
**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
BIOMARCADORES TECIDUAIS E SOROLÓGICOS NO
CÂNCER DE MAMA POR *PHAGE DISPLAY***

Aluna: Cristina Soares de Sousa

Orientadora: Dr.^aAna Maria Bonetti

Co-orientador: Dr. Luiz Ricardo Goulart

**UBERLÂNDIA - MG
2007**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
BIOMARCADORES TECIDUAIS E SOROLÓGICOS NO
CÂNCER DE MAMA POR *PHAGE DISPLAY***

Aluna: Cristina Soares de Sousa

Orientadora: Dr.^a Ana Maria Bonetti

Co-orientador: Dr. Luiz Ricardo Goulart

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



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

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
BIOMARCADORES TECIDUAIS E SOROLÓGICOS NO
CÂNCER DE MAMA POR *PHAGE DISPLAY***

Aluna: Cristina Soares de Sousa

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Dr.^a Ana Maria Bonetti

Examinadores: Dr. José Cláudio Casali da Rocha
Dr. Marco Antônio Arap
Dr.^a Veridiana de Melo Rodrigues Ávila
Dr. Warwick Estevam Kerr

Data da Defesa: 16 / 02 /2007

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

Dr.^a Ana Maria Bonetti
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida

À minha família, por me apoiar em todos os momentos de minha vida e me ensinar que os conhecimentos só adquirem sentido quando alicerçados em valores éticos e humanos

À professora Dr.^a Ana Maria Bonetti por ter me orientado, estando sempre de braços abertos para me acolher

Ao professor Dr. Luiz Ricardo Goulart por me receber sempre com uma palavra de otimismo nos momentos mais difíceis, pelas idéias, pelos gestos de amizade e confiança, pelas sugestões feitas na correção da tese, enfim, obrigada por ter participado efetivamente no desenvolvimento desse trabalho.

À equipe médica responsável pela doação do material biológico: Dr.^a Zaira Medeiros Loureiro, Dr. Caliu Carvalho Neto, Dr. Sinval Soares Cruvinel, Dr. Joaquim Luiz Lima Filho e Dr.^a Eliana Chaves Salomão

Às pacientes que se dispuseram a doar tecido e sangue, acreditando que os conhecimentos obtidos nessa pesquisa poderiam de alguma forma ajudar outras pessoas

Às pessoas que auxiliaram na coleta do material biológico: Emília Hissami Toyama, Osmar Simões, Noeme Ferreira Rodrigues, Márcio da Silva Costa, Ignês Candelori e Luiz Fernando

À Yara que forneceu amostras de soro

À todos os amigos do laboratório de Genética, Biologia Molecular e Bioquímica, pela amizade e troca de informações

Em especial, aos amigos, Carol, Fausto, Flávia, Rafael, Renato, Milla, Azul, Isabel, Sílvia, Juliana, Guilherme, Vinícius, Ana Paula, Carlos Prudêncio, Luciana Londe, pelo companheirismo, amizade e por estarem sempre dispostos a me ajudar

Gostaria de agradecer algumas pessoas que não cruzaram meu caminho por acaso. Pessoas que passaram a fazer parte de minha vida e nunca mediram esforços para me fazer feliz. Cientistas que amam a pesquisa assim como eu e trabalharam ao meu lado durante todo o desenvolvimento desse trabalho. Muito obrigada: Carlos Veira, Cynara Rodovalho, Sérgio Lemos e Rone Cardoso. Saibam que por mais distante que estejamos, vocês vão estar eternamente em minha memória
Amo vocês

Aos revisores que se dispuseram a enriquecer esse trabalho

À todos os funcionários do Instituto de Genética e Bioquímica

À Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES), pela bolsa cedida

À todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho

DEDICO

Às três pessoas que mais amo nessa vida:

Meus pais e meu filho

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
CAPÍTULO I: Aspectos gerais da oncogênese mamária e da tecnologia <i>Phage Display</i>	14
1.0 Câncer de mama	15
1.2 Dados epidemiológicos	16
1.3 Fatores de risco	16
1.4 Diagnóstico e tratamento	19
1.6 Fatores genéticos	21
1.7 Sistema imune e o câncer	28
2.0 Tecnologia <i>Phage Display</i>	29
3.0 Referências bibliográficas	35
CAPÍTULO II: Seleção e caracterização por <i>Phage Display</i> de peptídeos ligantes a proteínas teciduais de câncer de mama	48
RESUMO	49
ABSTRACT	50
INTRODUÇÃO	51
MATERIAL E MÉTODOS	53
1.0 Material biológico	53
2.0 Extração de proteínas	54
3.0 <i>Biopanning</i>	55
4.0 Titulação	56
5.0 Amplificação dos fagos	56
6.0 ELISA	57
7.0 Extração de DNA do fago	57
8.0 Sequenciamento	58
9.0 Bioinformática	59
10.0 <i>Western-blotting</i>	59

11.0 <i>Dot-blotting</i>	60
12.0 Imunohistoquímica	60
RESULTADOS	62
1.0 <i>Biopanning</i> e titulações	62
2.0 Extração de DNA do fago	63
3.0 Sequenciamento	63
4.0 Análise dos dados por bioinformática	63
5.0 ELISA	73
6.0 <i>Blotting</i>	73
7.0 Imunohistoquímica	75
DISCUSSÃO	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
CAPÍTULO III: Seleção e caracterização por <i>Phage Display</i> de peptídeos ligantes a proteínas do soro de mulheres com câncer de mama	84
RESUMO	85
ABSTRACT	86
INTRODUÇÃO	87
MATERIAL E MÉTODOS	88
1.0 Material biológico	88
2.0 <i>Biopanning</i>	90
3.0 Titulação	91
4.0 Amplificação dos fagos	91
5.0 Extração de DNA	92
6.0 Sequenciamento e dedução dos aminoácidos	92
7.0 ELISA	93
8.0 Bioinformática	94
9.0 <i>Dot-immunoblotting</i> com IgG	94

RESULTADOS	95
1.0 <i>Biopanning</i>	95
2.0 Extração de DNA	95
3.0 Análise dos dados por bioinformática	96
4.0 ELISA	105
DISCUSSÃO	106
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109

LISTA DE ABREVIATURAS

Tris-HCL	Tris Hydrochloride
EGTA	Ethylene glycol-bis(2-aminoethyl ether)-N
DTT	Dithiothreitol
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaN ₃	Azida sódica
NaCl	Cloreto de sódio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
NaI	Iodeto de sódio
ng	Nanograma
pmol	Picomol
µm	Micrômetro
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
aa	Aminoácido
bp	Par de bases
BSA	Albumina sérica bovina
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Etileno diamino tetra acetato
ELISA	Enzyme immunosorbent assay linked
g	Grama
IgG	Imunoglobulina G
IPTG	Isopropil α-D-tiogalactosise
kDa	Quilodalton
L	Litro
LB	Meio de cultura Luria-Bertania
M	Molar
mAbs	Anticorpos monoclonais
ng	Nanograma
nm	Nanômetro

OD	Densidade ótica
SDS-PAGE	Dodecil Sulfato de Sódio -Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	Tampão fosfato salino
PBST	Tampão fosfato salino com tween
PEG	Polietileno glycol
pH	Potencial Hidrogeniônico
Ph.D	Bibliotecas de <i>Phage Display</i> New England Biolabs
Ph.D-12mer	Biblioteca contendo 12 peptídeos randômicos
pIII	Proteína III capsídica de bacteriófagos filamentosos
pIX	Proteína IX capsídica de bacteriófagos filamentosos
pVI	Proteína VI capsídica de bacteriófagos filamentosos
pVII	Proteína VII capsídica de bacteriófagos filamentosos
pVIII	Proteína VIII capsídica de bacteriófagos filamentosos
RELIC	Receptor Ligants Contents
rpm	Revoluções por minuto
scFv	Fv de cadeia única
TBS	Tampão Tris-NaCl
TBST	TBS com Tween
TBSTM	TBST com 5% de leite desnatado
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3indolil- α -D-galactosideo

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

TABELA 1- Parâmetros clínicos e laboratoriais das pacientes que doaram tecido de mama para extração de proteínas totais. Os laudos anátomo-patológicos foram realizados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.....	54
TABELA 2- Seleção dos fagos com peptídeos ligantes a proteínas do câncer de mama. Título obtido (pfu) no processo de <i>biopanning</i>	62
TABELA 3- Seqüência de aminoácidos dos clones selecionados, freqüência observada, freqüência esperada, amplificação dos peptídeos e grau de informação.....	64
TABELA 4-Freqüência dos aminoácidos dos clones seqüenciados. Em verde estão representados os aminoácidos mais freqüentes.....	65
TABELA 5- Análise da similaridade dos peptídeos selecionados com proteínas humanas.....	67

Capítulo III

TABELA 1- Parâmetros clínicos e laboratoriais das pacientes que doaram sangue para realização do <i>biopanning</i> . Os laudos anátomo-patológicos foram realizados na Maternidade Odete Valadares e no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.....	89
TABELA 2- Títulos (em <i>pfu</i> : unidade formadora de colônias) obtido nos três ciclos de seleção.....	95
TABELA 3- Seqüência de aminoácidos dos clones selecionados, freqüência observada, freqüência esperada, amplificação dos peptídeos e grau de informação.....	97
TABELA 4- Freqüência dos aminoácidos dos clones seqüenciados. Em azul estão representados os aminoácidos mais freqüentes.....	98
TABELA 5- Análise da similaridade dos peptídeos selecionados com proteínas humanas.....	100

.LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1: Fago filamentosos. A) Composição do gene III, mostrando o sítio de clonagem para introdução do gene adicional; B) Partícula viral com as proteínas pIII, pVI, pVII, pVIII e PIX; C) Cristalografia dos domínios D1 e D2 da proteína III, as alfa-hélices estão coloridas em vermelho e as fitas β em cianico.....31

Figura 2: Figura 2- Esquema representativo do processo de “Biopanning”. 1) Incubação da biblioteca de fagos com o alvo imobilizado; 2) Retirada dos fagos não ligados por lavagens sucessivas; 3) Eluição dos fagos ligados e infecção de *E. coli* com pili F; 4) Titulação dos fagos eluídos; 5) Amplificação dos fagos eluídos; 6) População de fagos com maior afinidade pelo alvo.....33

Capítulo II

Figura 1: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, contendo: M: DNA de fago M13 padrão contendo 400ng de DNA (Pharmacia). 1-6: Amostras do DNA de fago M13 selecionados no Biopanning63

Figura 2: Alinhamento dos peptídeos selecionados por Clustal W. A: vermelho: aminoácidos hidrofóbicos, incluindo aromáticos; azul: ácidos; rosa: básicos; verde: Hidroxila+ Amina + Básica B: Motivos em comum entre os clones selecionados.....66

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 73

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-M13 conjugada com peroxidase..... 74

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 74

Figura 6: Imunohistoquímica 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)75

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) Melanoma77

Capítulo III

Figura 1: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, contendo amostras da extração de DNA do fago M13. M: DNA de fago M13 padrão contendo 400ng de DNA (Pharmacia). 1-12: Amostras aleatórias do DNA de fago M13 selecionados no Biopanning95

Figura 2: Alinhamento dos peptídeos selecionados por Clustal W. A: vermelho: aminoácidos hidrofóbicos, incluindo aromáticos; azul: ácidos; rosa: básicos; verde: Hidroxila + Amina + Basico. B: Motivos em comum entre os clones selecionados.....99

Figura 3: Gráfico representativo da Razão do Índice ELISA mostrando a reatividade dos clones de fagos capturados por anticorpo anti-M13 contra soro total de mulheres com câncer de mama, com doenças benignas de mama e mulheres clinicamente saudáveis. T/B: Razão do índice ELISA Tumor/benigno, T/C: Razão do índice ELISA Tumor/controle105

Figura 4: Gráfico representativo das densidades óticas relativas obtidas para cada um dos clones recombinantes e para o fago Helper nos ensaios de Dot-Blotting com IgGs de pacientes com Câncer de mama (Tumor), benigno e controles saudáveis.....106

INTRODUÇÃO

O câncer de mama é um problema de saúde pública no mundo todo e no Brasil é a primeira causa de morte por câncer, nas mulheres, sendo, provavelmente, o mais temido devido ao risco de recorrência e morte.

A incidência crescente e a alta mortalidade por câncer de mama tornam indispensáveis os esforços no sentido de se obter subsídios para aumentar a compreensão do comportamento biológico dessa neoplasia e permitir identificar, precocemente, pacientes de risco. A detecção precoce do câncer de mama é fator importante na diminuição da taxa de mortalidade por essa doença e o sucesso do tratamento relaciona-se diretamente com seu estabelecimento em fases iniciais.

A obtenção de 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 das mulheres portadoras dessa patologia. Proteínas mamárias câncer-específicas podem ser identificadas para utilização como marcadores em diagnóstico, prognóstico e até como carreador de drogas para terapia efetiva do câncer de mama.

A tecnologia de bibliotecas apresentadas em fagos, conhecida como *Phage display*, tem sido importante para a identificação e caracterização de ligantes de alta afinidade e seus receptores, em uma infinidade de doenças, incluindo o câncer. Por meio dessa metodologia é possível identificar proteínas, que podem ser empregadas como biomarcadores para detecção precoce do câncer, para predição do estágio atual do tumor, além de permitir o desenvolvimento de terapias mais eficientes.

O presente trabalho foi dividido em três capítulos, sendo o primeiro uma revisão de literatura sobre o câncer de mama e sobre a tecnologia *Phage Display*, como suporte teórico para os dois capítulos seguintes. Nos capítulos dois e três são apresentados os resultados obtidos, por meio da tecnologia de *Phage Display*, na busca de biomarcadores para câncer de mama em tecidos e em sangue periférico, respectivamente, para que possam ser utilizados em diagnósticos e/ou em procedimentos terapêuticos.

CAPÍTULO I

ASPECTOS GERAIS DA ONCOGÊNESE MAMÁRIA E DA TECNOLOGIA *PHAGE DISPLAY*

CÂNCER DE MAMA

1.2- DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

O câncer de mama distribui-se em, praticamente, todas as partes do mundo, aparecendo com mais freqüência em alguns países europeus, na América do Norte e em alguns países sul-americanos. Apresenta-se como um problema de saúde pública no mundo todo, sendo a primeira causa de morte por câncer em mulheres, no Brasil. A estimativa para o Brasil em 2006 foi de 48.930 novos casos, com um risco estimado de 52 casos a cada 100 mil mulheres. Em Minas Gerais, o câncer de mama é o câncer que mais mata, seguido dos cânceres de pulmão, estômago e colo de útero (7).

O câncer de mama é provavelmente, o mais temido pelas mulheres, devido a sua alta freqüência. Ele é relativamente raro antes dos 35 anos de idade, mas acima desta faixa etária sua incidência cresce rápida e progressivamente (7).

Apesar do expressivo avanço no diagnóstico e tratamento, o câncer de mama representa, ainda, importante e permanente desafio para os responsáveis em saúde pública. Apresenta-se como a principal causa de óbito feminino por câncer, em países desenvolvidos e a segunda causa em países em desenvolvimento (8).

Apesar do desenvolvimento de novas técnicas cirúrgicas e dos avanços em quimioterapia e radioterapia, observa-se que a mortalidade por essa afecção mantém-se em um patamar pouco variável, embora, quando detectado e tratado precocemente, as taxas de mortalidade se reduzem de forma significativa (9).

1.3- FATORES DE RISCO

O câncer de mama é uma doença multifatorial e complexa com forte relação entre fatores genéticos e não genéticos. Cabe destacar a idade, ação hormonal e o histórico familiar como importantes fatores de risco implicados no desenvolvimento da neoplasia maligna da mama.

Depois do sexo, a idade é o mais importante fator de risco para o câncer de mama (10). À medida que a mulher envelhece, aumenta sua chance de desenvolver a doença. Entre 30 e 40 anos, o risco é de 1/252; entre 40 e 50 anos,

é de 1/8. Mulheres com mais de 55 anos tendem a apresentar uma biologia tumoral mais favorável, com sobrevida similar apesar dos diferentes estadiamentos (11). O aumento da idade é um dos principais fatores de risco, mas quando ocorre em pacientes com menos de 35 anos, o prognóstico é mais desfavorável (12).

Menarca precoce, menopausa tardia e nuliparidade são fatores também relacionados com o risco de desenvolver câncer de mama (13).

Duas evidências no processo de atuação e metabolismo dos estrógenos na mama indicam que eles desempenham papel preponderante na carcinogênese mamária. A primeira é a de que à medida que os estrógenos determinam um aumento da taxa de multiplicação celular, ao mesmo tempo diminuem o tempo de reparação do DNA, aumentando, então, a chance de que um defeito no DNA produza uma célula neoplásica. Este seria um fator para os tumores estrógeno-dependentes. A segunda evidência, que explicaria o papel dos estrógenos na carcinogênese dos tumores receptores hormonais independentes, é a de que os estrógenos geram metabólitos que são genotóxicos e participariam de forma isolada ou sinérgica à primeira evidência, na formação dos tumores (14).

O uso de anticoncepcionais, a obesidade na pós-menopausa e a ocorrência de uma gravidez depois dos 30 anos leva ao aumento da probabilidade de uma célula tumoral se multiplicar (13; 15; 16).

Outro importante fator de risco postulado para o câncer de mama é a história familiar. Cerca de 10% dos casos de câncer de mama agrupam-se nas famílias, alguns são devido a mutações germinativas penetrantes, dando origem a um elevado risco de câncer (17).

As mulheres com um ou mais parentes de primeiro grau com câncer de mama têm risco duas a quatro vezes maior de desenvolverem a neoplasia (18). O risco aumenta à medida que aumenta o número de familiares afetados e observa-se a associação mesmo em parentesco de terceiro grau (19). Mulheres com câncer de mama contralateral, desenvolvido até três anos do diagnóstico inicial, apresentam maior probabilidade de terem familiares com câncer (19).

Mulheres jovens que apresentam câncer de mama possivelmente apresentam um padrão genético de predisposição e essa hipótese é reforçada se essas mulheres vierem a apresentar doença bilateral, associação com outras

neoplasias, incluindo ovário e cólon, bem como um heredograma sugestivo de padrão autossômico dominante (20).

O câncer de mama resulta de mutações genéticas que podem estar presentes nas células germinativas dos indivíduos afetados ou mutações que são adquiridas pelas células mamárias. Normalmente, 20 a 30% de todas as mulheres têm, no mínimo, um parente com a doença, mas, correntemente, apenas 5 a 10% dos casos são causados por herança de mutações germinativas com alta penetrância e susceptibilidade genética, como nos genes BRCA1 e BRCA2 (21).

Apesar do risco da manifestação de um tumor em um indivíduo que herdou uma cópia do gene inativado ser maior que na população geral, esse tumor pode ter a chance de se manifestar na dependência de outras alterações genéticas e da interação dos mecanismos poligênicos com os fatores ambientais (22).

Evidências epidemiológicas mostram que a herança de variações genéticas de um ou mais loci, chamados genericamente de polimorfismos, pode resultar na redução da capacidade de reparo do DNA e no aumento do risco de câncer (23).

A predisposição genética a tumores é, usualmente, mediada pela herança da inativação de genes supressores de tumores. Nesse contexto e, particularmente, em famílias de alto risco, os mais importantes genes supressores de tumor associados com o câncer de mama são o BRCA1 e BRCA2. Mulheres portadoras de mutações no BRCA1 possuem até 80% de chance de desenvolver câncer de mama (24). Entretanto, se essas mulheres viverem até a idade de 70 anos, as suas chances de desenvolver um segundo câncer de mama chegam a 70% (18). As mulheres que apresentam mutação no *BRCA2* possuem até 60% de chance de desenvolver esse câncer (25). Os produtos dos genes BRCA1 e BRCA2 formam complexos com outras proteínas, tal como RAD51. Uma mutação *missense* no RAD51 (Arg150Glu) foi descrita em pacientes japonesas com câncer de mama bilateral (26). Outros estudos sugeriram que RAD51 (135 C/G) é um modificador clinicamente significativo que aumenta o risco para câncer de mama no cenário do câncer de mama hereditário (27).

1.4- DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

Desde a metade do século XVIII, é reconhecida a importância do diagnóstico precoce do câncer de mama e o tratamento realizado nas fases iniciais da doença possa oferecer maior possibilidade de cura. Além da redução do índice de mortalidade, o diagnóstico precoce facilita o tratamento do câncer, diminui sua morbidade e possibilita cirurgias mais conservadoras e mais estéticas (28).

Lamentavelmente, em 80 a 85% do total de casos, o diagnóstico do câncer de mama vem sendo feito tardiamente (estádios clínicos III e IV), quando as esperanças de cura são remotas. Do ponto de vista prático, até o momento não há como prevenir a moléstia, porém há maneiras de detectá-la em época oportuna, melhorando a sobrevida e a qualidade de vida das mulheres (29).

Nas duas últimas décadas, em séries mais recentes, observou-se uma tendência de redução no tamanho do tumor. O estágio clínico mais freqüente para o diagnóstico foi o estágio II, com tumores entre 2 e 5cm, embora os carcinomas localmente avançados, estágio III, ainda sejam encontrados em 30% a 40% dos diagnósticos e os tumores avançados, estágio IV, representem 4% a 5 % dos casos (30).

A mamografia é um método já reconhecidamente eficaz na redução da mortalidade por câncer de mama, em especial na pós-menopausa e acredita-se ser um dos motivos principais para a redução da mortalidade por essa doença, na Europa e nos EUA. Uma metanálise, incluindo os oito maiores estudos randomizados relativos ao rastreamento mamográfico da população, mostrou redução de 24% nas mortes por câncer de mama em mulheres na pós-menopausa e de 18%, na pré-menopausa, nos grupos que faziam mamografia periódica, anual ou bienal (31).

A utilização da ultrasonografia mamária como método de rastreamento em massa, ainda, não é aceita por sua dificuldade na detecção das microcalcificações suspeitas, mas sua utilização como um método complementar, auxiliar no diagnóstico, é muito interessante. Em 1.862 mulheres assintomáticas, com mamas radiodensas, foram encontrados seis casos de câncer não-detectados pela mamografia nem pelo exame físico (32).

Para o diagnóstico do câncer de mama vários parâmetros clínico-patológicos auxiliam na análise do prognóstico e nas melhores opções de tratamento para o paciente. Dentre eles, se encontram tamanho do tumor, comprometimento axilar, grau histopatológico, estado dos receptores hormonais e de expressão de moléculas de membrana como c-erB-2. Desses, talvez o mais importante fator prognóstico seja o comprometimento linfonodal (33), ou seja, quanto maior o número de linfonodos comprometidos por neoplasia pior é a taxa de sobrevida destes pacientes. A história natural do câncer de mama é caracterizada por sua heterogeneidade entre os pacientes e tumores, com similares diagnósticos histopatológicos podendo apresentar cursos clínicos e respostas variadas ao mesmo tipo de tratamento (34). Sabe-se, por exemplo, que 15 a 20% dos pacientes sem comprometimento axilar por tumor, que deveriam apresentar bom prognóstico, evoluem com metástase sistêmica no seu seguimento (35).

Em 1952, Haagensen preconizou pela primeira vez o auto-exame das mamas (36). Apesar de ter sido amplamente estimulado como método capaz de melhorar o prognóstico do câncer de mama, atualmente, a eficácia do mesmo é discutível (37). Diversos estudos, na maioria tipo caso controle, demonstraram que este método não foi capaz de promover impacto estatisticamente significativo na redução da mortalidade e na detecção em estádios mais precoces do câncer de mama. Constatou-se apenas aumento na taxa de biópsias de lesões benignas (37).

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. Os marcadores tumorais podem ser detectados em tumores sólidos, em células tumorais circulantes no sangue periférico, nos linfonodos, na medula óssea ou em outros fluidos corporais. Um marcador tumoral pode ser usado para diagnóstico, estadiamento ou para triagem populacional e, ainda, para detectar metástases ocultas e monitorar a resposta ao tratamento, permitindo detectar recidivas (38).

A estratégia de tratamento preconizado, para as mulheres com câncer de mama depende, diretamente, do estadiamento tumoral; assim, na medida em que o tumor seja diagnosticado em estádios mais avançados, os recursos terapêuticos

se tornam mais limitados e mutilantes, sendo maior a morbidade se tornam mais limitados e mutilantes, sendo maior a morbidade pós-tratamento (39).

A abordagem terapêutica do câncer de mama envolve a cirurgia, quimioterapia, radioterapia e hormonioterapia. Geralmente os tratamentos propostos associam duas ou mais abordagens, levando em consideração, também, as características individuais, tanto clínicas, como psicológicas, visando obter uma melhor qualidade de vida pós-tratamento (40)

1.5- FATORES GENÉTICOS

A partir de 1838, quando Muller descobriu que o câncer consistia em um crescimento anormal de células e descreveu a estrutura celular de um tumor cartilagenoso (41), houve um redirecionamento das pesquisas, que passaram a focar, principalmente, as diferenças entre as células normais e neoplásicas, o que gerou um rico e complexo volume de informações, revelando que o câncer é uma doença que envolve mudanças dinâmicas no genoma, que lhe conferem vantagens de crescimento. Tais alterações podem modificar as células normais que, sucessivamente, transformam-se em células hiperplásicas que, por sua vez, adquirem atipias, transformando-se em carcinoma *in situ* e, finalmente, carcinoma invasor (42).

O processo de metástase ocorre em várias etapas. O primeiro passo é a perda da adesão célula-célula e o ganho de mobilidade, que permite à célula invadir o tecido adjacente. O segundo passo ocorre quando a célula tumoral penetra através do endotélio do vaso sanguíneo ou do ducto linfático e entra no sistema circulatório. Somente algumas células são capazes de sobreviver a este processo e completam o processo de metastatização saindo do sistema circulatório, depositando-se em outro sítio e proliferando-se a seguir (43).

Existem mais de 100 tipos de câncer e diversos subtipos, mas todos eles ou, praticamente todos, compartilham alterações essenciais da fisiologia celular que, em conjunto, ditam o crescimento tumoral. São elas: 1) auto-suficiência em sinais de crescimento, 2) insensibilidade aos sinais de inibição de crescimento, 3) evasão a apoptose, 4) potencial replicativo ilimitado, 5) autonomia angiogênica, 6) capacidade para invadir tecidos e produzir metástases (44).

Em seguida, serão descritas essas características em carcinoma de mama com exemplos de alguns genes que se encontram alterados. É válido salientar que algumas proteínas podem desempenhar papel em mais de uma das categorias definidas e outras proteínas alteradas não foram, ainda, associadas a nenhum desses grupos.

1) As células normais requerem uma série de sinais mitogênicos para sair do estado de quiescência. Esses sinais são transmitidos à célula via receptores transmembrânicos, nos quais se ligam diversas classes de moléculas sinalizadoras, como fatores de crescimento, componentes da matriz extracelular, moléculas que promovem a interação/adesão célula-célula. As células tumorais, por outro lado, mostram uma grande independência em relação a esses fatores externos, porque elas próprias geram muitos dos seus sinais de crescimento (44).

O c-erbB-2 é um gene pertencente à família das tirosinas quinases, presente no cromossomo 17 e codifica uma proteína transmembrana (185 kDa), semelhante ao Receptor do Fator de Crescimento Epidermal (EGFR). Sua amplificação e hiperexpressão, freqüentemente encontradas no câncer de mama, são relatadas como um indicador de mau prognóstico e está correlacionada com sobrevida livre de doença (45). Esse fenômeno ocorre em 20 a 30% dos casos de câncer de mama, estando associado a um fenótipo mais agressivo (46). Em um estudo da expressão dessa proteína em tecido normal e tumoral (*in situ* e invasivo) de mama (47), por imunohistoquímica, foi encontrado 29% de positividade nos tumores *in situ*, 45% nos invasivos e nenhum, em tecido normal. A hiperexpressão do c-erbB-2 se correlacionou com o comprometimento axilar.

2) Múltiplos sinais anti-proliferativos agem para manter as células normais quiescentes. Basicamente, os fatores anti crescimento podem bloquear a proliferação forçando a célula a parar em G0 ou a entrar no estágio pós-mitótico. Praticamente, todos os sinais anti-proliferativos convergem para a proteína retinoblastoma (Rb1), que é o principal regulador da progressão de G1 para a fase S. Uma vez interrompida a via Rb, a célula se torna insensível aos fatores anti crescimento (44). Durante essa transição crítica, Rb se torna fosforilada, resultando na liberação e ativação de fatores de transcrição da família E2F, que se ligam ao DNA e promovem a sua síntese, resultando na transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular. Alterações na proteína Rb ou em qualquer proteína

responsável por sua fosforilação, pode resultar na perda desse controle (48). Uma das vias de inativação de Rb melhor conhecida é a do TGF- β (*transforming growth factor*).

A via de transdução de sinais de IGF (*insulin-like growth factor*) envolve ligantes, receptores e proteínas de ligação e tem demonstrado exercer um papel mitogênico em células malignas de origem epitelial e mesenquimal (49).

IGF1 e IGF2 são peptídeos hormônios circulantes e fatores de crescimento que agem localmente com ambas funções, parácrina e autócrina. Ambos estão envolvidos na regulação da proliferação celular e apoptose. Muitas observações sugerem que IGFs e seus receptores estão envolvidos na progressão do câncer de mama (50) e no desenvolvimento de vários tipos de câncer como: mama, próstata, pulmão, coloretal, endométrio, osteosarcoma, neuroblastoma, pâncreas, ovário e testículo (51, 52).

3) A capacidade de expansão das células tumorais é determinada não só por sua capacidade proliferativa, mas também pela taxa de morte celular. Muitas evidências oriundas de estudos em modelos animais, cultura de células e estudos de biópsias revelam que a evasão à apoptose é uma característica, senão de todos, seguramente da grande maioria dos cânceres (44).

O gene *TP53*, assim denominado devido à massa molecular de seu produto protéico - uma fosfoproteína nuclear com 393 aminoácidos de 53 kDa foi o primeiro gene de supressão tumoral identificado e originalmente descrito em 1979. Durante quase uma década o p53 foi tratado como um oncogene, um promotor do ciclo celular (53). Localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13), representa um dos mais importantes genes em oncologia humana, pois está envolvido em funções de controle do ciclo celular, reparo do DNA, apoptose, senescência celular e manutenção da estabilidade genômica, atuando como fator promotor de transcrição de numerosos genes (53).

A proteína supressora de tumor p53 é um mediador celular crítico da resposta ao estress oxidativo e danos genotóxicos. Quando ativada, p53 se acumula no núcleo, onde ativa, transcricionalmente, a expressão de um número de proteínas, como p21^{Cip1/WAF1} e MDM2. A indução da expressão de p21^{Cip1/WAF1} poderia servir como um indicador para a transativação pelo p53 resultando na

inibição da proliferação celular pela parada do ciclo celular em G1 ou G2, apoptose e indução de outras alterações celulares (54).

A mutação no gene *TP53* pode ser detectada em quase 50% de cânceres humanos, incluindo o câncer de mama (55). Vários estudos demonstraram que mutações do *TP53* ou aumento da expressão nuclear da proteína é um fator de prognóstico em câncer de mama e está associado ao prognóstico ruim (56).

O MIB-1 e o Ki-67 são proteínas nucleares não-histonas encontradas em todas as fases do ciclo celular, menos na G0. Uma alta proporção de células tumorais expressando MIB-1 ou Ki-67 associa-se positivamente a um tumor de pouca diferenciação e inversamente ao número de receptores estrogênicos, indica um prognóstico ruim (57). Postula-se que o índice de marcação de Ki-67 tem valor prognóstico em câncer de mama (58), entretanto, a significância do prognóstico é menor do que a contagem mitótica (como determinado tanto com MAI ou SMI). Existe evidência que a análise tridimensional de núcleo Ki-67 positivo pode aperfeiçoar o poder prognóstico da imunohistoquímica Ki-67 (59).

Tumores bem diferenciados tendem a ter baixo índice de proliferação, enquanto que os de alto grau tendem a ter alto índice de proliferação e altos níveis das proteínas MIB-1, Ki-67 e do PCNA. Os tumores que apresentam altas taxas de proliferação celular, na grande maioria das vezes, são tumores de alto grau de malignidade e, também, são mais sensíveis ao tratamento, pois a maioria das drogas antineoplásicas são mais eficazes contra células que proliferam rapidamente (60). O PCNA é proteína nuclear não-histona que funciona como uma proteína acessória à DNA polimerase delta. Seus níveis correlacionam-se à proliferação celular e, especificamente, à síntese de DNA. Sua medição feita numa série de tumores mostrou associações com a atividade mitótica e o grau tumoral (57).

4) A aquisição das características descritas anteriormente deveria ser suficiente para permitir que as células tumorais formassem tumores macroscópicos, no entanto, as pesquisas realizadas nos últimos 30 anos mostram que essa capacidade de desregular o ciclo celular, por si só, não seria suficiente para assegurar a expansão tumoral, sugerindo a ação de outros fatores independentes dessa via de sinalização célula-célula (44).

Em mais de 90% dos tumores, a enzima telomerase está super-expressa e volta a adicionar as seqüências de hexanucleotídeos repetidos que constituem os telômeros, aos cromossomos, após cada ciclo de divisão, mantendo-os em um tamanho acima do limite crítico, que indicaria a senescência celular.

Foi encontrado que a expressão de hTERT (sub-unidade catalítica da telomerase com atividade transcriptase reversa) ocorre em altos níveis em tumores malignos e linhagens de células cancerosas, mas não em tecidos normais ou linhagens celulares telomerase negativas e uma forte correlação foi encontrada entre a expressão do hTERT e a atividade telomerásica em câncer de mama (61).

A reativação da telomerase foi significativamente associada com câncer de mama em estágio avançado, grau histopatológico e metástase nodal com nenhuma associação significativa entre a atividade da telomerase, menopausa e tamanho de tumor (62).

5) Todas as células precisam do oxigênio e dos nutrientes carregados pelo sangue, o que as obriga a estarem a uma distância no máximo de 100µm de um vaso sanguíneo. Durante a organogênese, essa proximidade é assegurada pela formação de novos vasos sanguíneos concomitante ao crescimento do tecido (44).

A presença de um crescimento vascular acentuado em um tecido tumoral demonstra dois aspectos relevantes. O primeiro deles é a existência de um forte estímulo para estas células endoteliais, capaz de alterar seu estado proliferativo normal. O segundo é a natureza local desse estímulo, uma vez que tal proliferação irá ocorrer apenas no segmento adjacente ao surgimento de um diminuto clone de células neoplásicas. Esse crescimento vascular localizado denomina-se angiogênese tumoral, que é dependente do desenvolvimento de uma neovascularização específica, a qual ocorre em decorrência de diversos fatores locais estimulantes da angiogênese como a hipóxia e a elevação de CO₂ ou óxido nítrico (63).

O crescimento de tumores sólidos, incluindo câncer de mama depende da angiogênese, que é o processo de desenvolvimento de formação de novos vasos a partir do endotélio de vasos pré-existentes. Tumores promovem a angiogênese secretando fatores angiogênicos que estimulam a migração do endotélio,

proliferação e morfogênese capilar. A angiogênese é um fator importante para a progressão do câncer e metástase (64).

O gene VEGF (*vascular endothelial growth factor*) está localizado no cromossomo 6p21.3. e é um dos fatores de crescimento envolvidos na angiogênese. Baseado na significância biológica e patológica da proteína VEGF é possível que variações no gene que codifica para essa proteína possam contribuir para a progressão do câncer de mama (65).

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um dos mais potentes mitógenos celulares endoteliais e possui papel crítico na angiogênese. O VEGF liga-se, especificamente, a dois receptores transmembrânicos em células endoteliais para iniciar vias de transdução de sinais intracelulares que medeiam angiogênese e permeabilidade vascular (66). Várias linhas de experimentos, *in vitro* e *in vivo*, têm mostrado que a expressão aumentada de VEGF está associada com crescimento tumoral e metástase, enquanto a inibição da sinalização do VEGF resulta em supressão (67).

6) Durante seu desenvolvimento, mais cedo ou mais tarde, na maioria dos tipos de cânceres, a massa tumoral primária irá expelir células pioneiras, que se destacam da massa original, movem-se para fora do tumor invadindo tecidos adjacentes, para viajar até sítios distantes, onde poderão iniciar uma nova colônia de células malignas (68).

Trabalhos têm sido realizados na tentativa de identificar outros fatores responsáveis pela diferença de comportamento e pelo processo de metastatização dos tumores e, atualmente, a ênfase tem sido dada aos estudos que procuram compreender a progressão tumoral através das alterações moleculares. Os tumores são considerados como resultado de acúmulo de múltiplos processos nos genes que regulam o crescimento da célula e sua diferenciação (69).

Baseado nos diferentes fenótipos e evoluções sugeridos para a progressão do câncer de mama, o processo de transição epitélio-mesênquima tem sido indicado como principal responsável (43). A transição epitélio-mesênquima (TEM) é um processo fundamental e altamente conservado, que governa a morfogênese de organismos multicelulares, principalmente, durante o desenvolvimento

embrionário. Nele, um epitélio primitivo origina células mesenquimais com uma morfologia apropriada para a migração (70).

Na mama, assim como no modelo embrionário, a transição epitélio-mesênquima ocorre quando as células epiteliais perdem sua polaridade e seu contato célula-célula, modificam drasticamente seu citoesqueleto, desenvolvem componentes mesenquimais e manifestam fenótipo migratório.

Um dos melhores marcadores moleculares do processo TEM no carcinoma de mama é a perda da expressão da E-caderina, uma molécula de adesão cálcio-dependente, relacionada com a adesão célula-célula nos tecidos epiteliais (71). Este processo de transição tem sido reconhecido como um potente mecanismo para a progressão de carcinomas já que diversas vias de sinalização da transição epitélio-mesênquima, também, são comuns à progressão tumoral (72) e pouco se sabe sobre sua atuação no tipo histológico de carcinoma mais freqüente na população feminina, o carcinoma ductal invasivo.

No processo de metastatização, várias classes de proteínas apresentam função alterada, principalmente as proteínas de adesão célula-célula (CAMs), que são geralmente, membros das famílias das imunoglobulinas e caderinas dependentes de cálcio e as integrinas, responsáveis pela adesão da célula à matriz extracelular (73).

A catepsina D é uma endoprotease lisossomal ácida com 52-kDa, encontrada em praticamente todas as células dos mamíferos, além de ser um marcador tumoral muito estudado em câncer de mama. É uma enzima proteolítica que pode degradar a membrana basal, pode ter atividade mitótica em células MCF-7 onde o estrógeno foi depletado e contribui para proliferação, invasão e progressão do câncer (74). Muitos estudos têm mostrado que a catepsina D é um importante fator de prognóstico em câncer de mama (75).

Estudos mais recentes sugerem que a N-caderina acelera a sinalização via tirosina quinase e a mobilidade celular, sendo que altos níveis dessa proteína têm sido observados em linhagens celulares de tumores invasivos. A habilidade da N-caderina em acelerar os processos celulares de mobilidade, invasão e metástase deve-se, aparentemente, à ativação dos receptores de sinais do fator de crescimento fibroblasto FGF-2 (*fibroblast growth factor-2*), envolvendo interações entre eles e o domínio extracelular das moléculas de N-caderina (76). Em estudos

de linhagens celulares de mama, há relatos de que a produção de metaloproteinase-9 (MMP-9) estaria aumentada através da expressão da N-caderina, em resposta a fatores de crescimento, conferindo a essas células maior capacidade de invadir a matriz extracelular (76).

A expressão aumentada das caderinas e cateninas aparece associada ao desenvolvimento de metástases, nos carcinomas de mama. Há também relatos sobre a ocorrência de intensa reação imunohistoquímica para a E-caderina e para α - e β - cateninas em tumores metastáticos de mama, em portadoras de tumores primários, nos quais a expressão dessas proteínas estava ausente. Esse fato sugere a reativação da expressão dessas moléculas de adesão pelas células tumorais mamárias, após desprendimento dos tumores primários (77).

1.5- SISTEMA IMUNE E O CÂNCER

Com base nos conhecimentos acerca do sistema imunológico nos anos de 1960 e 1970 MacFarlane Burnet de Melbourne, formulou a teoria da *immune surveillance*, que postulava que os linfócitos protegem os indivíduos imunocompetentes contra aparecimento de tumores, portanto, segundo ele, o surgimento de uma doença neoplásica é resultado de uma falha no sistema de vigilância. A favor de sua teoria está a constatação de que pessoas mais idosas ou outros indivíduos com baixa resistência imunológica têm maior incidência de câncer, sendo a idade avançada seguramente o maior fator de risco para desenvolvimento de câncer. Além disso, para alguns tumores tais como melanoma e carcinoma mamário medular, a presença de infiltrado linfocítico é associada a um melhor prognóstico (78).

O interesse imediato na aplicação terapêutica da imunidade do câncer concentra-se em estimular o sistema imune contra os antígenos tumorais. Isso levou ao desenvolvimento de inúmeros protocolos de vacinação contra o câncer. A habilidade dessas vacinas de estimular a produção de anticorpos e de ativar os linfócitos T é observada com frequência, porém, ainda não se converteram em uma resposta antitumoral objetiva, clinicamente (79).

Um exemplo bem sucedido do aproveitamento desse conceito foi o trabalho que os autores mapearam os anticorpos produzidos pelos pacientes de

câncer de próstata utilizando uma biblioteca de peptídeos apresentada em fagos e identificando um potencial marcador de progressão tumoral, a proteína GRP78, altamente expressa em metástases (80). Concluíram que essa abordagem, feita em larga escala, poderia permitir a identificação de marcadores moleculares específicos para cada tipo de tumor. Atualmente foram isolados anticorpos monoclonais específicos de carcinoma de mama utilizando *Phage Display* (81).

Tradicionalmente, a maioria dos métodos de identificação de marcadores tumorais é baseada em anticorpos monoclonais, com anticorpos contra proteínas das quais se tenha alguma suspeita e, dessa forma, buscam os mesmos marcadores para diversos tipos de câncer. A utilização de metodologias que fazem varredura das células tumorais, sem conhecimento prévio das proteínas nelas presentes, propicia a identificação de marcadores tumorais novos. A técnica de bibliotecas apresentadas na superfície de fagos permite a utilização não apenas de um anticorpo monoclonal, mas de uma vasta biblioteca de anticorpos ou peptídeos contra o conjunto das proteínas do tumor. Desde sua concepção, a técnica de *Phage Display* vem sendo empregada visando à identificação de marcadores tumorais (82).

2.0- TECNOLOGIA PHAGE DISPLAY

Esforços em determinar funções de novos produtos gênicos identificados por sequenciamento de genomas têm se tornado um importante desafio científico. Identificar proteínas que interajam com estes novos produtos gênicos pode ajudar na dedução de sua ação, regulação e potencial papel em doenças (83).

Recentemente, técnicas envolvendo a análise de bibliotecas de proteínas vêm sendo empregadas para a seleção de moléculas com funções específicas. Tais técnicas têm sido utilizadas para aumentar a atividade de enzimas (84), melhorar a afinidade de ligação e especificidade de proteínas (85), aumentar a estabilidade de proteínas, identificar melhores ligantes para receptores (86) ou selecionar novos inibidores de proteinase com alta afinidade (87). Ao escolher uma estratégia de seleção para uma determinada função, é preciso considerar como isolar e caracterizar proteínas funcionais de uma biblioteca. A técnica de expressão de proteínas na superfície de fagos filamentosos é uma tecnologia

simples, que permite relacionar a proteína selecionada para característica desejada à sequência do DNA, permitindo o escrutínio de bibliotecas com título de até 10^{12} (88).

A técnica de *Phage Display* consiste na expressão e seleção por afinidade de proteínas ou peptídeos expressos em fusão com proteínas virais presentes em capsídeo de bacteriófagos. Os fagos recombinantes expressando peptídeos randômicos podem ser selecionados por afinidade e a seguir expandidos em ciclos adicionais de crescimento em bactérias *Escherichia coli* hospedeiras apropriadas (89).

Esta técnica foi desenvolvida por George Smith em 1985, quem expressou pela primeira vez a enzima de restrição *EcoRI* como uma fusão da proteína (pVIII) do capsídeo do fago. Utiliza-se o bacteriófago M13 (90), um vírus bacteriófago filamentosos que infecta bactérias gram-negativas que por sua vez apresentam *pilus F*. O vírus utiliza maquinária de replicação, transcrição e tradução da bactéria para se reproduzir. Este bacteriófago não provoca lise na célula hospedeira, mas induz um estado no qual a célula infectada origina e libera partículas virais, causando uma queda na taxa de reprodução bacteriana (91). Vetores virais como o fago lambda (92), bacteriófagos T4 e P4 (93), além dos vírus de eucariotos, tais como baculovírus, também podem ser utilizados neste processo (94).

A partícula de fago é formada por uma fita simples de DNA envolta por uma capa protéica constituída por cinco proteínas (pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX) (Figura 1). Destas cinco proteínas existem aproximadamente 2800 cópias da pVIII e cinco cópias da pIII. Neste sistema, o gene codificador do peptídeo ou proteína de interesse é geralmente fusionado a um dos genes dessas duas proteínas da capa protéica do fago (95). Assim, o peptídeo é expresso na extremidade N-terminal da pIII ou pVIII. A pIII está relacionada com a infectividade do fago pela ligação ao *pilus F* da célula bacteriana. Ela apresenta três domínios (D1, D2 e D3) separados por resíduos de glicina. Estudos cristalográficos estruturais dos domínios D1 e D2 mostraram uma conformação semelhante à ferradura de cavalo (96), ilustrado na figura 1C. Devido a baixa representatividade da pIII em relação a pVIII as bibliotecas de peptídeos sintéticos fusionados na pIII são mais indicadas para

descoberta de ligantes com alta afinidade, quando comparadas com as bibliotecas pVIII ligadas (94).

Em sistemas onde todas as pIII ou pVIII são utilizadas, o tamanho da proteína inserida no vetor é limitado, pois grandes proteínas interferem nas funções das proteínas do capsídeo, tornando o fago pouco infectivo. Este sistema *Phage display* foi criado para a exposição de bibliotecas de pequenos peptídeos, no máximo 30 aminoácidos (97).

A expressão do produto do gene fusionado e sua subsequente incorporação à proteína capsidial já madura resulta na exposição do ligante na superfície do fago, enquanto seu material genético permanece no interior desse. As novas partículas de fago são montadas no espaço periplasmático da bactéria (83). O gene *lacZ* no bacteriófago M13, facilita a distinção entre colônias bacterianas infectadas com fagos que carregam seqüências exógenas (colônias azuis) e colônias não infectadas por partículas virais ou mesmo infectadas com fagos selvagens resultantes de contaminação do ambiente laboratorial (colônias brancas) (98).

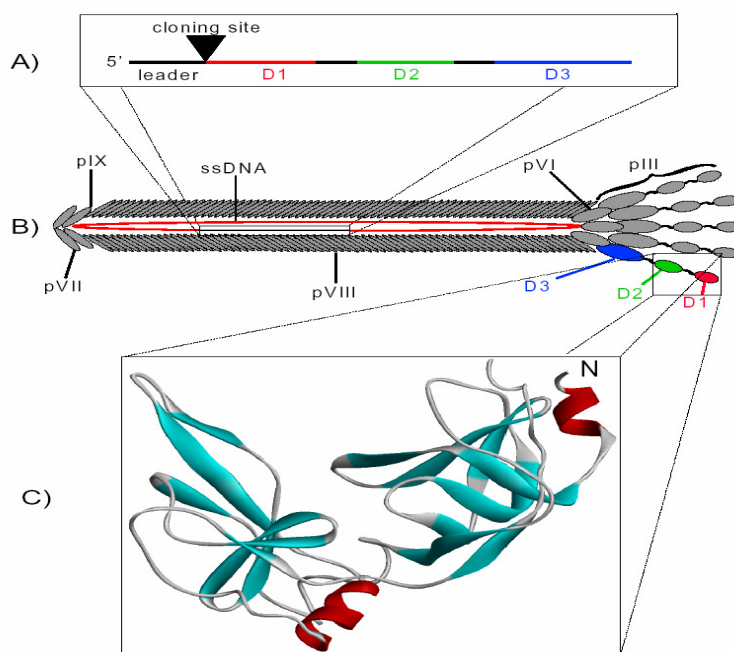


Figura 1: Fago filamentosso. A) Composição do gene III, mostrando o sítio de clonagem para introdução do gene adicional; B) Partícula viral com as proteínas pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX; C) Cristalografia dos domínios D1 e D2 da proteína III (97), as alfa-hélices estão coloridas em vermelho e as fitas β em ciano.

De maneira geral, duas abordagens básicas podem ser feitas com essa técnica. A primeira é a inserção de uma mutação em um gene estrutural do vírus, levando à expressão do peptídeo mutado na superfície da partícula viral, em condições tais que as funções essenciais do produto daquele gene não são afetadas. A segunda abordagem é a produção de uma biblioteca de peptídeos a partir da inserção de um oligonucleotídeo degenerado, o qual será expresso como fusão de uma das proteínas da capa viral (99). A perfeita exposição de um peptídeo na superfície do fago possibilita a atuação desta proteína como um ligante, uma enzima, um imunógeno ou desempenhando qualquer outra atividade em processos biológicos. A inserção de oligonucleotídeos degenerados e subsequente construção de bibliotecas de peptídeos tornam possível a seleção de proteínas com atividades ou afinidades específicas (100).

Outra característica importante é que essa nova metodologia utiliza os mais rápidos protocolos de seleção já descritos e possibilita a varredura de até 10^8 clones por ciclo de seleção. Esse método é mais rápido porque o sobrenadante das culturas infectadas, contendo de 10^{10} a 10^{13} clones por mL, pode ser utilizado diretamente para a seleção. Essa utilização prescinde da transferência para membranas que, além de limitar o número de clones (limitação de área) do filtro, é um processo extremamente trabalhoso (101).

Um ciclo completo de *Biopanning* está representado na Figura 2 abaixo (itens 1 a 6). Neste processo a molécula alvo é imobilizada em um suporte sólido, geralmente uma placa de ELISA, mas também se utiliza “beads”, resinas ou membranas. Uma população de fagos em solução é incubada com a molécula alvo. Os fagos contendo peptídeos sintéticos com afinidades pelo alvo são capturados e permanecem ligados; já os fagos não ligados (não específicos) são eliminados por sucessivas lavagens. O *pool* de fagos ligados ao alvo é então eluído e amplificado (crescido em *Escherichia coli*). Os fagos resultantes deste processo são titulados e submetidos a um novo *Biopanning* (ligação ao alvo, eluição e amplificação) visando o enriquecimento das seqüências específicas para o alvo. Após três ou quatro repetições deste processo, clones individuais são submetidos a ensaios imunológicos e suas seqüências de DNA podem ser obtidas por sequenciamento (102).

O processo de eluição dos fagos ligados a alvos protéicos imobilizados compreende um ponto chave nos protocolos de seleção, algumas alterações realizadas neste processo durante o primeiro passo de seleção por afinidade, podem levar ao isolamento de clones com maior afinidade para a molécula alvo. Por exemplo, foi testado tampões de eluição com pHs decrescentes, (103), enquanto em outro experimento foi usado a solução de proteína alvo como tampão de eluição (104) e outros autores utilizaram tampão de baixo pH e proteína alvo para a eluição (105). Como resultado, todos obtiveram aumento na seleção de clones fortemente ligantes às respectivas proteínas.

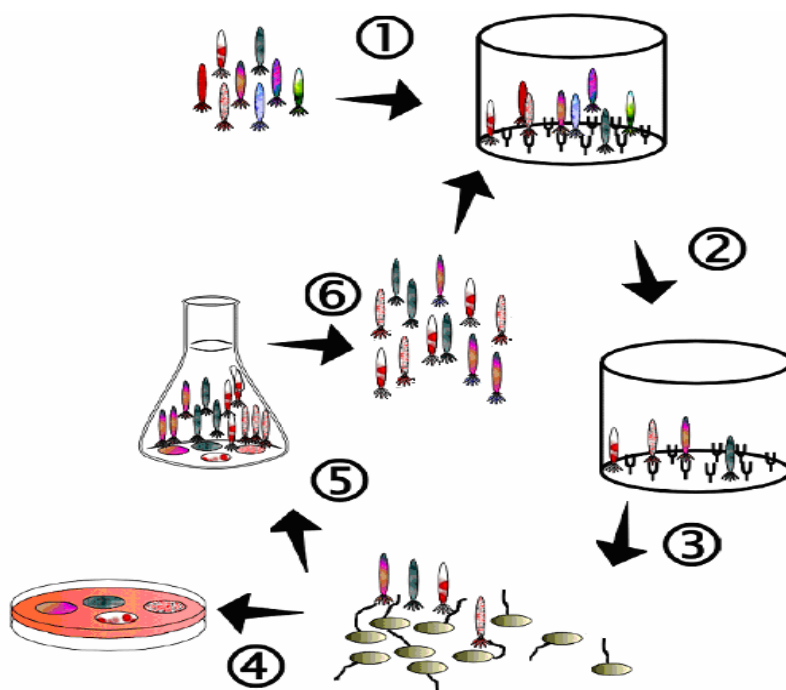


Figura 2: Esquema representativo do processo de “*Biopanning*”. 1) Incubação da biblioteca de fagos com o alvo imobilizado; 2) Retirada dos fagos não ligados por lavagens sucessivas; 3) Eluição dos fagos ligados e infecção de *E. coli* com pili F; 4) Titulação dos fagos eluídos; 5) Amplificação dos fagos eluídos; 6) População de fagos com maior afinidade pelo alvo.

O *Biopanning* é necessário porque bibliotecas de *Phage Display* são altamente diversas, contendo entre 10^6 e 10^{11} ligantes diferentes em uma população maior que 10^{12} partículas de fago. Isto significa que em uma biblioteca com uma diversidade de 10^8 , cada clone é representado por 100-1000 cópias já que, rotineiramente, 1-10% das moléculas de fago exibem uma proteína

recombinante em sua superfície quando utilizando sistemas de fagomídeos. Até a presente data, vários grupos têm superado essa limitação pelo uso de novos fagos *helper* (por exemplo, o hiperfago), os quais garantem uma alta porcentagem de apresentação da proteína fusionada (106).

Devido às células hospedeiras infectadas e sua progênie produzirem apenas 10^4 - 10^5 moléculas de fagos, mais de um *round* de seleção é necessário para enriquecer um ligante específico além do *background* de fagos não cognatos. Geralmente, a razão entre ligantes específicos e não específicos após um *round*, é inicialmente, de duas ou três ordens de magnitude e é superada por *rounds* seqüenciais de seleção, entretanto, aumento dos *rounds* de seleção, também, significa perda da diversidade na população de fagos alvo-específicos, gradual e desvantajosa.

A exposição em fagos apresenta vantagens sobre outras tecnologias pela facilidade de mapear grande número de clones simultaneamente. Bibliotecas de cDNA, tal como as expressas em fagos lambda, são limitadas pelo número de colônias com o qual podem ser detectadas por hibridização, tipicamente na ordem de 10^4 . Tecnologias baseadas em síntese química (química combinatorial) apresentam um limite máximo de peptídeos randômicos que podem ser mapeados com 10^3 a 10^4 seqüências diferentes (107).

Apesar das vantagens aqui apresentadas, existem alguns relatos que apontam problemas na utilização desses sistemas de expressão/seleção. O primeiro problema diz respeito à instabilidade observada em bibliotecas que apresentam alguns tipos de anticorpos e, além disso, há autores que consideram que o passo de amplificação, que envolve uma transfecção viral, possa ser um empecilho (108). Outros relatam, também, problemas de crescimento celular nas culturas que expressam a proteína de fusão, o que poderia ocasionar uma relativa tendenciosidade da biblioteca, que passaria a expressar, preferencialmente, as formas mais toleradas pela bactéria (109). Apesar desses problemas, as bibliotecas apresentadas em fagos (*Phage Display Libraries*), em conjunto com o procedimento de seleção (*biopanning*), são metodologias consagradas na literatura.

Os trabalhos com o uso da técnica *phage display* abrangem os mais diversos estudos a respeito de enfermidades humanas como o estudo do vírus da

Dengue (110), do vírus da AIDS (111), hepatite (112, 113), Parkinson (114), tuberculose (115), diabetes (116), hanseníase (117) câncer (118, 119, 120, 121,122), incluindo câncer de mama (81, 123, 124, 125) entre outros.

A técnica *Phage Display* poderá gerar biomarcadores específicos para auxiliar no diagnóstico e no tratamento individualizado de cada paciente. É muito provável que a análise do complexo conteúdo protéico de tecidos e diferentes fluidos biológicos tenha, no futuro, um impacto significativo na avaliação e no diagnóstico, não só do câncer, mas, também, de muitas outras patologias.

3.0-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Deugnier MA, Teulière J, Faraldo MM, et al: The importance of being a myoepithelial cell. *Breast Cancer Res* 4:224-230, 2002
2. Birnbaum D, Bertucci F, Ginestier C, et al: Basal and luminal breast cancers: basic or luminous? *Int J Oncol* 25:249-258, 2004
3. Ali SE, Coombes RC: Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nature Rev Cancer* 2:101-112, 2002
4. D'Amico J, Signoretti S, Nakamura N, et al: Growth factor requirements and basal phenotype of an immortalized mammary epithelial cell line. *Cancer Res* 62:89-98, 2002
5. Boecker W, Buerger H: Evidence of progenitor cells of glandular and myoepithelial cell lineages in the human adult female breast epithelium: a new progenitor (adult stem) cell concept. *Cell Prolif* 36:73-84, 2003
6. Callagy G, Cattaneo E, Daigo Y, et al: Molecular classification of breast cancers using tissue microarrays. *Diagn Mol Pathol* 12:27-34, 2003

7. BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. Rio de Janeiro, RJ: INCA, 2006
8. Falzoni R: Câncer de mama: história natural e anatomia patológica, in: Halbe : Tratado de ginecologia. São Paulo, Roca, 2000, p 2027-2041
9. Greebaum L: That's what it is. Lancet 355:745-746, 2000
10. Falkenberry SS, Legare RD: Risk factors for breast cancer. Philadelphia, Clin Obstet Gynaecol, 2002
11. Diab SG, Elledge RM, Clark GM: Tumor characteristics and clinical outcome of elderly women with breast cancer. J Natl Cancer Inst 92:550-556, 2000
12. Muss H, Thor A, Berry DA et al: C-erb-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. New England Journal of the National Cancer Institute Monographs, Bethesda, n.30, p.52-55, jan. 2001
13. Martin AM, Weber BL: Genetic and hormonal risk factors in breast cancer. J Natl Cancer Inst 92:1126-1135, 2000
14. Moretão AL, Angulski C, Piazza, MJ: Inibidores da aromatase e seu uso na prática clínica. Femina 29:695-700, 2001
15. Marchbanks PA, Mc Donald JA, Wilson HG, et al: Oral contraceptives and the risk of breast cancer. N Engl J Med 346:2025-2032, 2002
16. Mitra AK, Faruque FS, Avis AL: Breast cancer environmental risks: where is the link? J Environ Health 66:24-32, 2004
17. Nathanson KL, Wooster R, Weber BL: Breast cancer genetics: what we know and what we need. Nat Med 7:552-556, 2001

18. Pharoah PD, Day NE, Duffy S, et al: Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer* 71:800-809, 1997
19. Slattery ML, Kerber RA: A comprehensive evaluation of family history and breast cancer risk: The Utah population database. *JAMA* 270:1563-1568, 1993
20. Narod SA, Feunteun J, Lynch HT, et al: Familial breast-ovarian cancer locus on chromosome 17q12-q23. *Lancet* 338:82-83, 1991
21. Olopade OI, Fackenthal JD: Breast cancer genetics: implications of clinical practice. *Hematol Oncol Clin North Am* 14: p.705-725, 2000
22. Antoniou AC, Easton DF: Polygenic inheritance of breast cancer: implications for design of association studies. *Genet Epidemiol* 25:190-202, 2003
23. Sturgis EM, Castilho EJ, Li L, et al: Polymorphisms of DNA repair gene XRCC1 in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis* 20:2125-2129, 1999
24. Dorssers LCJ, Grebenchtchikov N, Brinkman A, et al: The prognostic value of BRCA1 in patients with primary breast cancer. *Clin Cancer Res* 10:6194-6202, 2004
25. Brody L, Biesecker B: Breast cancer susceptibility genes, BRCA1 and BRCA2. *Medicine* 77:208-226, 1998
26. Kato M, Yano K, Matsuo F, et al: Identification of Rad51 alteration in patients with bilateral breast cancer. *J Hum Genet* 45:133-137, 2000
27. Levy-Lahad E, Lahad A, Eisenberg S, et al: A single nucleotide polymorphism in the RAD51 gene modifies cancer risk in BRCA2 but not BRCA1 carriers. *Proc Natl Acad Sci* 98:3232-3236, 2001

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

29. Pinotti JA, Teixeira LC: Câncer de mama: importância, epidemiologia e fatores de risco, in Halbe H : *Tratado de ginecologia*. São Paulo, Roca, 2000, pp 2019-2022

30. Paz WA, Paim SP, Mello GL: Linfadenectomia axilar: análise retrospectiva de 470 casos de câncer de mama em diferentes estádios clínicos. *Rev Bras Mastol* 11:57-65, 2001

31. Jatoi I: Breast cancer screening. *Am J Surg* 177: 518-524, 1999
32. Kaplan SS: Clinical utility of bilateral whole-breast US in the evaluation of women with dense breast tissue. *Radiology* 221:641-649, 2001

33. Fisher B, Bauer M, Wickerham DL, et al: Relation of number of positive axillary nodes to the prognostic of patients with primary breast cancer: an NSABP update. *Cancer* 52:1551-1557, 1983

34. Osborne C, Wilson P, Tripathy D: Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic application. *Oncologist* 9:361-377, 2004

35. Stathopoulou A, Vlachonikolis I, Mavioudis D, et al: Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance. *Journal Clin Oncol* 20:3404-3412, 2002

36. Marsillac J: Introdução, in Chaves E: *Câncer de mama diagnóstico e tratamento*. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 1994, pp1-2

37. Barra A, Lucena CEM, Lages AF, et al: Controvérsias no rastreamento do câncer de mama. *Femina* 32:751-757, 2004

38. Lindblom A, Liljegren A: Tumors markers in malignancies. *BMJ* 320:424-427, 2000
39. Paci E, Cariddi A, Barchielli A: Long-term sequelae of breast cancer surgery. *Tumori* 82: 321-324, 1996
40. Breast cancer: prevalence, risk factors and management 2006. <http://www.nbcc.org.au>
41. Bloom DA, Eisner BH, Wolff, et al: Fundamental eponyms of embryology. *J Urol* 168:425-428, 2002
42. Porter DA, Krop IE, Nasser S, et al: A SAGE (Serial analysis of gene expression) view of breast tumor progression. *Cancer Res* 61:5697-5702, 2001
43. Yang X, Yu K, Hao Y, et al: LATS1 tumor suppressor affects cytokinesis by inhibiting LIMK1. *Nat Cell Biol* 6:609-617, 2004
44. Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70, 2000
45. Ali SM, Leitzel K, Chinchilli VM, et al: Relationship of serum HER-2/neu and serum CA 15-3 in patients with metastatic breast cancer. *Clin Chem* 8:1314-1320, 2002
46. Hayes DF, Thor AD: C-erbB-2 in breast cancer: development of a clinically useful marker. *Semin Oncol*, 29: 231-241, 2002
47. Pavelic ZP, Pavelic L, Lower EE, et al: c.myc, c-erb-B2, and Ki-67 expression in normal breast tissue and in invasive and noninvasive breast carcinoma. *Cancer Res* 52:2597-2602, 1992

48. Sandberg AA, Bridge JA: Updates on the cytogenetics and molecular of bone and soft tissue tumors: osteosarcoma and related tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 145:1-30, 2003
49. Burrow S, Andrulis IL, Poliak M, et al: Expression of insulin-like growth factor receptor, IGF-1, and IGF-2 in primary and metastatic osteosarcoma. *J Surg Oncol* 69:21-27, 1998
50. Boyd DB: Insulin and cancer. *Integr Cancer Ther* 2:315-329, 2003
51. Dupont J, Pierre A, Froment P, et al: The insulin-like growth factor axis in cell cycle progression. *Horm Metab Res* 35:740-750, 2003
52. Renehan AG, Zwahlen M, Minder C, et al: Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk: systematic review and meta-regression analysis. *Lancet* 363:1346-1353, 2004
53. Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC: P53 : 25 years after its discovery. *Trends Pharmacol Sci* 25:177-81, 2004
54. Stewart ZA, Pientepol J A: *Chem Res Toxicol* 14:243-263, 2003
55. Temmim L, Baker H, Sinowatz F: Immunohistochemical detection of p53 protein expression in breast cancer in young Kuwaiti women. *Anticancer Res* 21: 743-748, 2001
56. Metcalf S, Wheeler TK, Picken S, et al: P53 autoantibodies in 1006 patients followed up for breast cancer. *Breast Cancer Res* 2:438-443, 2000
57. Jeziorski A, Blonski JZ, Niewiadomska H. The expression of products of oncogens c-erbB2 and EGFR and proliferating antigens Ki67 and PCNA in primary invasive ductal cancer of female breast. *J Exp Clin Cancer Res* 19:61-67, 2000

58. Jalava PJ, Kuopio T, Juntti-Patinen L, et al: Ki-67 immunohistochemistry: A valuable marker in prognostication but also a risk of misclassification. Proliferation subgroups based on Ki-67 fraction and standardized mitotic index. *Histopathology*. 48:674-682, 2006
59. Santamaria L, Martin R, Gomez V, et al: Stereologic estimation of Ki-67, caspase3, and GSTP1 positive cells in prostate lesions. *Image Analysis Stereol* 24:77-84, 2005
60. Leong A, Lee A: Biological indices in the assessment of breast cancer. *J Clin Pathol Clin Mol Pathol* 48:221-238, 1995
61. Kirpatrick KL, Clark G, Ghilchick M, et al: hTERT mRNA expression correlates with telomerase activity in human breast cancer. *Eu J Surg Oncol* 29:321-326, 2003
62. Mokbel K, Parris CN, Ghilchic M, et al: The association between telo parameters, and KI-67 expression in breast cancer. *Am J Surg* 178:69-72, 1999
63. Wang L, Shi GG, Yao JC, et al: Expression of endothelial nitric oxide synthase correlates with the angiogenic phenotype of and predicts poor prognosis in human gastric cancer. *Gastric Cancer* 8:18-28, 2005
64. Poon RT, Fan ST, Wong J: Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *J Clin Oncol* 19:1207–1225, 2001
65. Lu H, Shu XO, Cui Y, et al: Association of genetic polymorphisms in the VEGF gene with breast cancer survival. *Cancer Res* 65: 5015-5019, 2005
66. Ferrara N, Gerber HP, Lecouter J: The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9:669–676, 2003

67. Gao YT, Shu XO, Dai Q, et al: Association of menstrual and reproductive factors with breast cancer risk: results from the Shanghai breast cancer study. *Int J Cancer* 87:295–300, 2000
68. Sporn MB: The war on cancer. *Lancet* 347:1377-1381, 1996
69. Shackney SE, Silverman JF: Molecular evolutionary patterns in breast cancer. *Adv Anat Pathol* 10:278-290, 2003
70. Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, et al: The epithelial-mesenchymal transition: New insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 172:973-981, 2006
71. Caldeira JR, Prando EC, Quevedo FC, et al: cdh 1 Promoter hypermethylation and e-cadherin protein expression in infiltrating breast cancer. *BMC Cancer* 6:48, 2006
72. Friedl P, Wolf K: Tumor-cell invasion and migration: diversity and escape mechanism. *Nat Rev Cancer* 362-374, 2003
73. Fuchs B, Pritchard DJ: Etiology of osteosarcoma. *Clin Orthop* 40-52, 2002
74. Greco S, Marsigliante S, Leo G, et al: Co-expression of thymidine kinase and cathepsin D in 200 primary breast carcinoms. *Cancer Lett* 160:13-19, 2000
75. Billgren AM, Rutqvist LE, Joansson H, et al: The role of cathepsin D and PAI-1 in primary invasive breast cancer as prognosticators and predictors of treatment benefit with adjuvant tamoxifen. *Eur J Cancer* 36:1374-1390, 2000
76. Hazan R, Phillips G, Qiao G, et al: Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol* 148:779-790, 2000

77. Ilyas M: Adhesion molecule expression in breast cancer: the phoenix in tumor metastasis? *J Pathol* 190:3-5, 2000

78-Dupont B. Introduction: current concepts in immunity to human cancer and therapeutic antitumor vaccines. *Immunol Rev.* (188), 5-8, 2002.

79. Dupont B: Introduction: current concepts in immunity to human cancer and therapeutic antitumor vaccines. *Immunol Rev* 188:5-8, 2002

80. Minitz PJ, Kim j, Do KA, et al: Fingerprinting the circulating repertoire of antibodies from cancer patients. *Nat Biotechnol* 21: 57-63, 2003

81. Mazuet C, Lerouge D, Poul MA, et al: Breast carcinoma specific antibody selection combining phage display and immunomagnetic cell sorting. *Biochem Biophys Res Comm* 348:550-559, 2006

82. Austin P: Will dAbs challenge mAbs? *Nature* 341:484-485, 1989

83. Benhar I, Biotechnological applications of phage and cell display. *Biotechnol Adv* 19:1-33, 2001

84. Demartis S, Huber A, Viti F, et al: A strategy for the isolation of catalytic activities from repertoires of enzymes displayed on phage. *J Mol Biol* 286:617-633, 1999

85. Atwell S, Wells JA: Selection for improved subtiligases by phage display. *Proc Natl Acad Sci* 96:9497-9502, 1999

86. Koivunen E, Arap W, Rajotte D, et al: Identification of receptor ligands with phage display peptide libraries. *J Nucl Med* 40:883-888, 1999

87. Kiezak L, Kasztura M, Koscielska-Kasprzak K, et al: Selection of potent chymotrypsin and elastase inhibitors from M13 phage display library of basic pancreatrypsin inhibitor (BPTI). *Biochem Biophys Acta*:153-163, 2001
88. Wittrup KD: Phage on display. *Trends in Biotechnology* 17:423-424, 1999
89. Parmely SF, Smith GP: Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* 73:305-318, 1988
90. Sidhu SS: Engineering M13 for phage display. *Biomol Eng* 18: 57-63, 2001
91. Azzazy, HM, Highsmith WE JR: Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clin Biochem* 35:425-45, 2002
92. Sternberg N, Hoess RH: Display of peptides and proteins on the surface of bacteriophage lambda. *Proc Natl Acad Sci* 92:1609-1613, 1995
93. Houshmand H, Froman G, Magnusson G: Use of bacteriophage T7 displayed peptides for determination of monoclonal antibody specificity and biosensor analysis of the binding reaction. *Anal Biochem* 268: 363-370, 1999
94. Rodi DJ, Makowski L: Phage display technology-finding a needle in a vast molecular haystack. *Curr Opin Biotechnol* 10:87-93, 1999
95. Brígido MM, Maranhão AQ: Bibliotecas Apresentadas em FAGOS Biotecnolog. *Cienc. Desenvol.* 26:44-55, 2002
96. Holliger P, Williams RL, Riechmann L: Crystal structure of the two Nterminal domains of g3p from filamentous phage fd at 1.9 Å: Evidence for conformational lability. *J Mol Biol* 288: 649-657, 1999
97. Phizicky EM, Fields S: Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol* 59: 94-123, 1995

98. Messing J: New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol* 101:20-78, 1983
99. Boublik Y, Di Bonito P, Jones I. M: Eukaryotic virus display: engineering the major surface glycoprotein of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) for the presentation of foreign proteins on the virus surface. *Biotechnology* 13: 1079-1084, 1995
100. Makowski L: Phage display: structure, assembly and engineering of filamentous bacteriophage M13. *Curr Opin Struct Biol* 4:225-230, 1994
101. Brígido MM, Maranhão AQ: Bibliotecas apresentadas em fago em fagos. *Biotechnol Cienc Desenvol* 26: 44-51, 2002
102. Barbas CF, Burton, DR, Scott, SJG. *Phage Display. A Laboratory Manual* New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001.
103. D'mello F, Howard CR: An improved selection procedure for the screening of phage display peptide libraries. *J Immunol Methods* 247: 191–203, 2001
104. Gaskin DH, Starck K, Turner NA, et al: Phage display combinatorial libraries of short peptides: ligand selection for protein purification. *Enzyme Microb Technol* 28: 766–772, 2001
105. Yu H, Dong XY, Sun Y: An alternating elution strategy for screening high affinity peptides from a phage display peptide library. *Biochem Eng J* 2003
106. Konthur Z, Cramer R. High-throughput applications of phage display in proteomic analyses. *Targets* 2: 261-270. 2003
107. Noren KA, Noren CJ: Construction of high-complexity combinatorial phage display peptide libraries. *Methods* 23:169-178, 2001

108. Rapoport B, Portolano S, McLachlan SM: Combinatorial libraries: new insights into human organ specific autoantibodies. *Immunol Today* 16:43-49, 1995
109. Kenan DJ, Tsai DE, Keene JD: Exploring molecular diversity with combinatorial shape libraries. *Trends Biochem Sci* 19:57 -63, 1994
110. Wu H.C., Huang YL., Chao, TT: Identification of B-cell epitope of dengue virus type 1 and its application in diagnosis of patients. *J Clin Microbiol* 39, 977-982, 2001
111. Guardiola J, De Berardinis P., Sartorius R., et al: *Phage display* of epitopes from HIV-1 elicits strong cytolytic responses in vitro and in vivo. *Adv. Exp. Med. Biol* 495: 291-298, 2001.
112. Zhang ZC, Hu XJ, Yang Q: Generation of high affinity human single-chain antibody against PreS1 of hepatitis B virus from immune phage-display antibody library. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 3:77-81, 2004
113. Gu Y, Zhang J, Wang YB: Selection of a peptide mimicking neutralization epitope of hepatitis E virus with phage peptide display technology. *World J Gastroenterol* 10: 1583-1588, 2004.
114. Gearhart DA, Toole PF, Warren Beach J: Identification of brain proteins that interact with 2-methylnorharman. An analog of the parkinsonian-inducing toxin, MPP+. *Neurosci Res* 44: 255-265, 2002
115. Jeong EH, Son YM, Hah YS, et al: RshA mimetic peptides inhibiting the transcription driven by a *Mycobacterium tuberculosis* sigma factor Sig H. *Biochem Biophys Res Commun* 339: 392-398, 2006
116. Baltrusch S, Francini F, Lenzen S, et al: Interaction of glucokinase with the liver regulatory protein is conferred by leucine-asparagine motifs of the enzyme. *Diabetes* 54: 2829-2837, 2005

117. Yang WJ, Lai JF, Peng KC, et al: Epitope mapping of *Mycoplasma hyopneumoniae* using phage displayed peptide libraries and the immune responses of the selected phagotopes. *J Immunol Methods* 304: 15-29, 2005
118. Krag DN, Shukla GS, Shen GP: Selection of tumor-binding ligands in cancer patients with Phage Display Libraries. *Cancer Res* 66: 7724-7733, 2006
119. Zhang J, Spring H, Schwab M: Neuroblastoma tumor cell-binding peptides identified through random peptide phage display. *Cancer Letters* 171: 153-164, 2001
120. Du B, Qian M, Zhou Z, et al. In vitro panning of a targeting peptide to hepatocarcinoma from a phage display peptide library. *Biochem Biophys Res Commun*, 34: 3956-3962, 2006
121. Hu S, Guo X, Xie H, et al: Phage display selection of peptides that inhibit metastasis ability of gastric cancer cells with high liver-metastatic potential. *Biochem Biophys Res Commun* 341: 964-972, 2006
122. Ferrieu-Weisbuch C, Michel S, Collomb-Clerc E, et al: Characterization of prostate-specific antigen binding peptides selected by phage display technology. *J Mol Recognit* 19: 10-20, 2006
123. Pavoni E, Pucci A, Vacacaro P, et al: A study of the humoral immune response of breast cancer patients to a panel of human tumor antigens identified by phage display. *Cancer Detect Prev* 30:248-256, 2006
- 124- Belimezi M, Papanastassiou EM, Baxevas CN, et al: Growth inhibition of breast cancer cell lines overexpressing Her2/neu by a novel internalized fully human Fab antibody fragment. *Cancer Immunol Immunother* 55:1091-1099, 2006
- 125- Wei J, Liu Y, Yang S, et al: Screening of Single-Chain Variable Fragments against TSP50 from a Phage Display Antibody Library and their expression as soluble proteins. *J Biomol Screen* 11:546-552, 2006

CAPÍTULO II

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

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 *Biopanning* 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 seqüenciado e traduzido. As seqüências peptídicas selecionadas foram analisadas por bioinformática e pelas técnicas ELISA, *dot-blotting*, *western-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-hodgkin e melanoma. Todos os fagos selecionados apresentaram alto grau de informação e Razão do Índice ELISA acima de 1, o que é considerado significativo. Tanto em *Dot-blotting* quanto em *western-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, câncer de 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 câncer de 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 *biopanning* 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 there is no primary prevention. Early detection is the main objective aiming decrease mortality and increase survival. We used phage display technology to isolate ligand 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 order to eliminate peptides that may recognize healthy tissues. Remaining phages in the supernatant 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 selected phage, BC04, BC05 and BC07 have specifically marked the vascular walls of tumor cells. The selected phage may be used in the future as tissue biomarkers for diagnosis and therapeutic procedures in breast cancer. The high information content and the significant data presented by all immunological assays have validated 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 das mulheres 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 seqüências 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 anticorpos recombinantes anticâncer, mais comumente usados como moléculas *scFv* (*single chain fragment variable*), as quais podem ser modificadas para aumentar sua afinidade e avidéz 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 malignas da mama foram classificadas de acordo com a sexta edição do Sistema TNM (Classificação de tumores malignos), da American Joint Committee 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.

TABELA 1- Parâmetros clínicos e laboratoriais das pacientes que doaram tecido de mama para extração de proteínas totais. Os laudos anátomo-patológicos foram realizados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Resultado Anatomo-patológico	Receptor de Estrógeno	Grau Histopatológico	Estadio	TNM
Carcinoma Ductal Infiltrante (50)	+ (35)	1 (18)	I (7)	pT1cpNOMO (5)
				pT1bpNOMO (2)
			IIA (5)	pT1bpNxMO (2)
				pT2pNOMO (2)
				pT1bpN1aMO (1)
			IIIA (2)	pT2pN2aMO (1)
				pT1cpN2aMO (1)
			IIB (4)	pT2pN1aMO (4)
		2 (13)	I (2)	pT1bpNOMO (1)
				pT1cpNOMO (1)
			IIA (5)	pTpNOMO (2)
				pT2pNxMO (3)
			IIIA (3)	pT2cpN2aMO (2)
				pT1cpN2aMO (1)
			II B (3)	pT2pN1aMO (3)
		3 (4)	IIA (3)	pT2pNxMO (3)
			IIB (1)	pT2pN1aMO (1)
	- (15)	1 (6)	IIA (3)	pT2pNOMO (3)
			IIB (3)	pT2pN1aMO (3)
		2 (9)	IIA (4)	pT2pNxMO (4)
			IIIA (1)	pT2pN2aMO (1)
			IIB (4)	pT2pN1aMO (2)
				pT2pNxMO (2)

Os números apresentados dentro dos parênteses representam o número de pacientes que estão incluídas dentro de cada classificação.

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 de Extração (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: $2,28 \times 10^9$ transformantes) e *Ph.D.-12* (complexidade: $2,7 \times 10^9$ 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[®] 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 4°C 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 NaHCO₃ pH 8,6; 5mg/mL BSA e NaN₃ 0,02%) por 1 hora a 4°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 1º poço foram incubadas com 2×10^{10} partículas de fagos de cada biblioteca e incubado por uma hora à temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e adicionado ao 2º 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 eluídos 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 seriadas 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* ($OD_{600} \sim 0,5$). 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 45°C 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 37°C, 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 37°C 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 37°C. 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 4°C. Em seguida a placa foi centrifugada por 1 hora 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 PBS 1X (Tampão Fosfato Salina).

6.0-ELISA

Uma placa de alta afinidade (Costar-Corning 3590, NY, USA) foi sensibilizada 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 1×10^{11} por poço dos fagos selecionados e do fago helper (fago que não expressa a 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 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 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: (cut off= média Helper + 3X desvio padrão). O índice ELISA foi calculado considerando-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 oriunda do 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* (OD₆₀₀ ~ 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 37°C, por 24 horas, sob agitação (250 rpm). Para isolar os fagos das bactérias, a placa foi centrifugada a 3700 rpm, a 20°C, 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, a 20°C, 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 EDTA e 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, 20°C, 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 seqüenciamento, foram utilizados 500ng de DNA molde, 5pmol do *primer* -96 gIII (5'-OH CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3' - Biolabs) e Premix (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit. – Amersham Biosciences). A reação de 35 ciclos foi realizada em Termociclador de placas (MasterCycler - Eppendorf) nas seguintes condições: desnaturação (a 95°C por 20 segundos); anelamento do *primer* (a 58°C por 15 segundos) e extensão (a 60°C por 1 minuto). O DNA seqüenciado foi precipitado com 1mL de acetato de amônio e etanol 7,5M, homogeneizando a placa com leve agitação. Foram acrescentados 27,5 µl 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 ressuspensos em tampão de diluição (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit. – Amersham Biosciences). A leitura do seqüenciamento foi realizada em um seqüenciador automático MegaBace 1000 (Amersham Biosciences) no laboratório de Genética Molecular (UFU) .

9.0- Bioinformática

A tradução da sequência de aminoácidos obtidas 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.-12TM or Ph.D.-7TM) 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 os programas *Blast* (www.ncbi.nlm.nih.gov) e *immunepitope* (www.immunepitope.org) e o cálculo da frequência 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 4×10^{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-T e 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 40 µg 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 4×10^{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 1 hora. 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 desnecessário para 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 às interações hidrofóbicas entre tecidos e proteínas reagentes, foi utilizada solução de albumina bovina 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/clon) por 24 horas a 4°C, 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 37°C, com o anticorpo anti-M13 de camundongo (1/1000) por 40 minutos a 37°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 tetrahydrochloride (DAB) em tampão PBS. As lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos. A contra-coloração foi feita com Hematoxilina de Harris durante 10 segundos e, posteriormente, a lâmina foi 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-“*Biopanning*” e titulações

A seleção de peptídeos ligantes a proteínas do câncer de mama foi feita utilizando a mistura de duas bibliotecas de peptídeos expressas na superfície de fago filamentosso M13 e foram realizados três passos de subtração utilizando proteína de tecido sadio, para garantir a eficiência de seleção, eliminando potenciais proteínas ligantes presentes em tecidos sadios.

Durante 3 ciclos consecutivos de *biopanning*, todas as colônias de bactérias ER2738 infectadas com fago presentes nas placas de titulação apresentaram coloração azul, indicando a quebra do substrato X-Gal, que indica expressão do gene da β -galactosidase presente nos fagos.

A quantidade de fagos nas titulações pré e pós-seleção em todos os ciclos de “*Biopanning*” é mostrada na Tabela 2. Os títulos de entrada dos fagos no “*Biopanning*” foram sempre maiores que os títulos de saída, pois os fagos com maior afinidade a proteínas do tumor ficam ligados a elas por interação peptídeo/proteína e o restante dos fagos com baixa ou sem afinidade foram lavados (removidos). Nas amplificações ocorre o inverso, indicando a eficiência do processo.

TABELA 2: Seleção dos fagos com peptídeos ligantes a proteínas do câncer de mama. Título obtido (pfu) no processo de *biopanning*.

Ciclo de seleção	Número de partículas de fagos	
	Entrada	Saída
1º	$1,5 \times 10^{11}$	$4,6 \times 10^4$
2º	$2,4 \times 10^{11}$	$7,0 \times 10^3$
3º	$4,9 \times 10^{11}$	$1,6 \times 10^4$

2.0-Extração de DNA

O DNA extraído do fago foi submetido à eletroforese em gel de Agarose 1%, para verificar sua qualidade e estimar sua quantidade, comparando a intensidade das bandas das amostras com a intensidade da banda do DNA padrão, o qual continha uma massa de 400ng. As quantidades estimadas dos DNAs extraídos foram próximas da quantidade do DNA padrão (Figura 1).

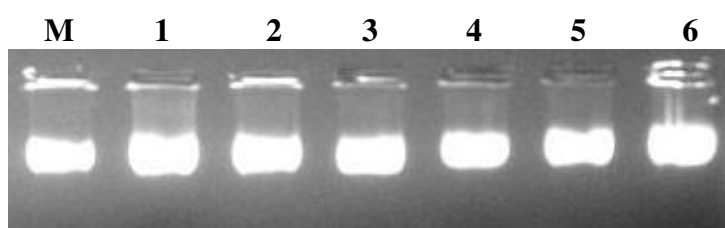


Figura 1: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, contendo: M: DNA de fago M13 padrão contendo 400ng de DNA (Pharmacia). 1-6: Amostras do DNA de fago M13 selecionados no *Biopanning*.

3.0-Sequenciamento

Confirmada a qualidade do DNA, foi realizado o seqüenciamento de 80 clones. Os cromatogramas gerados pelo seqüenciador foram analisados pelo programa *Phred basecalling* para análise da qualidade. Nos 80 clones seqüenciados, foi possível identificar 40 peptídeos.

4.0-Análise dos dados por bioinformática

Existem diversos parâmetros que indicam o sucesso de seleção de cada peptídeo (10). Na Tabela 3 são apresentados os seguintes parâmetros: seqüências de aminoácidos obtidas, freqüência dos peptídeos selecionados, freqüência esperada desses peptídeos na biblioteca original, amplificação dos peptídeos decorrentes do processo de seleção em relação à freqüência esperada dos peptídeos da biblioteca original, grau de informação de cada peptídeo e número provável de clones independentes dentro da biblioteca.

TABELA 3: Seqüências de aminoácidos dos clones selecionados, freqüência observada, freqüência esperada, amplificação dos peptídeos e grau de informação.

Clone	Peptídeo	Frequência Observada (FO)	Probabilidade da Frequência Randômica* (FE)	Amplificação (FO/FE)	I(m)**	λ ***
BC01	HSLKHNNRSAQS	2.5	$1,2 \times 10^{-15}$	$20,0 \times 10^{12}$	34,356	0,0000024
BC02	KVWIVST	32.5	$4,3 \times 10^{-11}$	$7,4 \times 10^9$	23,869	0,08
BC03	QTALLHTQAITT	2.5	$9,4 \times 10^{-16}$	$26,5 \times 10^{12}$	34,600	0,0000018
BC04	HSLRHDSLRLPHT	10,0	$6,8 \times 10^{-14}$	$1,4 \times 10^{12}$	30,319	0,00013
BC05	HSWHYTAQTPHL	2.5	$5,0 \times 10^{-14}$	$4,9 \times 10^{12}$	30,626	0,0001
BC06	KVWWLPPSPFPT	2.5	$1,3 \times 10^{-16}$	$1,8 \times 10^{14}$	36,578	0,0000002
BC07	NAPKLPT	2.5	$3,5 \times 10^{-9}$	$7,1 \times 10^6$	19,470	7
BC08	KVWSLSSPALAV	2.5	$2,3 \times 10^{-16}$	$1,0 \times 10^{14}$	36,008	0,00000004
BC09	KTFVEPPFHNHT	5,0	$8,1 \times 10^{-11}$	$3,0 \times 10^8$	23,236	0,16
BC10	KLWVIPQ	2.5	$6,8 \times 10^{-8}$	$3,6 \times 10^5$	16,503	136,5
BC11	APPTPEVLRLYV	2.5	$1,4 \times 10^{-17}$	$1,7 \times 10^{15}$	38,807	0,00000002
BC12	HSLKHNNLLRS	2.5	$3,9 \times 10^{-12}$	$6,3 \times 10^9$	32,440	0,0078
BC13	HSLKHNNPLLRS	2.5	$1,8 \times 10^{-14}$	$1,3 \times 10^{12}$	31,648	0,00003
BC14	HSLKHNNPLLRS	2.5	$1,5 \times 10^{-16}$	$1,6 \times 10^{14}$	13,410	0,0000003
BC15	WAAPSLMQAMPM	2.5	$1,6 \times 10^{-13}$	$1,4 \times 10^{11}$	29,463	0,0003
BC16	ESGPPSPNVNHQ	2.5	$1,4 \times 10^{-14}$	$1,7 \times 10^{12}$	31,899	0,000028
BC17	DFNMQPGCLLLI	2.5	$2,1 \times 10^{-12}$	$1,1 \times 10^{10}$	26,889	0,004
BC18	KVWMLNAAPVIR	2.5	$2,6 \times 10^{-18}$	$9,3 \times 10^{15}$	40,491	0,00000000005
BC19	HSLKHNNLLRS	5,0	$1,4 \times 10^{-15}$	$3,5 \times 10^{13}$	34,202	0,00000028
BC20	HTLKQDIRLIQS	2.5	$4,1 \times 10^{-12}$	$6,0 \times 10^9$	26,220	0,008
BC21	HWYNVRFAPTSY	2.5	$6,2 \times 10^{-16}$	$4,0 \times 10^{13}$	35,016	0,000001
BC22	NLLHFDYVLWEY	2.5	$4,5 \times 10^{-11}$	$5,5 \times 10^8$	23,824	0,09
BC23	KVWVLPI	2.5	$3,6 \times 10^{-9}$	$6,8 \times 10^6$	19,442	7,28
BC24	TSWPLSR	2.5	$2,5 \times 10^{-13}$	$9,0 \times 10^{10}$	29,017	0,0005

*Probabilidade de seqüência randômica = freqüência esperada na biblioteca (FE) **Amplificação = freqüência observada/freqüência esperada ***I(m) = grau de informação = $-\ln$ (probabilidade de seqüência randômica) **** λ = numero provável de clones independentes na biblioteca = complexidade x FE, onde complexidade da biblioteca ($2,8 \times 10^9$ - Ph.D.-7) e ($2,7 \times 10^9$ - Ph.D.-12).

Após a tradução das seqüências de DNA pelo programa DNA2PRO12, o cálculo da freqüência de cada aminoácido nos peptídeos seqüenciados 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 4- Frequência dos aminoácidos dos clones seqüenciados. 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 (Fenilalanina)	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 (Tryptofano)	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 seqüências consenso entre os peptídeos selecionados foi utilizado o programa CLUSTAL W (18.1) que revelou dois motivos mais freqüentes (Figura 2). Entre os peptídeos, seis deles apresentam o motivo HSL, presente na seqüência consenso formada pelos aminoácidos de maior freqüência.

A				B			
BC07	---NAP----	KLPT	7	BC07	---NAP----	KLPT	7
BC15	--WAAPSLMQAMPM		12	BC15	--WAAPSLMQAMPM		12
BC02	KVWIVST-----		7	BC02	KVWIVST-----		7
BC08	KVWSLSS--PALAV		12	BC08	KVWSLSS--PALAV		12
BC06	KVWWLPP--SPFPT		12	BC06	KVWWLPP--SPFPT		12
BC23	KVWVLPI-----		7	BC23	KVWVLPI-----		7
BC18	KVWMLNA--APVIR		12	BC18	KVWMLNA--APVIR		12
BC24	TSWPLSR-----		7	BC24	TSWPLSR-----		7
BC09	KTFVEPPFHNHT--		12	BC09	KTFVEPPFHNHT--		12
BC10	KLWVIPQ-----		7	BC10	KLWVIPQ-----		7
BC13	HSLKHNNLLRS--		12	BC13	HSLKHNNLLRS--		12
BC19	HSLKHNNLLRS--		12	BC19	HSLKHNNLLRS--		12
BC14	HSLKHNNPLRS--		12	BC14	HSLKHNNPLRS--		12
BC01	HSLKHNNRSAQS--		12	BC01	HSLKHNNRSAQS--		12
BC12	HSLRTDIYLIK--		12	BC12	HSLRTDIYLIK--		12
BC20	HTLKQDIRLIQS--		12	BC20	HTLKQDIRLIQS--		12
BC04	HSLRHDSLRPHT--		12	BC04	HSLRHDSLRPHT--		12
BC05	HSWHYTAQTPHL--		12	BC05	HSWHYTAQTPHL--		12
BC11	APPTPEVLRLYV--		12	BC11	APPTPEVLRLYV--		12
BC16	ESGPPSPNVNHQ--		12	BC16	ESGPPSPNVNHQ--		12
BC17	DFNMQPGCLLLI--		12	BC17	DFNMQPGCLLLI--		12
BC21	-HWYNVRFAPTSY-		12	BC21	-HWYNVRFAPTSY-		12
BC22	NLLHFDYVLWEY--		12	BC22	NLLHFDYVLWEY--		12
BC03	QTALLHTQAITT--		12	BC03	QTALLHTQAITT--		12

Figura 2: 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 5).

Tabela 5- Análise da similaridade dos peptídeos selecionados com proteínas humanas

CLONE	PEPTÍDEO	MOTIVOS PROVÁVEIS (em azul)	PROVÁVEIS PROTEÍNAS	NÚMERO DE ACESSO	IDENTIDADE %
BC01	HSLKHNNRSAQS	ISLKHN RL ALAQ	-shugoshin-like 2	NP_689737.3	58,33
		HSLKH N K RV LFS	-oxygen regulated protein precursor variant	BAD96476.1	66,67
		HSLKH N K RV LFS	-HYOU1 protein	AAH72436.1	66,67
		RSLR H NN R RLQA	-signal-induced proliferation-associated protein	NP_006738.2	58,33
BC02	K V WIVST	K I WIV S F	-WDSUB1	AAH29520.1	71,43
		K V WIV T S	-TGF-beta resistance-associated protein TRAG	AAL03983.1	71,43
		K V WIV T S	-rabconnectin-3 beta isoform 1	NP_056100.2	71,43
		C V WIV V T	-intrinsic factor-vitamin B12 receptor	AAK61830.1	71,43
BC03	QTALLHTQA I TT	QTALA H TQ H AAR	-golgi autoantigen, golgin subfamily a, 2	CAI13842.1	58,33
		QAELL H SQA R LA	-FBF1 protein	AAH07570.1	50,00
		QAELL H SQA R LA	-zinc finger protein 462, isoform	AAH23549.1	50,00
		NTALL N TQ T PIY	-Fas (TNFRSF6) binding factor	EAW59011.1	50,00
BC04	HSLRHDSL R PHT	SLL K HQSL R PDE	-kallikrein 2, prostatic isoform 3	NP_001002232.1	50,00
		LSLR N NSL R TFT	-insulin-like growth factor binding protein, acid -- labile subunit	NP_004961.1	58,33
		HQL R LGSL H PHT	-UFO_HUMAN Tyrosine-protein kinase receptor UFO precursor (AXL oncogene)	P30530	66,67
		HGLRHDS S GEG	-IGHMBP2 protein	AAH00290.1	50,00

BC05	HSWHYTAQTPHL	QLVHYTAQPLFL	-(Heat shock transcription factor 1) (HSTF 1)	XP_001127807.1	50,00
		TCQHWSAQTPHT	-plasminogen	AAA36451.1	50,00
		HSWHYHWPSWLL	-similar to iGb3 synthase	XP_060537.10	50,00
		PENHYTNQTDMP	-orphan G-protein coupled receptor isoform 2	AAS13466.1	41,67
BC06	KVWWLPPSPFPT	PIPVGPPSPFPT	- KIAA1675 protein	BAB21766.2	58,33
		PIPVGPPSPFPT	-transcription factor MEL1	BAB84297.1	58,33
		SSWNLPPGPFPL	-Cytochrome P450, family 2	AAH67435.1	58,33
		WTWWLKPSPAAW	-G-protein	CAI17542.1	50,00
BC07	NAPKLPT	NAPKLPK	-AN1, ubiquitin-like	CAH72966.1	85,71
		NAPKLPK	-ANUBL1 protein	AAH48968.1	85,71
		DAPKLPE	-SREBP cleavage-activating protein	NP_036367.2	71,43
		IEPKLPT	-Ras protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 1 isoform 2	NP_722522.1	71,43
BC08	KVWSLSSPALAV	CQGILSTPALAV	-KIAA 0133, isoform CRA_a	EAW69904.1	58,33
		KVWSLTSSSART	-G-protein coupled receptor GPR133	AAP35063.1	50,00
		VKVSASSPSLAV	-glucocorticoid receptor	CAJ65924.1	58,33
		KNQQSSSLSLAV,	-telomerase-associated protein 1	EAW66475.1	50,00
		KIHSGSVTALHV			

BC09	KTFVEPPFHNHT	<p>KTFEPPFEKEA</p> <p>KTFEPPFEKEA</p> <p>KTFEPPFEKEA</p> <p>KTFEPPFEKEA</p>	<p>-spectrin repeat containing, nuclear envelope 2,</p> <p>- AF435011_1 NUANCE</p> <p>- nesprin-2</p> <p>- spectrin repeat containing, nuclear envelope 2</p>	<p> EAW80842.1</p> <p> AAL33548.1 </p> <p> AAN60443.1 </p> <p> EAW80844.1 </p>	<p>58,33</p> <p>58,33</p> <p>58,33</p> <p>58,33</p>
BC10	KLWVIPQ	<p>KLWVIEA</p> <p>KLWALPQ</p> <p>FLWVIPI</p> <p>KLWVIEA</p>	<p>-DOC-2/DAB2 interactive protein</p> <p>-Transducin (beta)-like 3</p> <p>-histamine receptor H1</p> <p>-KIAA1743 protein</p>	<p> AAM00371.1 </p> <p> AAH35409.1 </p> <p> NP_000852.1 </p> <p> BAB21834.2 </p>	<p>71,43</p> <p>71,43</p> <p>71,43</p> <p>71,43</p>
BC11	APPTPEVLRLYV	<p>GPPSEPVLQTQS</p> <p>LAPTDVLRME</p> <p>HRAEEPVLRLDP</p> <p>APPTQPVLPQT</p>	<p>-protein tyrosine phosphatase receptor type D</p> <p>-KIAA1991 protein</p> <p>- sema domain, immunoglobulin domain (Ig),</p> <p>-YTH domain family</p>	<p> BAE79816.1 </p> <p> BAC02700.1 </p> <p> EAW65062.1 </p> <p> NP_689971.4 </p>	<p>50,00</p> <p>50,00</p> <p>50,00</p> <p>58,33</p>
BC12	HSLRTDIYLIKK	<p>FGLRTDIYSKKT</p> <p>FGLRTDIYSKKT</p> <p>LLLRLNDIALIKL</p> <p>QPLQTDIYGLAK</p>	<p>-SWI/SNF</p> <p>-SMARCC1 protein</p> <p>-chymotrypsin C (caldecrin), isoform CRA_a</p> <p>-LAG1 longevity assurance homolog 3</p>	<p> EAW64831.1 </p> <p> AAH39843.1 </p> <p> EAW51725.1 </p> <p> NP_849164.2 </p>	<p>58,33</p> <p>58,33</p> <p>58,33</p> <p>50,00</p>
BC13	HSLKHNILLRS	<p>HSLKHNKRVLFS</p> <p>HSLKHNKRVLFS</p> <p>RSLKQNIFLFYV</p> <p>LSLVHAILLLRL</p>	<p>-oxygen regulated protein precursor variant</p> <p>-HYOU1 protein</p> <p>-KIAA0802 protein</p> <p>-seven transmembrane helix receptor</p>	<p> BAD96476.1 </p> <p> AAH72436.1 </p> <p> AAH40542.2 </p> <p> BAC05914.1 </p>	<p>66,67</p> <p>50,00</p> <p>66,77</p> <p>66,77</p>

BC14	HSLKHNNPLLRS	ASLKENSPLLHS	-catenin (cadherin-associated protein), alpha 3, isoform CRA_a	EAW54249.1	66,67
		HSLKHNRVLFS	-oxygen regulated protein precursor variant	BAD96476.1	66,67
		ISLKHNRRALAQ	-shugoshin-like 2	NP_689737.3	58,33
		PLHSVNNPILRK	-mitogen activated protein kinase activated protein kinase	AAC39863.1	41,67
BC15	WAAPSLMQAMPM	SPLPSLMVVMPL	-breast carcinoma amplified sequence 3, isoform	EAW51413.1	50,00
		QAVPSLLSAPPK	-Tripartite motif-containing protein 66	O15016	50,00
		WAAPSLPSGVRE	-Melanoma associated antigen (mutated)	AAI10875.1	50,00
		GQSPSMMVGMPM	-stromal membrane-associated protein 1, isoform CRA_c	EAW48807.1	50,00
BC16	ESGPPSPNVNHQ	PPGPPSPSVTTE	- zinc finger protein 276, isoform CRA_g	EAW66693.1	50,00
		ESGPPAPSKPRR	- SCC-112 protein	AAH09650.1	50,00
		LSTPPSSNVNSI	- TIPARP protein	AAH34397.1	58,33
		QSGPPSGDVNSL	- A-kinase anchor protein 13 isoform 2	NP_009131.2	58,33
C17	DFNMQPGCLLLI	VFNMQSPSTSS	- DOCK4 protein	AAI17690.1	41,67
		DFEMSKHPGLLL	- SWI/SNF chromatin remodeling complex subunit OSA1	AF521670_1	41,67
		NFHLQPDGCLLV	- cadherin-like 23, isoform CRA_a	EAW54426.1	41,67
		RYLQQPGCLLVG	- hypothetical protein LOC283871	NP_001035830.1	50,00

BC18	KVWMLNAAPVIR	YVWMLDAEDLAD KVWMLTGDKLET KVWVGPIFPVIR VYWLLDGAPVQD	- 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	HSLKHNNLLRS	HSLKHNRVLFS HSLKHNRVLFS RDLKPNLLLLDE PSLKHNDLLSWF	- 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	AKENQDIRLLQA PTLKQDILEEIK HESKIPILLIQQ, HANLKQIRLIEK GTLKQNIPLRLKL	- 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	HWYNVRYRGNAF KWYNVHSAPGGP HWYDVEGGMQDY HWYRALLLETFR, DWYDVRMLLPQF	- 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	EEGASDYVLWKE	- similar to G protein-coupled receptor 108 isoform	XP_946818.1	41,67
		NSILLDYVLWDY	- C9orf64 protein	AAH04407.1	50,00
		TLLNYDYVWDTV	- amine oxidase, copper containing 3 (vascular adhesion protein 1)	EAW60897.1	41,67
		NLHFPDYVLDEV	- kelch-like 15	NP_085127.1	58,33
BC23	KVWVLPI	CKWVLPI	- PRAME family member 5	AAI01343.1	71,43
		AVWVLPL	- EI24_HUMAN Etoposide-induced protein 2.4 (p53-induced protein 8)	O14681	71,43
		KVWVLTG	- KIAA1021 protein	BAA82973.2	71,43
		KVWVLTG	- ATPase, Class VI, type 11A isoform a	NP_056020.1	71,43
BC24	TSWPLSR	TAWPLSL	- glycophorin C isoform 1	NP_002092.1	71,43
		TSWPLLG	- cytochrome P450, family 2 4 precursor	NP_000773.2	71,43
		TSWPLGS	- PCLO_HUMAN Protein piccolo (Aczonin)	Q9Y6V0	71,43
		LHWPLSR	- histone deacetylase 7A isoform a	NP_056216.1	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.

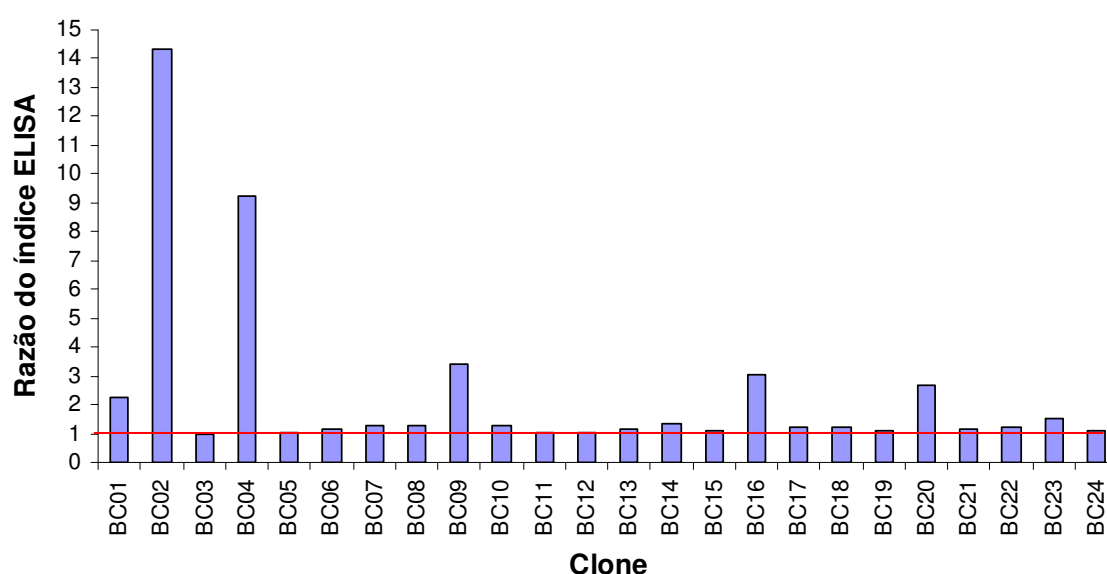


Figura 3: Gráfico representativo das leituras a 492nm do ensaio ELISA mostrando a reatividade dos clones de fagos capturados por anticorpo anti-M13 contra proteína total de mulheres com câncer de mama.

6.0-Blotting

Dos clones seqüenciados 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).

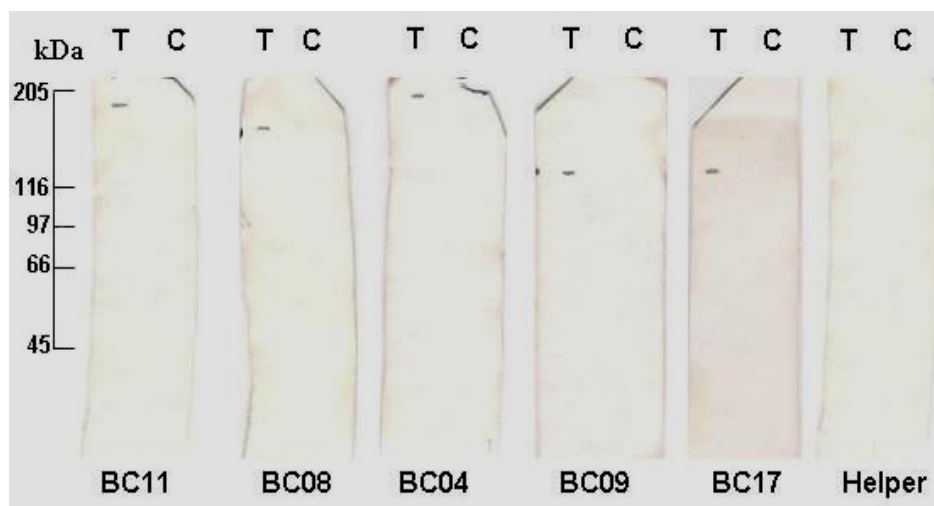


Figura 4: Análise por *western blotting* da expressão dos ligantes em “pools” de proteínas de tecido de pacientes com tumor (T) e de indivíduos saudáveis controles (C). Os fagos ligantes BC11, BC08, BC04, BC09, BC17 e o Helper (controle da reação) foram detectados com anti-M13 conjugada com peroxidase.

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).

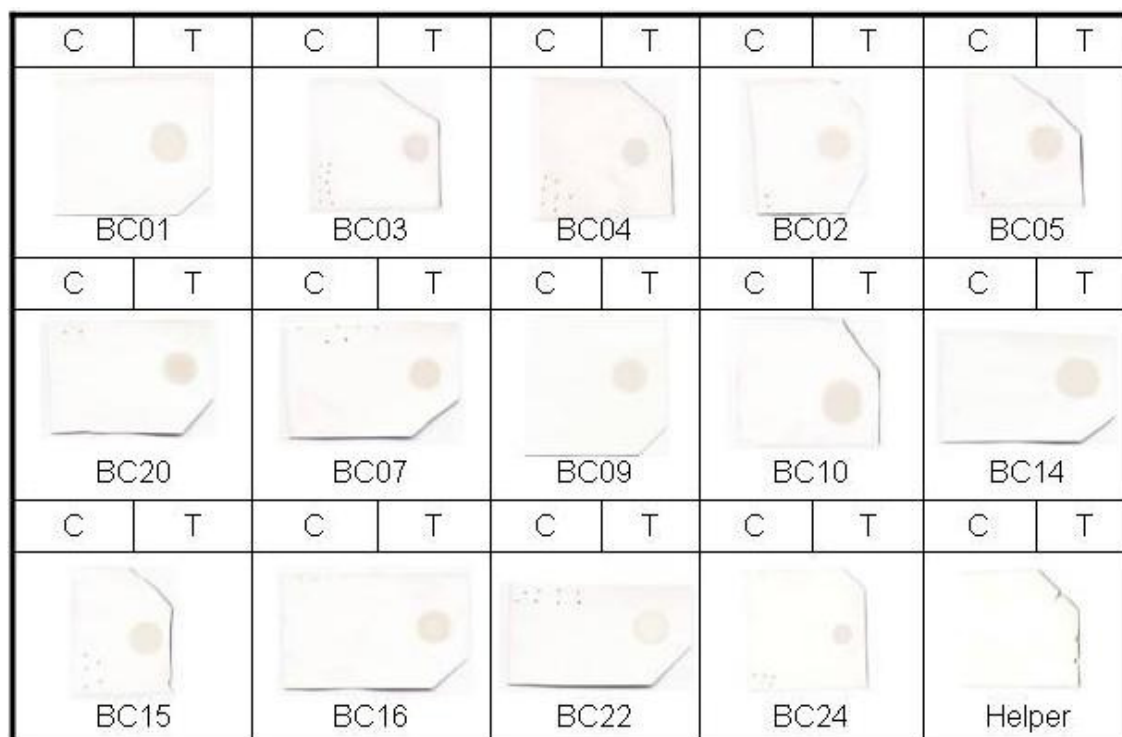


Figura 5: Análise da expressão dos ligantes em “pools” de proteínas de tecido de pacientes com tumor (T) e de indivíduos saudáveis controles (C). Os fagos ligantes BC01, BC03, BC04, BC02, BC05, BC20, BC07, BC09, BC10, BC14, BC15, BC16, BC22, BC24 e o Helper (controle da reação) foram detectados com anti-M13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

7.0-Imunohistoquímica

Ensaio 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 e 6G).

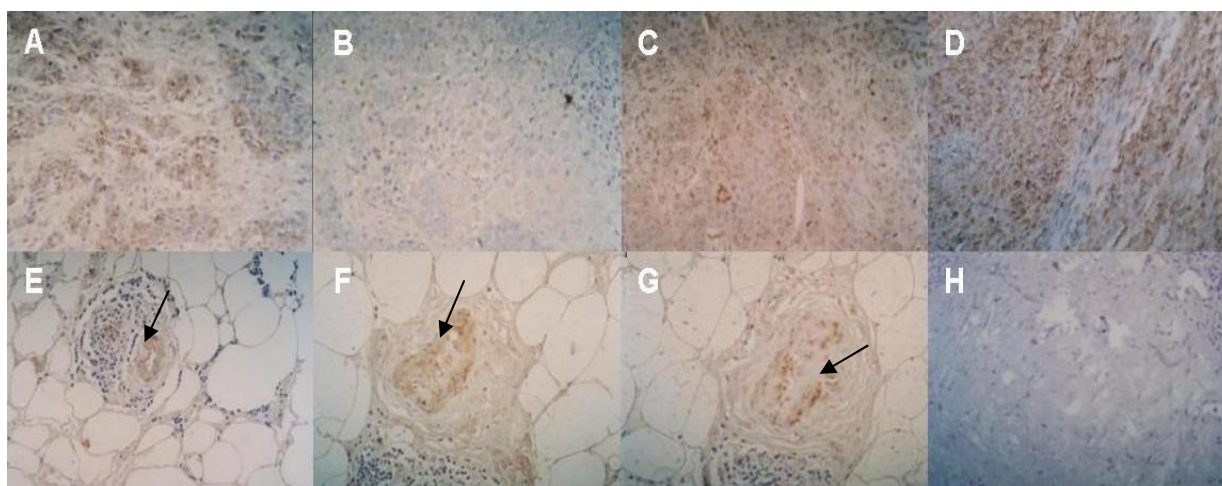


Figura 6: Imunohistoquímica realizada em tecido com carcinoma ductal infiltrante de mama utilizando a marcação indireta de fagos recombinantes revelados com anti-M13 conjugado com peroxidase. **A:** clone BC11; **B:** clone BC17; **C:** BC12; **D:** mistura dos fagos (BC11, BC17 e BC12) **E:**BC05; **F:**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

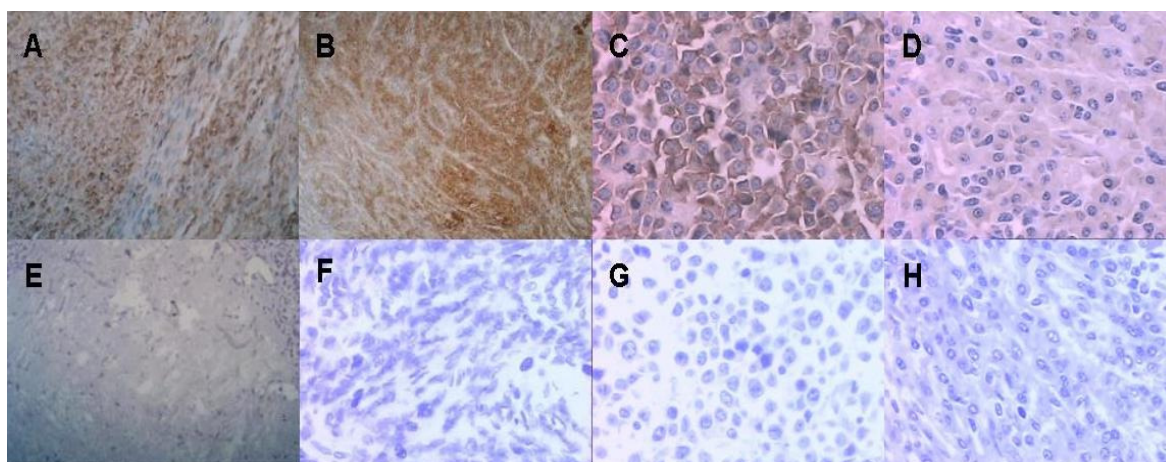


Figura 7: Imunohistoquímica realizada com a mistura de fagos (BC11, BC12, BC17) em diferentes tipos de cânceres, utilizando a marcação indireta de fagos recombinantes revelados com anti-M13 conjugado com peroxidase. A: Câncer de mama; B: Câncer de ovário; C: linfoma não- Hodgkin; D: melanoma; Controles 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 7aminoácidos 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 contato 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 *biopanning* 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 frequente KVV. 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 seqüências 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 for maior 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 $\geq 40\%$ 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-78* (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 carregamento 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 diversidade molecular 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 o 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 estágio 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. Rev Bras Cancer 48: 113-131, 2002
2. Smith RA, Saslow D, Sawyer KA, et al: American Cancer Society guidelines for breast 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 Brasi Cancer 47: 377-388, 2001
6. Soderlind E, Strandberg L, Jirholt P: Recombining germLinederived CDR sequences for creating diverse single-framework antibody libraries. *Nat Biotechnol* 18: 852–856, 2000
7. Borysowski J, Gorski, A: Phage-display technology and its application to experimental. *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-embedded tissues: an enhancement method for immunostochastic 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 sequence diversity in M13 combinatorial peptide Phage Display Libraries. *J Mol Biol* 322: 1039-1052, 2002

11-Hou TS, Dove M, Anderson JZ et al: Identification of polypeptides with selective affinity to intact mouse cerebellar 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-erbB2 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 proteome of 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. *Proc 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

CAPÍTULO III

SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS LIGANTES A PROTEÍNAS DO SORO DE MULHERES COM CÂNCER DE MAMA POR *PHAGE DISPLAY*

RESUMO

No Brasil, o câncer de mama é a patologia maligna mais frequente na população feminina e tem o seu quadro agravado pelo fato do diagnóstico ser estabelecido, na maioria das vezes, em fase tardia da doença. Nesse trabalho foi utilizada a técnica de *Phage Display* para isolar peptídeos ligantes às proteínas do soro de mulheres com câncer de mama para obtenção de biomarcadores que possam ser utilizados no diagnóstico sorológico dessa patologia. Para seleção dos peptídeos foi realizado um *biopanning* subtrativo utilizando uma biblioteca de peptídeos *Ph.D.-12* expressa na superfície do fago filamentoso M13. A biblioteca de fagos foi colocada, primeiramente, em contato com soro de mulheres clinicamente saudáveis, depois em contato com soro de mulheres com doenças benignas de mama, e por último, em contato com soro de mulheres com câncer de mama, para que os fagos ligantes a proteínas do soro de mulheres sem a patologia ou com doença benigna fossem eliminados. O DNA dos fagos selecionados foi seqüenciado e as seqüências analisadas por bioinformática. As técnicas ELISA e *dot-blotting* foram utilizadas para confirmar o sucesso da seleção. Todos os clones analisados apresentaram Razão do Índice ELISA maior do que um e alto grau de informação. A seqüência IETVESTHQSP foi a mais frequente e apresentou alta reatividade nas análises de *dot-blotting* com IgGs do soro de pacientes com câncer de mama. Os clones T03, T18 e T09 apresentaram similaridade com a Ubiquitina e os clones T06, T19, T04, T10, T11, T14, T17 com motivos Zinc Finger. O fato de diferentes clones apresentarem similaridade para um mesmo tipo de proteína sugere que diferentes motivos de uma mesma proteína podem ser epítomos reconhecidos por autoanticorpos ou que esses motivos estejam interagindo com proteínas associadas ao câncer de mama, visto que o *biopanning* foi feito com soro total.

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

ABSTRACT

Breast cancer is the most frequent malignant pathology in the Brazilian women population, which is aggravated by diagnosis in later stages of the disease. The aim of this investigation was to select and identify ligand peptides to serum proteins of women with breast cancer through phage display in order to use them as serological biomarkers. Selection of phages was performed in three steps using a random peptide library of 12 residues (*Ph.D.-12*). The first two selection steps consisted of a pre clearing using the phage libraries against sera proteins of healthy individuals, followed by a second selection against sera proteins of patients with benign breast diseases. After subtraction, the library was submitted to a positive selection against sera of patients with breast cancer. Phage ligands were selected, amplified, and the DNA was sequenced and translated. Peptide sequences were submitted to bioinformatic analyses and to ELISA and *dot-blotting* assays to confirm selection success. All clones presented significant ELISA indexes and a high information content. The sequence IETVESTHQSP was the most frequent and presented a high reactivity against IgG from breast cancer patients' in the *dot-blotting* analysis. Clones T03, T18 and T09 presented similarity with the ubiquitin and clones T06, T19, T04, T10, T11, T14, T17 with zinc finger motifs. The fact of different clones to present similarity for the same type of protein suggests that different motifs of one same protein can be epitopes recognized by auto-antibodies or that these motifs are interacting with proteins associated to breast cancer, since biopanning was made with total serum.

Keywords: Breast cancer, Phage Display

INTRODUÇÃO

Vários fatores impedem o diagnóstico precoce do câncer de mama. Entre eles pode-se citar: a baixa aderência aos programas, a baixa resolução da mamografia, a falta de acesso aos postos de saúde. Por tratar-se de doença com alto poder de metastização, um número significativo de pacientes morre antes dos cinco anos, após o tratamento primário. Sua história natural e prognóstico variam e tumores muito pequenos (milimétricos) podem apresentar alto potencial metastático (1).

Terapias tradicionais no tratamento do câncer consistem de drogas quimioterápicas que podem com sucesso erradicar o tumor mas, também, são tóxicas às células sadias (2).

O conhecimento a respeito da estrutura, perfil de expressão e imunogenicidade de antígenos específicos do câncer são importantes para o desenvolvimento de novos diagnósticos e terapias (3).

Embora existam muitas evidências de anticorpos naturais contra cânceres (4), antígenos tumorais são, geralmente, imunogenicamente fracos por causa da tolerância sistêmica e a resposta imune contra antígenos tumorais falha em alcançar altos títulos de anticorpos (5).

As respostas imunes dos linfócitos B e T contra proteínas derivadas de tumor foram identificadas em muitos pacientes com câncer, porém tais respostas, na grande maioria, são insuficientes para curá-lo. Um desafio no tratamento do câncer é aumentar a resposta imune anti-tumor, o que talvez seja possível através da descoberta de novos antígenos tumorais com potencial imunogênico mais elevado (6).

A descoberta da resposta imune humoral contra antígenos associados a tumores que são reconhecidos como “estranhos” pelo sistema imune pode fornecer ambos, diagnóstico e informação de prognóstico (7).

A tecnologia de *Phage Display* tem sido utilizada na pesquisa e tem contribuição significativa na caracterização das interações antígeno-anticorpo. Tem se mostrado eficiente para mapeamento de epítomos (8) e identificação de peptídeos miméticos que funcionam como imunogênicos miméticos de epítomos

dos antígenos (9), podendo ser usados como vacina, para diagnóstico e/ou prognóstico da doença (10).

Esse trabalho teve como objetivo selecionar peptídeos ligantes específicos a proteínas do soro de mulheres com câncer de mama, que possam ser usados, no futuro como biomarcadores moleculares dessa patologia.

MATERIAL E MÉTODOS

1.0-Material biológico

O estudo foi realizado com mulheres que recorreram ao Serviço de Mastologia da Maternidade Odete Valadares em Belo Horizonte, Minas Gerais, no período de janeiro de 2005 a julho de 2006 e ao Serviço de Mastologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.

As mulheres que recorreram ao hospital para realização de exames de rotina, cirurgia de mama ou ginecológica e que realizaram mamografia foram solicitadas a participar do estudo como voluntárias. As mulheres com diagnóstico de câncer de mama, idade entre 32 e 73 anos, compuseram o grupo "casos" – CAN (Tabela 1). As neoplasias malignas da mama foram classificadas de acordo com a sexta edição do Sistema TNM (Classificação de tumores malignos), da American Joint Committee on Câncer. As mulheres com idade entre 20 e 62 anos que, após a cirurgia, não apresentaram diagnóstico de câncer de mama mas sim fibroadenoma, hiperplasia ductal atípica, papiloma, cisto mamário, necrose adiposa, ectasia ductal, mastite, fibrose estromal e adenose esclerosante constituíram o grupo de "doença benigna da mama" – DBM. As mulheres com idade entre 31 e 55 anos que recorreram ao hospital para a realização de exames de rotina e para a realização de cirurgias ginecológicas e que posteriormente tiveram mamografia normal com Cat I e Cat II, classificação segundo BIRADS, fizeram parte do grupo "controle" – COM.

Foram utilizadas amostras de soro de 50 pacientes diagnosticadas com carcinoma ductal invasivo graus I, II e III soro de 50 pacientes diagnosticadas como saudáveis e soro de 50 pacientes diagnosticadas como tendo doença benigna de mama.

As pacientes assinaram Termo de Consentimento e o projeto foi aprovado pela Comissão de Ética da Universidade Federal de Uberlândia (Processo nº 0013/2000).

TABELA 1- Parâmetros clínicos e laboratoriais das pacientes que doaram sangue para realização do *biopanning*. Os laudos anátomo-patológicos foram realizados na Maternidade Odete Valadares e no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Resultado Anatomo-patológico	Receptor de Estrógeno	Grau Histopatológico	Estadio	TNM
Carcinoma Ductal Invasivo (50)	+ (32)	1 (18)	I (4)	pT2pN1aMO (2) pT2pN2aMO (2)
			IIA (8)	pT1cpNOMO (3) pT2pN1aMO (3) pT2pNxMO (2)
				IIIA (2)
				pT2pN2aMO (2)
			IIB (4)	PTpN1aMO (4)
		2 (9)	I (3)	pT2pNOMO (3)
			IIA (3)	pT2pNOMO (3)
			IIIA (3)	pT1cpNOMO (3)
		3 (5)	IIIA (5)	pT2pNxMO (5)
	- (18)	1 (8)	I (4)	pT1cpN1MO (4)
			IIA (4)	pT2pNOMO (4)
		2 (8)	IIB (6)	pT2pN1aMO (2) pT1cpNOMO (2) pT1cpN1MO (2)
				IIIC (2)
				pT2pNOMO (2)
		3 (2)	IIA (2)	pT2pNOMO (2)

Os números apresentados dentro dos parênteses representam o número de pacientes que estão incluídas dentro de cada classificação.

2.0-Biopanning

Para selecionar fagos ligantes a proteínas do soro de pacientes com câncer de mama, foi utilizada uma biblioteca comercial de peptídeos randômicos apresentados em fago M-13, *Ph.D.-12* (complexidade: $2,7 \times 10^9$ transformantes), fusionados a proteína pIII (5 cópias por partícula de fago) da New England BioLabs, Schwalbach, Alemanha.

Para a seleção de peptídeos ligantes foi utilizada uma placa de microtitulação (NUNC maxisorp[®] Nalge Nunc International Co., Rochester, NY, USA), na qual três poços foram sensibilizados com 20 µl de soro de mulheres saudáveis, três poços sensibilizados com 20 µl de soro de mulheres com doença benigna de mama e um poço, com soro de mulheres com carcinoma ductal infiltrante.

A placa foi agitada em câmara úmida overnight a 4° C e o excesso de proteínas, que não se ligaram, foi descartado. Ao final da sensibilização, a placa foi bloqueada com Tampão (0,1M NaHCO₃ pH 8,6; 5mg/mL BSA e NaN₃ 0,02%) por 1 hora a 4° C. Após o bloqueio a placa foi lavada por seis vezes em TBS contendo 0.1% de TWEEN 20 (TBST). As proteínas do soro de mulheres saudáveis, presentes no 1° poço foram incubadas com 2×10^{10} partículas de fagos da biblioteca e incubado por uma hora à temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e adicionado ao 2° poço que, também, continha proteínas do soro de mulheres saudáveis e, novamente, incubado por 1 hora. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e adicionado ao poço contendo soro de mulheres com doenças benignas da mama, sendo incubado por 1 h à temperatura ambiente. Este passo foi repetido mais uma vez. Os fagos não ligantes foram removidos lavando 10 vezes com TBS-Tween 0,1% no primeiro *round* e 0,5% nos seguintes e eluídos com 50 mM de Tampão Glicina pH 2,0. Os fagos recuperados foram amplificados em *Escherichia coli* ER2738. A seleção foi repetida mais duas vezes utilizando-se o eluato anterior ao *round* em questão, como representante da biblioteca de fagos.

3.0-Titulação

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* ($OD_{600} \sim 0,5$). 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 45°C e espalhadas sobre uma 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 37°C, durante 16 horas. Após, foram contadas as colônias das placas que apresentavam aproximadamente 100 colônias. O título dos fagos foi obtido pela multiplicação do número de colônias pelo fator de diluição empregado.

4.0- Amplificação dos fagos

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

Com palitos de dente esterilizados, 96 colônias azuis (bactérias infectadas com fagos) foram retiradas da placa de *Petri* (3º ciclo não-amplificado) e cada colônia foi transferida para 1 poço da placa *Deepwell* contendo cultura diluída. A placa foi vedada com adesivo próprio e incubada, por 5 horas sob agitação, a 37°C. Para estoque, foram retirados 100µl de cada poço e transferidos para uma placa de microtitulação *Corning Incorporated Costar*® 3591 e adicionados 100µl de glicerol 50%. Após incubação, a placa foi centrifugada por 20 minutos a 3700 rpm, transferindo o sobrenadante para uma outra *Deepwell* estéril. Foi adicionado 1/6 do volume em PEG/NaCl e incubado por mais 14 horas a 4°C. A placa foi, então, centrifugada por 1 hora a 3700 rpm e todo o sobrenadante dispensado, secando a placa sobre papel-toalha (trocado várias vezes para evitar

contaminação cruzada) e o precipitado foi resuspendido em 200µl de PBS 1X (Tampão Fosfato Salina).

5.0-Extração de DNA do fago

Para a extração do DNA dos fagos, colônias isoladas de uma placa oriunda do 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* (OD₆₀₀ ~ 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 37°C, por 24 horas, sob agitação (250 rpm). Para isolar os fagos das bactérias, a placa foi centrifugada a 3700 rpm, a 20°C, 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, a 20°C, 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 EDTA e 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, 20°C, 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.

6.0-Sequenciamento do DNA e dedução de aminoácidos

Na reação de seqüenciamento, foram utilizados 500ng de DNA molde, 5pmol do *primer* -96 gIII (5'-OH CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3' - Biolabs) e Premix (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit. – Amersham Biosciences). A reação de 35 ciclos foi realizada em Termociclador de placas (MasterCycler - Eppendorf) nas seguintes condições: desnaturação (a 95°C por 20 segundos); anelamento do *primer* (a 58°C por 15 segundos) e extensão (a 60°C por 1 minuto). O DNA seqüenciado foi precipitado com 1mL de acetato de amônio 7,5M

e etanol, homogeneizando a placa com leve agitação. Foram acrescentados 27,5 μ L de etanol absoluto e a placa foi centrifugada por 45 minutos, a 4000 rpm e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 150 μ L 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 ressuspensos no tampão de diluição (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit. – Amersham Biosciences).

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

7.0-ELISA

Uma placa de alta afinidade (Costar-Corning 3590, NY, USA) foi sensibilizada com 20 μ L de soro de mulheres com câncer de mama, uma placa sensibilizada com soro de mulheres que apresentam doença benigna de mama e outra com soro de mulheres clinicamente sadias, diluídos 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). A seguir as placas foram lavadas por 3 X com PBST e incubadas por 1 hora a 37°C com 1×10^{11} fagos selecionados por poço. 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. Após 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 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 obtida em Leitor de Placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, USA) a 492 nm.

Foi calculado o valor *cut off* para cada amostra (*cut-off*= média Helper + 3X desvio padrão). O índice ELISA foi calculado considerando-se OD/ *cut-off*. Em

seguida, foi calculada a razão do índice ELISA tumor/controle. Valores acima de 1 foram considerados positivos.

8.0- Bioinformática

A tradução da sequência de aminoácidos obtidas 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™ or Ph.D.-7™) 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 os programas *Blast* (www.ncbi.nlm.nih.gov) e *immunepitope* (www.immunepitope.org) e o cálculo da frequência 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>).

9-0-Dot Immunoblotting com IgG

Para a identificação dos clones imunorreativos foi utilizado o método de *Dot Immunoblotting*, no qual 2µL dos clones a 10^{11} pfu (unidade formadora de colônias), foram plotados em membranas de Nitrocelulose (uma membrana para cada grupo de estudo) (Hybond ECL – GE Healthcare) com poros de 0,22 µm. Após a plotagem dos clones, foi adicionada a solução de bloqueio TBSTM (TBST, 0,05% de Tween 20 com 5% de leite desnatado) por 1 hora, à temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes com TBST e incubadas com os respectivos soros (de mulheres saudáveis, com doença benigna e com câncer de mama) diluídos em TBSTM por 1 hora, à temperatura ambiente e lavadas três vezes. A detecção da ligação dos anticorpos

aos peptídeos imobilizados em nitrocelulose pôde ser verificada pela subsequente incubação das membranas com o anticorpo anti-IgG complexado com a enzima fosfatase alcalina e revelação com o substrato NBT/BCIP. Como controle negativo utilizou-se o fago Helper, que não apresenta nenhum peptídeo conjugado.

RESULTADOS

1.0-Biopanning

Nesse trabalho foi realizado o *biopanning* subtrativo para selecionar fagos ligantes em soro de paciente com câncer de mama. Em cada ciclo de seleção o eluato e o amplificado foram titulados (Tabela 2).

TABELA 2: Títulos (em *pfu*: unidade formadora de colônias) obtido nos três ciclos de seleção

Ciclos de seleção	Número de partículas de fagos	
	Entrada	Saída
1º	$1,5 \times 10^{11}$	$6,9 \times 10^3$
2º	$1,13 \times 10^{11}$	$7,5 \times 10^2$
3º	$4,4 \times 10^{11}$	$3,1 \times 10^3$

2.0-Extração de DNA do fago

Após três ciclos de seleção, os clones foram tomados aleatoriamente para análise das interações fago-proteína, extração de DNA (Figura 1) e identificação dos peptídeos expressos na superfície do fago, por sequenciamento.

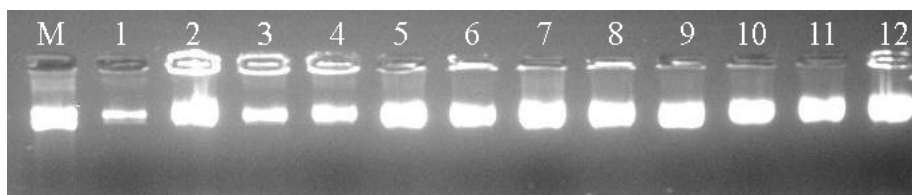


Figura 1: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, contendo amostras da extração de DNA do fago M13. **M**: DNA de fago M13 padrão contendo 400ng de DNA (Pharmacia). **1-12**: Amostras aleatórias do DNA de fago M13 selecionados no *Biopanning*.

3.0-Análise dos dados por bioinformática

A tabela 3 apresenta parâmetros importantes para indicação do sucesso de seleção de cada peptídeo, conforme (11). São eles: seqüências de aminoácidos obtidas, freqüência dos peptídeos selecionados, freqüência esperada desses peptídeos na biblioteca original, amplificação dos peptídeos decorrentes do processo de seleção em relação à freqüência esperada dos peptídeos da biblioteca original, o grau de informação de cada peptídeo e o número provável de clones independentes dentro da biblioteca.

Tabela 3: Seqüência de aminoácidos, respectivos clones, freqüência observada, freqüência esperada, amplificação dos peptídeos e grau de informação.

Clone	Peptídeo	Frequência Observada (FO) %	Probabilidade da Frequência Randômica* (FE)	Amplificação (FO/FE)	I(m)**	λ ***
T01	SSWRRRTGSPLSA	3,33	$6,8 \times 10^{-16}$	$4,8 \times 10^{15}$	34,9	0,0000013
T02	ANLYNMKRVVWN	3,33	$4,0 \times 10^{-13}$	$7,9 \times 10^{11}$	26,2	0,0083
T03	YLGTPNSLPVL	3,33	$5,0 \times 10^{-15}$	$6,6 \times 10^{16}$	32,9	0,0000099
T04	HWEQRPQWPYQN	3,33	$3,4 \times 10^{-14}$	$9,6 \times 10^{13}$	31	0,00006
T05	FMKPNLVRNEAV	3,33	$3,0 \times 10^{-13}$	$1,0 \times 10^{13}$	28,8	0,0006
T06	WHWNSYLYSIDQ	3,33	$1,3 \times 10^{-16}$	$2,4 \times 10^{14}$	31,9	0,000002
T07	QNKLWDTPSNPW	6,66	$8,3 \times 10^{-14}$	$3,9 \times 10^6$	30,1	0,00016
T08	ATHHPSMTHGRD	3,33	$4,1 \times 10^{-14}$	$7,9 \times 10^{13}$	30,8	0,00008
T09	HSTALYQPLLRS	3,33	$4,9 \times 10^{-16}$	$6,7 \times 10^{15}$	35,2	0,0000009
T10	EALLSSSPLCCH	3,33	$8,7 \times 10^{-14}$	$3,8 \times 10^{13}$	30,1	0,0001
T11	SNPSMRNLLAPL	3,33	$3,7 \times 10^{-17}$	$8,8 \times 10^{16}$	37,8	0,00000007
T12	QNFSMSQSLRSL	3,33	$1,8 \times 10^{-13}$	$1,7 \times 10^{13}$	29,3	0,0003
T13	SLYEISTYSFNH	3,33	$1,4 \times 10^{-14}$	$2,2 \times 10^{12}$	31,8	0,00002
T14	IETYESTHQSP	23,33	$4,5 \times 10^{-19}$	$5,1 \times 10^{19}$	42,2	0,00000000009
T15	SATMYNSHQLPT	3,33	$9,4 \times 10^{-17}$	$2,4 \times 10^{17}$	36,9	0,0000001
T16	TQWPLNSLSNLP	3,33	$3,4 \times 10^{-19}$	$9,7 \times 10^{18}$	42,5	0,0000000006
T17	LVPWPSNQNTTV	3,33	$1,1 \times 10^{-17}$	$2,7 \times 10^{10}$	39	0,00000002
T18	LVPCPSNQNTTV	3,33	$1,6 \times 10^{-18}$	$2,0 \times 10^{18}$	41	0,000000003
T19	SYSNPVRAHHLV	3,33	$2,3 \times 10^{-12}$	$1,4 \times 10^{12}$	26,8	0,004
T20	HLHNITARSPAH	3,33	$1,8 \times 10^{-16}$	$1,7 \times 10^{16}$	32,6	0,000003
T21	HNTFLLSSLTWT	3,33	$4,4 \times 10^{-16}$	$7,4 \times 10^{15}$	35,4	0,000000008
T22	SYASEDNNAWRT	3,33	$1,8 \times 10^{-13}$	$1,8 \times 10^{13}$	29,3	0,00036
T23	SYASDDNNAWRT	3,33	$1,4 \times 10^{-13}$	$2,2 \times 10^{13}$	29,6	0,0002
T24	SHWWSSLYSFGY	3,33	$8,4 \times 10^{-13}$	$3,9 \times 10^{12}$	27,8	0,001

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

Após a tradução das seqüências de DNA pelo programa DNA2PRO12, o cálculo da freqüência de cada aminoácido nos peptídeos seqüenciados foi realizado pelo programa AAFREQ. Os aminoácidos mais freqüentes foram:

Serina, Leucina, Prolina e Asparagina (Tabela 4), sugerindo que esses aminoácidos estão envolvidos na maioria das interações peptídeo-proteína.

TABELA 4-Frequência dos aminoácidos dos clones seqüenciados. Em azul estão representados os aminoácidos mais freqüentes.

Aa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Total	Frequência
A (Alanina)	2	2	1	1	0	0	1	1	2	2	2	1	15	0,0521
C (Cisteína)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	3	0,0104
D (Aspartato)	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	1	1	5	0,0174
E (Glutamato)	1	1	1	1	2	0	0	0	0	1	0	1	8	0,0278
F (Fenilalanina)	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	4	0,0139
G (Glicina)	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	3	0,0104
H (Histidina)	5	1	2	2	0	0	0	2	2	1	0	3	18	0,0625
I (isoleucina)	1	0	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0	4	0,0139
K (Lisina)	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	3	0,0104
L (Leucina)	2	4	2	2	3	2	1	4	6	3	2	3	34	0,1181
M (Metionina)	0	1	0	1	2	1	1	0	0	0	0	0	6	0,0208
N (Asparagina)	0	5	0	3	3	2	4	1	3	2	2	2	27	0,0938
P (Prolina)	0	1	3	3	5	2	0	3	3	2	4	2	28	0,0972
Q (Glutamina)	2	1	0	1	0	0	3	2	2	0	1	1	13	0,0451
R (Arginina)	0	0	0	1	3	1	2	4	0	1	3	0	15	0,0521
S (Serina)	6	2	2	3	2	7	5	3	5	2	2	1	40	0,1389
T (Treonina)	1	1	4	1	0	3	3	1	0	3	2	4	23	0,0799
V (Valina)	0	2	0	0	0	2	1	0	1	1	1	4	12	0,0417
W (Tryptofano)	1	1	4	1	1	0	0	1	0	1	2	1	13	0,0451
Y (Tirosina)	2	2	1	2	1	2	0	2	0	1	1	0	14	0,0486
Consenso	S	N	T	N/P/S	P	S	S	L/R	L	L/T	P	T/V	288	

O programa CLUSTAL W (18.1) foi utilizado para identificação de seqüências consenso entre os peptídeos selecionados. Como pode ser observado na Figura 2 não foi encontrado nenhum motivo dominante.

Os prováveis alvos biológicos que apresentaram identidade com os peptídeos selecionados foram determinados pelo programa BLAST, utilizando a procura por similaridade pelo sistema “short nearly peptides” e estão relacionados na Tabela 5.

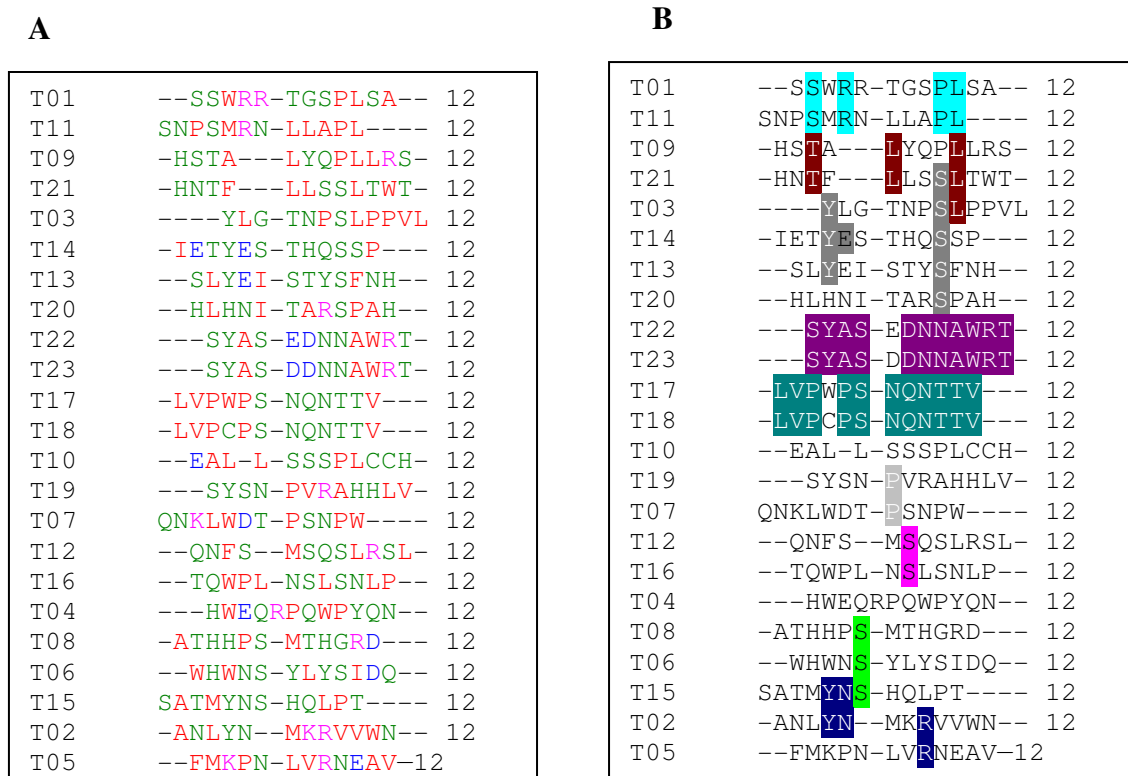


Figura 2: Alinhamento dos peptídeos selecionados por Clustal W. **A:** vermelho: aminoácidos hidrofóbicos, incluindo aromáticos; azul: ácidos; rosa: básicos; verde: Hidroxila + Amina + Básico. **B:** Motivos em comum entre os clones selecionados.

Tabela 5- Análise da similaridade dos peptídeos selecionados com proteínas humanas.

CLONE	PEPTÍDEO	MOTIVOS PROVÁVEIS	PROVÁVEIS PROTEÍNAS	NÚMERO DE ACESSO	IDENTIDADE %
T10	EALLSSSPLCCH	AALLTSQPHSPL EALLPSSPTLGA NLALLSSLGCCH	-pregnancy-associated plasma protein-E -BRF1 protein - zinc finger protein 547	CAC11134.1 AAH86856.1 EAW72498.1	41,67 58,33 50,00
T13	SLYEISTYSFNH	SGFAFSTYSFNW GLYPGTYSFTI HLKGDPHYSFNH	-circulating B cell antibody heavy chain variable region - Receptor-type tyrosine-protein phosphatase - forkhead box A1	ABF83280.1 P28827 NP_004487.2	58,33 50,00 50,00
T01	SSWRRTGSPLSA	GSGRPTGSPLSA SSWRRSRSPYSP EALRRTGSPLAA	- tumor endothelial marker 6 -Cell division cycle 2-like protein kinase 5 - melanoma differentiation associated protein-5	AAL11993.1 Q14004 AAG34368.1	75,00 66,67 66,67
T02	ANLYNMKRVVWN	EDERFEGRVVWN ETAPAVQRVVWN ETAPAVQRVVWN	- SCN1B protein - protein kinase C binding protein 1 - CTCL tumor antigen se14-3	AAH21266.2 CAI21840.1 AAG34905.1	41,67 41,67 41,67

T11	SNPSMRNLLAPL	SNSTRSLLSPL	- similar to zinc finger protein 75	EAW68287.1	50,00
		PNLRNFNMMAPL	- coiled-coil domain containing 34	NP_015628.2	50,00
		CGKSLRNLLSPK	-ankyrin-like protein 1	XP_001130086.1	41,67
T08	ATHHPSMTHGRD	DTHHPGLSHSYM,	-GATA-3	CAA38877.1	41,67
		STHHPITTPPY	-jumonji domain-containing 1 C splice variant	ABK64187.1	41,67
		GTHHPALT PAPH	- forkhead box	NP_005240.3	41,67
T15	SATMYNSHQLPT	HVPHPSMTSQSS			
		LRKRYNSHQMGQ,	- F-box protein	NP_995308.1	41,67
		SHQMGQSKQFPL	- Tachykinin receptor 1, 2 e 3	AAH96842.1	41,67
T17	LVPWPSNQNTTV	SSTMYNPIIYCC	- neuromedin U receptor 2	NP_064552.2	33,33
		QSSMHNSHLPTA,			
		SRTNYQSFHFNK			
T17	LVPWPSNQNTTV	LLPWPQHQNANG	- cadherin-4	AAA35627.1	50,00
		QTQWPSNQDYDS	- zinc fingers and homeoboxes 3	NP_055850.1	41,67
		CGPWPSHQLLTN	- THO complex 5	NP_003669.4	50,00
T06	WHWNSYLYSIDQ	KVWNSYLQKSGE	-coiled-coil containing 121	NP_078860.2	41,67
		PVWKSYLYQLQQ	-chimerin	NP_001813.1	50,00
		AEKNSYLYSTEI	-Zinc Finger protein 783	NP_001004302.1	50,00

T22	SYASEDNNAWRT	DYDSEDDNDWRP TGKDNLLNAWRT IYSSSEDKNAQRH	- PHD finger protein 14 - transducin-like enhancer protein - hGCMa	O94880 AAA61193.1 BAA13651.1	58,33 41,67 58,33
T16	TQWPLNSLSNLPT	TPRPLISLSASS DPWPLNPLSIQQ DPWPLNPLSIQQ	-seven transmembrane helix receptor - AF171066_1 CYP1B1 - cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	BAC05810.1 AAG43404.1 NP_000095.1	50,00 50,00 50,00
T19	SYSNPVRAHHLV	SYSNPVEYELLW GFSPSPVAHHLV ALKNHVRAHHRP	- melanoma antigen family E, - semaphorin 5B isoform 1 - zinc finger protein 646	NP_619648.1 NP_001026872.2 EAW52171.1	58,33 50,00 50,00
T04	HWEQRPQWPYQN	HW DQLPQYQLNR GSEQRPKWFHPL SDDRRPQWRRED	- caspase - ADAM -Zinc Finger 106	CAI40546.1 BAD93081.1 NP_071918.1	41,67 41,67 33,33
T09	HSTALYQPLLRS	ASALYGQPLLRS AQSLPSQPLLRS VKSTQYQSLLRS	- Ubiquitin specific peptidase 4 (proto-oncogene) - MECT1/MAML2 fusion -bullous pemphigoid antigen	AAI25132.1 AAK93833.1 CAI16610.1	50,00 50,00 50,00

T20	HLHNITARSPAH	RTKNITAKNPAK	- SUHW4_HUMAN Suppressor of hairy wing homolog 4	Q6N043	50,00
		HLRNIAARNIVN	- p63	CAA67507.1	50,00
		PRTWPTARSPAW	- seven transmembrane helix receptor	BAC06129.1	50,00
T21	HNTFLLSSLTWT	YDLRLLSSLTGS	- Insulin-like growth factor 2 receptor variant	BAD92905.1	50,00
		LHYFLLVSFTWM	-G protein-coupled receptor 112	AAW78659.1	50,00
		ISVLLLSGLTWQ	- interleukin-2	AAA59142.1	50,00
T18	LVPCPSNQNTTV	GVPCPSAQPNHC LVPCPQTFQEND SEPCPSNYKYVS	- ubiquitin specific protease - interleukin 1, - EHMT1 protein	XP_950671.2 EAW73606.1 AAH11608.2	50,00 41,67 41,67
T12	QNFSMSQSLRSL	KIEGMTQSLRGL GIDSMSQSLALA KIEGMTQSLRGL	- AH antigen - DEAD box protein - mitotin	AAA86889.1 CAC14786.1 AAA82935.1	50,00 50,00 50,00
T03	YLGTNPSLPPVL	KLGTQPSLPHVR DLLTDPSLPPQV AGGANPALAPVL	- ubiquitin specific protease - cyclic nucleotide phosphodiesterase -PI-3-kinase-related kinase SMG-1	NP_055832.3 CAA64774.1 AAK00511.1	66,67 58,33 58,33

T07	QNKLWDTPSNPW	SLTGWSTPSNPL PDTLWQCPSSPW PDFLWDVPSNWT	- KIR antigen 3DL2 - M130 antigen cytoplasmic variant 2 - fatty acid synthase	AAS73161.1 CAA80543.1 NP_004095.4	50,00 50,00 50,00
T14	IETYESTHQSP	SKHSLSTHQSP DNTRSTHQSED NLETSSHQSV	- similar to Six transmembrane epithelial antigen of prostate - ARHGAP5 protein - zinc finger, CCHC domain containing 11	EAL24267.1 AAH50059.1 CAI23477.1	50,00 58,33 41,67
T05	FMKPNLVRNEAV	CIKPNKVRNETK DDKKRLVRKEAV CIKPNKVRNETK	- growth factor receptor-bound protein 10 - MMS19-like (MET18 homolog, S. cerevisiae), isoform CRA_e - KIAA0207	EAL23897.1 EAW49925.1 BAA13198.2	58,33 58,33 58,33
T23	SYASDDNNAWRT	SCCSDGNIAVWD, TGKDNLLNAWRT GAQIDDNNPRRT RYDSDDDLAWN	- transducin-like enhancer of split 3 (E(sp1)) - collapsin response mediator protein 1 - transmembrane 7 superfamily member 1	EAW77848.1 EAW82403.1 BAD97352.1	41,67 50,00 50,00

As proteínas expostas na tabela na cor azul são antígenos já identificados por outros autores para câncer de mama

4.0-ELISA

O teste ELISA foi realizado para analisar a reatividade dos fagos às proteínas do soro de paciente com câncer de mama (Figura 3) e foram considerados significativos os valores com razão do índice ELISA maior do que um.

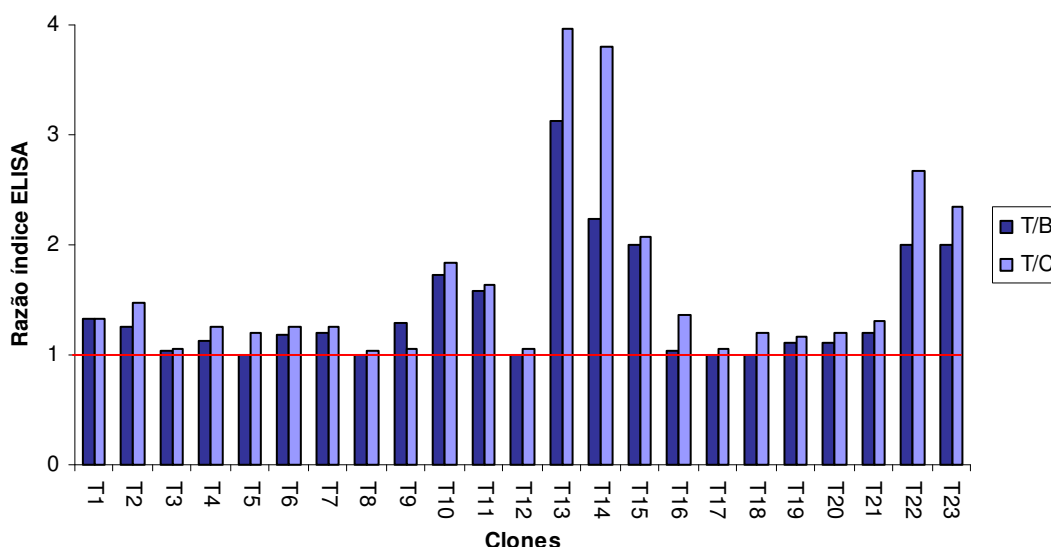


Figura 3: Gráfico representativo da Razão do Índice ELISA mostrando a reatividade dos clones de fagos capturados por anticorpo anti-M13 contra soro total de mulheres com câncer de mama, com doenças benignas de mama e mulheres clinicamente saudáveis. T/B: Razão do índice ELISA Tumor/Benigno, T/C: Razão do índice ELISA Tumor/Controle.

A imunorreatividade dos peptídeos aos 3 grupos de IgG foi estimada calculando-se as densidades óticas (DO) relativas obtidas no *dot-blotting*, como mostra o gráfico apresentado na Figura 4. Constatou-se que 17 clones selecionados no *panning* foram mais reativos para câncer de mama.

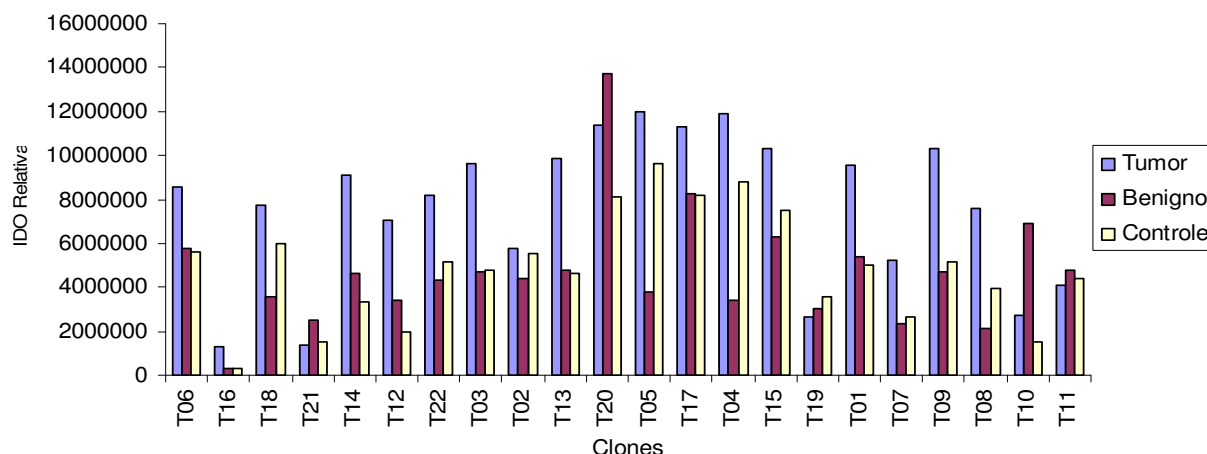


Figura 4: Gráfico representativo das densidades óticas relativas obtidas para cada um dos clones recombinantes e para o fago Helper nos ensaios de *Dot-Blotting* com IgGs de pacientes com Câncer de mama (Tumor), Benigno e Controle sadio.

DISCUSSÃO

Inovações em métodos imunológicos para identificação de genes têm levado à descoberta de um grande repertório de antígenos reconhecidos pelo sistema imune celular e humoral (3). Dentre essas inovações encontra-se a tecnologia de *Phage Display*, que é uma técnica eficiente para o mapeamento de epítomos, podendo ser utilizada no isolamento de peptídeos que podem ser empregados como vacinas e/ou para diagnóstico de doenças.

Nesse trabalho foi utilizada a técnica de *Phage Display* para identificar peptídeos ligantes a proteínas do soro de pacientes com câncer de mama. No teste ELISA, os 30 clones selecionados no *biopanning* do soro de mulheres com câncer de mama apresentaram razão do índice ELISA maior do que 1 e elevado grau de informação de cada peptídeo, demonstrando a eficiência do *biopanning* subtrativo utilizado.

Quando esses clones foram testados em relação ao reconhecimento pelas IgGs, pôde-se observar que IgG dos três grupos analisados (câncer, doenças benignas e mulheres sadias) reconheceram esses peptídeos, porém, alguns deles foram capazes de detectar diferença na expressão entre os grupos, sugerindo que algumas IgGs são mais expressas no soro de pacientes com câncer de

mama. O *biopanning* foi feito em soro total, logo os peptídeos podem ser reconhecidos por IgG, como provado nos testes de *dot-blotting* e também podem interagir com outras proteínas do soro. Parte do resultado desse ensaio pode ser consequência de reatividade cruzada entre as IgGs e as proteínas do capsídeo viral e por isso, outros testes são necessários para otimização dessas reações, possibilitando o uso desses peptídeos como marcadores séricos tumorais.

Foi relatado, pela primeira vez, o uso de um peptídeo isolado por *Phage Display* em câncer de mama correlacionado com a sobrevida do paciente. Peptídeos ligantes específicos a IgG de pacientes com câncer de mama foram selecionados utilizando 3 bibliotecas de peptídeos (15, 12 e 7 aminoácidos). De 6 pacientes que apresentaram forte imunorreatividade para o peptídeo SQRIPARIHHFPTSI, 3 continuam vivos e os três falecidos apresentaram maior tempo de sobrevida em relação aos pacientes que não apresentaram imunoreatividade para o peptídeo ligante (12).

O clone T14 é um forte candidato a marcador sérico tumoral. Apesar de apresentar baixo número provável de clone independente na biblioteca, esse clone foi o que apresenta maior frequência entre os peptídeos selecionados no *biopanning* (23,33 %) e elevado grau de informação, descartando a possibilidade de ter sido selecionado ao acaso. Os resultados do teste ELISA mostram que o clone T14 apresentou alta reatividade com soro de pacientes com câncer de mama. Nas análises de *dot-blotting*, onde foi analisada a reatividade dos peptídeos com IgGs, o clone T14, também, mostrou elevada imunoreatividade.

Análises de bioinformática do clone T14 revelaram que ele apresenta similaridade com proteínas diferencialmente expressas em tumores. As três proteínas apresentadas na tabela com similaridade ao clone T14 apresentam o motivo HQS, sugerindo ser esse, um motivo de ligação entre as proteínas do soro e o peptídeo. Entre as proteínas com similaridade a esse peptídeo, a STEAP, uma proteína transmembrana, já foi descrita como diferencialmente expressa em câncer de próstata e outros carcinomas (13). A falta de expressão dessa proteína em tecido sadio, exceto para próstata, que apresenta um nível muito baixo, sugere que essa proteína é um alvo ideal para imunoterapia. A proteína ARHGAP5 que, também, teve similaridade com o clone T14, não está totalmente

caracterizada, porém, sabe-se que em câncer de mama ocorre duplicação gênica e altos níveis de expressão do mRNA dessa proteína (14).

Nas análises de similaridade dos clones T02, T12, T13, T17, T08, T16 e T21 foram encontrados motivos dentro de cada clone que, provavelmente, representam a região de interação entre os peptídeos e proteínas do soro (tabela 4).

Os peptídeos T03, T17 e T18 tiveram similaridade com proteínas que também foram encontradas num experimento onde a técnica SEREX foi utilizada para identificar antígenos associados ao câncer de mama (15) (Tabela 4), reforçando a possibilidade de utilização dos peptídeos selecionados nesse trabalho como marcadores tumorais e na imunoterapia.

A caracterização estrutural de antígenos tumorais em humanos por anticorpos auto-imunes tem fornecido evidências substanciais do reconhecimento do câncer pelo sistema imune e tem levado à identificação de alvos atrativos em técnicas baseadas em vacinas como terapia do câncer (18).

Apesar dos peptídeos expressos pelos fagos selecionados no *biopanning* serem muito pequenos para afirmar sua identidade, o fato de diferentes clones apresentarem similaridade para um mesmo tipo de proteína, sugere que diferentes motivos de uma mesma proteína podem ser epítomos reconhecidos por autoanticorpos ou que esses motivos estejam interagindo com proteínas associadas ao câncer de mama, visto que o *biopanning* foi feito com soro total.

Os clones T03, T18 e T09 apresentaram similaridade com a Ubiquitina, que é responsável pela sinalização de proteínas que deverão ser degradadas pelo proteasoma. Alterações nesse processo pode acarretar o desenvolvimento de câncer (16).

Os clones T06, T19, T04, T10, T11, T14, T17 apresentam similaridade com motivos Zinc Finger que estão relacionados a regulação da transcrição do DNA. Atualmente esses motivos têm sido utilizados em pesquisas para redução do tumor (17).

Mais experimentos serão desenvolvidos para comprovar a especificidade da ligação dos peptídeos selecionados à proteínas do soro de mulheres com câncer de mama e posteriormente estes serão utilizados em experimentos com cobaias para que sua função seja definida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kesari AL, Chellam VG, Nair PP,— p53 tumor suppressor protein and tissue proliferative fraction in infiltrating duct carcinoma. *J Surg Oncol* 65:159-63, 1997
2. Daniels TR, Delgado T, Helguera G et al., The transferring receptor part II: targeted delivery of therapeutic agents into cancer cells 121:144-158, 2006
3. Scalan MJ, Gout I, Williamson B, et al: Humoral immunity to human breast cancer: antigen definition and quantitative analysis of mRNA expression. *Cancer Immunity* 1:4, 2001
4. Lake DF, Huynh WC, Hers EM. Natural and induced human antibody response to cancer. *Cancer Invest* 18: 480-489, 2000
5. Coronella-Wood JA, Hersh EM. Naturally occurring B-cell responses to breast cancer . *Cancer Immunol immunother* 169: 2701-2711, 2003
6. Blanca A, Laura ME, Stephen T et al: A novel method to identify and characterise peptide mimotopes of heat shock protein 70-associated antigens. *J Immune Based Ther Vaccines* 4: 40-49, 2006
7. Mintz PJ, Kim J, Do KA: Fingerprinting the circulating repertoire of antibodies from cancer patients. *Nat Biotechnol* 21: 57-63, 2003
8. Bentley L, Fehrsen J, Jordan F et al: identification of antigenic regions on VP2 of African horsesickness virus serotype 3 by using phage-displayed epitope libraries. *J Gen Virol* 81: 993-1000, 2000
9. Grabowska AM, Jennings R, Laing P et al: immunisation with phage- displaying peptides representing single epitopes of the glycoprotein G can give rise to partial protective immunity to HSV-2. *Virology* 269: 47-53, 2000

10. Kouzmitcheva GA, Petrenko VA, Smith GP: identifying diagnostic peptides for lyme disease through epitope discovery. Clin Diagn Lab immunol 8:150-160, 2001
11. Rodi DJ, Sores AS, Makouski L: Quantitative assessment of peptide sequence diversity in M13 combinatorial peptide Phage Display Libraries. J Mol Biol 322: 1039-1052, 2002
12. Hansen MH, Ostenstad B, Sioud M: Antigen-specific IgG antibodies in stages IV long-time survival breast cancer patients. Molecular Medicine 7: 230-239, 2001
13. Rodeberg DA, Nuss RA, Elswa SF: Recognition of Six-Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate "ExpressingTumor Cells by Peptide Antigen Induced Cytotoxic T Lymphocytes." Clin Cancer Res 1: 4545-4552, 2005
14. Katoh M, Katoh M: *FNBP2* gene on human chromosome 1q32.1 encodes ARHGAP family protein with FCH, FBH, RhoGAP and SH3 domains. Int J Mol Med 11: 791-797, 2003
15. Qian F, Odunsi K, Blatt LM et al: Tumor associated recognition by autologous seum in patients with breast cancer. Mol Cell Proteomics 15: 137-144, 2005
16. Boon T, OLD LJ: Cancer tumor antigens. Curr Opin Immunol 9: 681-3,1997
17. Ohta T, Fukuda M: Ubiquitin and breast cancer. Nature 23: 2079-2088,2004
18. Wang LH, Yang XY, Zhang X: Supressor of breast cancer by chemical modulation of vulnerable zinc fingers in estrogen receptor. Nat Med 10: 40-47, 2004