associada com tecido sadio ou acometido (21). Esses autores têm desenvolvido estudos utilizando *Phage Display*, que levam à peptídeos capazes de identificar alvos na angiogênese *in vivo*. Esses peptídeos ligados a alvos terapêuticos podem ser direcionados a certos tipos de tecidos depois da administração intravenosa, encontrando sítio de interesse, intensificando a ação terapêutica e diminuindo os efeitos colaterais.

Um novo peptídeo selecionado por *Phage Display*, além de se ligar a vasos sanguíneos de mama normal, liga a vasos de hiperplasia ou lesões malignas em camundongo transgênico com câncer de mama. A Aminopeptidase P, que é amplamente expressa em câncer de mama, foi identificada como o receptor desse peptídeo (22).

Experimentos estão sendo desenvolvidos no Laboratório de Genética Molecular da UFU para identificação das proteínas ligantes aos peptídeos expressos nos fagos selecionados. As proteínas ligantes identificadas podem se tornar marcadores tumorais. Os peptídeos que marcaram a parede vascular podem ser utilizados no endereçamento de drogas pela circulação sanguínea.

Como os fagos foram selecionados utilizando um conjunto de amostras, é necessário que os testes ELISA e *dot-blotting* sejam realizados em amostras individuais para que se possa analisar como esses fagos se comportam em diferentes situações de uma mesma doença, visto que um dos maiores desafios para o estudo e tratamento do câncer de mama é a resolução da heterogeneidade tumoral (23). A atual classificação do câncer de mama não é, ainda, perfeita; pacientes com o mesmo tipo de tumor e estádio podem ter diferentes respostas à terapêutica e diferentes prognósticos. As limitações do atual sistema devem-se à incapacidade de levar em considerações determinantes biológicos.

O próximo passo desse trabalho será a investigação do clone BC02, que apresentou a maior frequência entre os peptídeos selecionados, bem como a utilização de cultura de célula animal e modelos murinos de câncer de mama para que sejam feitos os testes de carreamento de drogas ao tumor alvo.

A técnica *Phage Display* mostrou-se eficiente para seleção de peptídeos ligantes às proteínas do tecido de mulheres com câncer de mama, que poderão no futuro ser utilizados no diagnóstico e tratamento dessa patologia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abreu E, Koifman S: Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. RevBras Cancer 48: 113-131, 2002

2. Smith RA, Saslow D, Sawyer KA, et al: American Cancer Society guidelines forbreast cancer screening:update . *CA Cancer J Clin* 53:141-169, 2003

4. Rosen PP: Breast pathology. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997.

5. Eisenberg AL, Koifman S: Câncer de mama: marcadores tumorais. Rev BrasiCancer 47: 377-388, 2001

6. Soderlind E, Strandberg L, Jirholt P: Recombining germLinederived CDR sequences for creating diverse single-framework antibody libraries. Nat Biotechnol18: 852–856, 2000

7. Borysowski J, Gorski, A: Phage-display technology and its application toexperimental. Oncol Ther 58: 100-107, 2004

8- Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248-254, 1976

9- Shi SR, Key ME, Kalra KL: Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embebded tissues: an enhancement method for immunostochemical staining based on microwave oven heating of tissues sections. J Histochem Cytochem 39:741-748, 1991

10- Rodi DJ, Sores AS, Makouski L: Quantitative assessment of peptide sequencediversity in M13 combinatorial peptide Phage Display Libraries. J Mol Biol 322: 1039-1052, 2002

11- Hou TS, Dove M, Anderson JZ et al: Identificacion of polypeptides with selective affinity to intact mouse carebellar granule neurons from a random peptide-presenting phage library. J Neurosci Methods 138: 39-44, 2004

12- Jia WD, Sun HC., Zhang JB, et al: A novel peptide that selectively binds highly metastatic hepatocellular carcinoma cell surface is related to invasion and metastasis. Cancer Lett 2006, *in press.*

13- Jeziorski A, Blonski JZ, Niewiadomska H. The expression of products of oncogens c-erB2 and EGFR and proliferating antigens Ki67 and PCNA in primary invasive ductal cancer of female breast. J. Exp Clin Cancer Res 19:61-7, 2000

14- Arber JM. Correlation among MIB-1,. paraffin section proliferation index, and recurrence in low-. stage breast carcinoma. Appl Immunohistochem 5:117–127, 1997

15- Shin BK, Wang H, Yim AM, et al: Global profiling of the cell surface proteomeof cancer cells uncovers an abundance of proteins with chaperone function. J Biol Chem 278: 7607-7616, 2002

16- Arap MA, Lahdenranta J, Mintz PJ, et al: Cell surface expression of the stress response chaperone GRP78 enables tumor targeting by circulating ligands. Cancer Cell 6: 275-284, 2004

17- Krag DN, Shukla GS, Shen GP et al: Selection of tumor-binding ligands in cancer patients with phage display libraries. Cancer Res 66: 7724-7733, 2006

18- Li X, Schluesener HJ, Xu SQ: Molecular addresses of tumors: selection by *in vivo* phage display. Arch Immunol Ther Exp 54: 177-181, 2006

19- Arap W, Kolonin MG, Trepel M, et al: Steps toward mapping the human vasculature by phage display. Nat Med 8: 121-127, 2002

20- Zhu Z, Hattori K, Zhang H, et al: Inhibition of human leukemia in an animal model with human antibodies directed against vascular endothelial growth factor receptor 2. Correlation between antibody affinity and biological activity. Leukemia 17: 604-611, 2003

21- Trepel M, Arap W, Pasqualini R: *In vivo* phage display and vascular heterogeneity: implications for targeted medicine. Curr Opin Chem Biol 6: 399-404, 2002

22- Essler M, Ruoslahti E: Molecular specialization of breast vasculature: a breast- homing phage-displayed peptide binds to aminopeptidase P in breast vasculature. Pro Natl Acad Sci USA 99: 2252-2257, 2002

23- Chung CH, Bernard PS, Perou CM. Molecular portraits and the family tree of cancer. Nature Genet 32:533-40, 2002