



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

**Caracterização de novos peptídeos selecionados por *Phage Display* como
ligantes a células tumorais mamárias**

Aluna: Isabella Castro Martins

Orientadora: Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo

Co-Orientadora: Dra. Emília Rezende Vaz

UBERLÂNDIA – MG

2022



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

**Caracterização de novos peptídeos selecionados por *Phage Display* como
ligantes a células tumorais mamárias**

Aluna: Isabella Castro Martins

Orientadora: Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo

Co-Orientadora: Dra. Emília Rezende Vaz

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

UBERLÂNDIA – MG

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M386c
2022 Martins, Isabella Castro, 1997-
 Caracterização de novos peptídeos selecionados por *Phage Display*
 como ligantes a células tumorais mamárias [recurso eletrônico] / Isabella
 Castro Martins. - 2022.

Orientadora: Thaise Gonçalves de Araújo.

Coorientadora: Emília Rezende Vaz.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2024.5133>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Genética. I. Araújo, Thaise Gonçalves de, 1984-, (Orient.). II. Vaz,
Emília Rezende, 1989-, (Coorient.). III. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. IV.
Título.

CDU: 575

André Carlos Francisco
Bibliotecário Documentalista - CRB-6/3408



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica
 Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico/PPGGB.				
Data:	Trinta de maio de dois mil e vinte e dois	Hora de início:	13:30h	Hora de encerramento:	14:00h
Matrícula do Discente:	11922GBI003				
Nome do Discente:	Isabella Castro Martins				
Título do Trabalho:	Caracterização de novos peptídeos selecionados por <i>Phage Display</i> como ligantes a células tumorais mamárias.				
Área de concentração:	Genética				
Linha de pesquisa:	Nanobiotecnologia				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Desenvolvimento de plataformas nanobiotecnológicas de doenças auto imunes, neoplásicas e infecciosas.				

Aos trinta dias do mês de maio de dois mil e vinte e dois, às 13:30 horas, reuniu-se via web conferência pela plataforma *Cisco Webex*, pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Professores Doutores: Thaíse Gonçalves de Araújo (Orientador), Prof^ª. Dr^ª. Juliana Franco Almeida e Luciana Machado Bastos. A participação dos dois últimos se deu por epístola. Iniciando os trabalhos o (a) presidente Dr (a). Thaíse Gonçalves de Araújo apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença dos participantes, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa. A seguir o senhor(a) presidente procedeu a leitura das epístolas enviadas pelos membros da banca. Em seguida os membros presentes, passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a leitura das epístolas e a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

(A) PROVADO.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Thaise Gonçalves de Araújo, Presidente**, em 30/05/2022, às 14:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Machado Bastos, Membro de Comissão**, em 30/05/2022, às 15:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Franco Almeida, Usuário Externo**, em 30/05/2022, às 17:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3562842** e o código CRC **2D1D5BAA**.

*“Eu quero ser curado e ajudar curar também
Eu quero ser melhor do que eu nunca fui
Fazer o que eu posso pra me ajudar
Ser justo e paciente como era Jesus
Que eu seja todo dia como um girassol
De costas pro escuro e de frente pra luz”*

– Girassol, Priscilla Alcantara

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente **à Deus** que, com seu impressionante amor e sua infinita misericórdia, zela por mim e por todos aqueles que tanto amo.

Dedico **à minha querida madrinha Adriana**, que luta há tantos anos contra o Câncer de Mama. Sua coragem, religiosidade e benevolência me encantam profundamente e sua história me inspira a seguir o caminho científico em busca de respostas para essa doença cruel e desafiadora.

Dedico **aos meus pais, Moacir e Celeste**, que, mesmo com o coração apertado, não mediram esforços para que eu me mudasse de cidade e fosse atrás dos meus sonhos. Obrigada por serem meu refúgio e acreditarem na minha capacidade. Eu não teria conseguido sem o amor e as orações. Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo, que me acompanha desde a graduação. Obrigada por ser essa mulher guerreira e que não mede esforços pelos seus alunos! Sou grata por todas as oportunidades que me proporcionou, pela confiança depositada e por tantos conselhos e ensinamentos. Sempre lembrarei com carinho de todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart (*in memoriam*), que me acolheu no Laboratório de Nanobiotecnologia e me deslumbrou com toda sua sabedoria, determinação, caráter, criatividade e um coração gigante, sempre disposto a ajudar à todos. Conhecê-lo foi uma das experiências mais enriquecedoras da minha vida! Graças a ele conheci pessoas incríveis e, através delas, posso sentir sua presença e pertencer ao seu legado.

À família Nanos, que tornou meus dias mais felizes e que viveu os altos e baixos desses anos de mestrado ao meu lado! Obrigada por tudo: Fabys, Luciana, Jessiquinha, Kellen, Bel, Hebreia, Tafa, Ana Flávia, Natássia, Lucas Ian, Natieli, Alinne, Esther e Lara Vecchi. Contem sempre comigo!

A minha coorientadora e grande amiga Emília, que com toda a sua leveza, inteligência e competência me acompanhou durante toda a pesquisa. Obrigada por sempre acreditar no meu potencial. Sua personalidade me inspira em todos os âmbitos da minha vida. A admiração que tenho por você é infinita!

À minha irmã/amiga/mãe, Sara, que sempre esteve ao meu lado no laboratório e fora dele também. Obrigada por todos os ensinamentos, conversas, caronas, missas, etc. Sem você esse trabalho não existiria!

Aos meus irmãos de orientadora, que foram suporte e companhia em tantos experimentos, projetos e publicações. Douglas Alexsander, Gabriela, Antonielle, Douglas Brandão, Paula, Adriane, Rafael, Matheus e Sabrina, muito obrigada por toda dedicação ao nosso grupo de pesquisa.

À banca examinadora, pela contribuição e aprimoramento do trabalho e por terem aceitado dividir comigo este momento tão especial.

Ao corpo docente e técnico da UFU, por contribuírem para minha formação acadêmica e pelos serviços prestados, respectivamente; e aos órgãos de fomento CNPQ, CAPES e FAPEMIG por financiarem essa pesquisa.

Às minhas amigas e colegas de trabalho da Biogenetics Diagnósticos e da Conceito Eventos, que são exemplos de força feminina e competência. Desejo a todas muito sucesso em suas carreiras.

Às amigas da vida: Mariana, Thamires, Larissa, Iara, Alisson, Iago, Misaell, Leo, Willow, Mikaelle, João Lucas, Gabriel, Bárbara e José Victor. Obrigada por se fazerem presentes e por comemorarem comigo cada conquista como se fossem suas. Tenho muito orgulho em fazer parte da vida de vocês!

Ao meu namorado Marcelo, que conheci logo no começo mestrado e, portanto, acompanhou de pertinho toda a minha trajetória. Sua paciência, bondade, alegria e companheirismo foram fundamentais. Amo muito você e não tenho palavras para expressar minha gratidão!

À todos que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho e para minha formação pessoal e profissional.

SUMÁRIO

RESUMO.....	xii
ABSTRACT	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Câncer e seus aspectos gerais	1
1.2 Os desafios no diagnóstico de neoplasias malignas	2
1.3 Câncer de Mama: aspectos clínico-patológicos e moleculares.....	4
1.4 Seleção de moléculas bioativas por <i>Phage Display</i>	10
1.4.1 Peptídeos como direcionadores de drogas	13
2 OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos Específicos	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Síntese dos peptídeos	18
3.2 Cultivo celular.....	18
3.3 Imunofluorescência	19
3.4 Citometria de fluxo	19
3.5 Ensaio de citotoxicidade em linhagens celulares mamárias	20
3.6 Isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)	21
3.7 Ensaio de citotoxicidade em PMBC	21
3.8 Detecção de Interleucina-6 (IL-6).....	22
3.9 Análises estatísticas.....	22
4 RESULTADOS	23
5 DISCUSSÃO	30
6 CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS.....	34
ANEXOS	1

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
BSA	Soro albumina bovino
C3	Peptídeo C3
CM	Câncer de Mama
CO ₂	Dióxido de carbono
DMEM	Meio de Eagle Modificado de Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOX	Doxorrubicina
FBS	Soro fetal bovino
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
H2	Peptídeo H2
HER2	Fator de crescimento epidérmico humano do tipo 2
IL-6	Interleucina-6
IMDM	Meio de Dulbecco Modificado de Iscove
KDa	Quilodalton
Ki-67	Marcador de proliferação celular
LA	Luminal A
LB	Luminal B
M	Molar
M13	Bacteriófago filamentosos M13
MCF-10A	Linhagem mamária humana não-tumorigênica
MCF-7	Linhagem mamária humana tumoral fenótipo luminal
MDA-MB231	Linhagem mamária humana tumoral fenótipo triplo-negativo
min	Minuto
mL	Mililitro
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
pb	Pares de bases
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico

PBS	Tampão fosfato-salino
PD	Phage Display
PFA	Paraformaldeído
pg	Picograma
pH	Potencial hidrogeniônico
PTX	Paclitaxel
RE	Receptor de estrogênio
RP	Receptor de progesterona
RPMI-1640	Meio Produzido pelo Instituto Memorial do Roswell Park
TA	Temperatura ambiente
TN	Triplo-negativo
xg	Força centrífuga
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro

RESUMO

O Câncer de Mama (CM) é o tumor mais frequentemente diagnosticado em todo o mundo e uma das principais causas de morte entre mulheres. O diagnóstico precoce e terapias eficazes, especialmente direcionadas, são essenciais à sobrevida das pacientes, exigindo a caracterização molecular dos tumores. A técnica de Phage Display (PD) é uma ferramenta versátil que permite a seleção de peptídeos bioativos potencialmente teranósticos. Nesse contexto, o presente estudo objetivou validar os peptídeos quimicamente sintetizados C3 e H2, selecionados previamente pelo nosso grupo por PD, quanto à capacidade de reconhecimento e ligação às linhagens celulares mamárias MCF-10A (não-tumorigênica), MCF-7 (CM luminal), MDA-MB231 (CM triplo-negativo) e sua potencial utilização no direcionamento de drogas. Os ensaios de marcação, por imunofluorescência e citometria de fluxo, evidenciaram que ambos, destacando-se o peptídeo C3, possuem especificidade às células tumorais, especialmente do fenótipo luminal. Um ensaio de viabilidade demonstrou que, após o tratamento com os peptídeos, esta foi mantida acima de 90% nas células MCF-10A e MDA-MB231, sendo levemente mais citotóxicos para a MCF-7 nas maiores concentrações, corroborando seu direcionamento ao subtipo luminal do CM. Em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), observamos que a viabilidade celular foi mantida em todas as concentrações. Finalmente, os níveis de IL-6 também foram avaliados por ELISA e não foi observada modulação imunológica mediada pelo peptídeo C3. Portanto, nossos resultados sugerem que os peptídeos reconhecem as células tumorais mamárias, não ativando mecanismos pró-tumorigênicos por meio da citocina IL-6, o que torna-os potencialmente aplicáveis no direcionamento de drogas a tumores luminais da mama.

Palavras-chave: Câncer de Mama. Subtipo Luminal. *Phage Display*. Peptídeos Ligantes. Ensaios *in vitro*.

ABSTRACT

Breast Cancer (BC) is the most frequently diagnosed tumor worldwide and one of the leading causes of death among women. Early diagnosis and effective therapies, especially targeted-therapy, are essential for patient survival, requiring molecular characterization of tumors. The Phage Display (PD) technique is a versatile tool that allows the selection of potentially theranostic bioactive peptides. In this context, the present study aimed to validate the chemically synthesized peptides C3 and H2, previously selected by our group by PD, regarding their ability to recognize and bind to mammary cell lines MCF-10A (non-tumorigenic), MCF-7 (luminal BC), MDA-MB231 (triple-negative BC) and their potential use in drug delivery. The staining assays, by immunofluorescence and flow cytometry, showed that both, especially the C3 peptide, have specificity to tumor cells, especially to the luminal phenotype. A viability assay showed that, after treatment with the peptides, it was maintained above 90% in MCF-10A and MDA-MB231 cells, being slightly more cytotoxic to MCF-7 at higher concentrations, corroborating its targeting to the luminal subtype of BC. In peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), we observed that cell viability was maintained at all concentrations. Finally, IL-6 levels were also evaluated by ELISA and no C3 peptide-mediated immune modulation was observed. Therefore, our results suggest that the peptides recognize breast tumor cells, not activating pro-tumorigenic mechanisms through the cytokine IL-6, which makes them potentially applicable for delivering drugs to luminal breast tumors.

Keywords: Breast cancer. Luminal Subtype. Phage Display. Linking Peptides. *In vitro* assays.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer e seus aspectos gerais

As atividades biológicas naturais de um organismo ocorrem de maneira regulada e constante. A nível celular e tecidual, a manutenção do equilíbrio é assegurada pelo controle fino do início ou da progressão do ciclo celular, bem como da produção e da liberação de fatores de crescimento (GAO; LIU, 2019). No entanto, esta estabilidade fisiológica pode ser perturbada, promovendo o surgimento de diferentes enfermidades, incluindo o câncer (TYSNES; BJERKVIG, 2007).

O termo câncer é empregado para designar um grupo de doenças que apresentam crescimento celular anormal e replicação desordenada (ROY; SAIKIA, 2016). As células transformadas possuem características que favorecem o seu desenvolvimento, como o aumento dos sinais de proliferação e de invasão, o surgimento de metástases, a imortalidade replicativa, a indução à angiogênese e o escape a supressores tumorais e à morte celular (HANAHAHAN; WEINBERG, 2000). A reprogramação do metabolismo energético e a evasão à resposta imune propiciam o aparecimento de novas lesões genéticas, o que promove o agravamento da instabilidade genômica e do processo inflamatório (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011). Além disso, características emergentes, sendo estas o desbloqueio de plasticidade fenotípica, a reprogramação epigenética não mutacional, os microbiomas polimórficos e as células senescentes, foram recentemente propostas como novas marcas para a compreensão das neoplasias malignas (HANAHAHAN, 2022).

Fatores intrínsecos e extrínsecos são relacionados à etiologia de neoplasias malignas. Molecularmente, são descritas mutações, translocações cromossômicas, amplificações de genes e modificações epigenéticas (WHITEMAN; WILSON, 2016). Essas mudanças são desencadeadas e/ou potencializadas pela exposição a agentes ambientais, como radiações ionizantes e não ionizantes, produtos químicos e microrganismos (WU, S. *et al.*, 2018). Ainda, destacam-se os hábitos e comportamentos danosos, como sedentarismo,

tabagismo, alcoolismo, obesidade e alimentação não-balanceada (LEWANDOWSKA *et al.*, 2019). A hereditariedade, o histórico familiar e a etnia também são preponderantes para o surgimento da doença (RAHMAN; SURESH; WALY, 2018). Apesar de sua gravidade, a maioria dos cânceres apresenta desenvolvimento inicial lento, indolente e assintomático (WELCH; BLACK, 2010). No entanto, a detecção tardia faz com que grande parte dos casos evolua da fase pré-clínica para a fase clínica, o que torna imprescindível a busca por métodos de diagnósticos rápidos, precisos e pouco invasivos.

1.2 Os desafios no diagnóstico de neoplasias malignas

Múltiplas abordagens são necessárias para o diagnóstico confiável de doenças complexas como o câncer. Atualmente, exames físicos, de imagem e laboratoriais já são consolidados. A triagem por meio de exames físicos, rotineiramente realizados na prática clínica, atua investigando mudanças nas características habituais de gânglios, glândulas e órgãos, como a tireoide, cavidade oral, pele, linfonodos, testículos, próstata, colo do útero, mamas e ovários, por exemplo (GALE, 2018). Destacam-se a radiografia, a ultrassonografia, a tomografia computadorizada, a tomografia por emissão de pósitrons e a ressonância magnética como principais metodologias de rastreamento (SUNDIN; WILLS; ROCKALL, 2015).

Essas metodologias permitem avaliar a presença, a localização e as dimensões de massas sólidas ou císticas, que, supostamente, sejam tumores com características malignas (GALE, 2018). No entanto, de modo geral, são considerados exames de alto custo, desconfortáveis, que envolvem exposição a radiações ionizantes ou a administração de contraste intravenoso, provocando reações adversas ou alérgicas, em alguns casos (ALKADHI; EULER, 2020; KOBAYASHI *et al.*, 2013). Adicionalmente, esses exames não são indicados para pessoas que apresentam obesidade, diabetes, claustrofobia, problemas renais e que utilizam marca-passo (KLYSIK *et al.*, 2014). São técnicas que necessitam da colaboração dos pacientes para que evitem movimentações durante o procedimento, o que dificulta a sua realização por crianças e pessoas com doenças que ocasionam movimentos involuntários, como Alzheimer e

esquizofrenia (PINHEIRO, 2018).

Já nas biópsias, são conduzidas análises microscópicas de amostras biológicas, como tecidos e sangue, buscando identificar alterações nas características celulares (SINGH, 2016). É considerado o exame padrão-ouro para o diagnóstico, com algumas limitações como invasividade e análise restrita ao fragmento e/ou à peça excisada durante o procedimento (MARTINS *et al.*, 2021). Além disso, outras metodologias são empregadas, como imunohistoquímica, citometria de fluxo, microscopia eletrônica, hibridização fluorescente *in situ* (FISH), reação em cadeia da polimerase (PCR), microarranjos, espectrometria de massa e sequenciamento do DNA (AL-MUGDADI; SHAKUR; SAEDI, 2020; RAI; ROY, 2014). Portanto, são métodos considerados sofisticados e sensíveis, que dependem de mão-de-obra qualificada para sua execução e análise dos resultados, além de maior tempo para processamento, de uma quantidade maior de amostra e de uma segunda opinião especializada (ACS, 2015).

Independentemente da técnica adotada, parâmetros de sensibilidade e especificidade são preponderantes. A sensibilidade diz respeito aos pacientes diagnosticados corretamente com câncer e que, de fato, estão em meio à população doente (verdadeiros positivos). Já a especificidade está relacionada a admitir corretamente aqueles que não têm câncer entre os indivíduos da população não doente (verdadeiros negativos) (TREVETHAN, 2017). Atualmente, nenhum método oferece uma sensibilidade e especificidade de 100%. Nesse cenário, é esperada uma faixa de sensibilidade entre 70% a 80% e especificidade entre 60% a 70% para que o resultado seja seguro (SCHIFFMAN; FISHER; GIBBS, 2015).

Mundialmente, os gastos econômicos relacionados ao câncer são surpreendentes, somando um custo médio anual total de, aproximadamente, 1,16 trilhão de dólares (WHO, 2018). Contudo, o diagnóstico e tratamento do câncer foram significativamente impactados devido à pandemia por COVID-19, com a redução na procura por assistência médica, justificada pelo medo de se contrair a doença. Portanto, nos próximos anos, esses valores podem ainda ser mais suculentos, com um aumento no número de tumores identificados em estágios avançados (SIEGEL *et al.*, 2022). De fato, o diagnóstico, em estágio inicial,

viabiliza uma redução nos valores relacionados ao tratamento, uma vez que são adotadas abordagens terapêuticas menos danosas e onerosas, que melhoraram o prognóstico e a sobrevida dos pacientes (ZHOU *et al.*, 2017). Nesse contexto, as taxas de cura são diretamente proporcionais ao rastreamento e à detecção precoce das neoplasias malignas.

Atualmente, o câncer é classificado como uma das principais causas de mortalidade no mundo (SUNG *et al.*, 2021). Segundo a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, 2020), aproximadamente 19,3 milhões de novos casos da doença foram registrados em 2020, sendo responsável por cerca de 10 milhões de óbitos. No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA, 2020) é estimado, para cada ano do triênio 2020-2022, 625 mil novos casos de câncer. À exceção do câncer de pele não-melanoma, o Câncer de Mama (CM) é o mais incidente entre as brasileiras, sendo também o tumor mais comumente diagnosticado no mundo, para ambos os sexos.

1.3 Câncer de Mama: aspectos clínico-patológicos e moleculares

A mama humana é uma glândula exócrina composta externamente por mamilo e aréola e, internamente, por tecido adiposo, tecido conjuntivo, tecido muscular, vasos sanguíneos, vasos linfáticos, fibras nervosas, lóbulos e ductos, tendo como função a produção de leite (Figura 1) (JESINGER, 2014). O CM é o mais frequentemente diagnosticado em mulheres no mundo, com aproximadamente 2,3 milhões de novos casos, o que representa 24,5% de todos os cânceres que acometem o sexo feminino (WCRF, 2021). Ainda, é a causa mais frequente de morte nessa população, com aproximadamente 685 mil óbitos estimados em 2020, correspondendo a 15,5% dos óbitos por câncer em mulheres (IARC, 2020). No Brasil, são esperados 66.280 novos casos da doença em para cada ano do triênio 2020-2022, o que corresponde a uma taxa de incidência de 61,61 diagnósticos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2020).

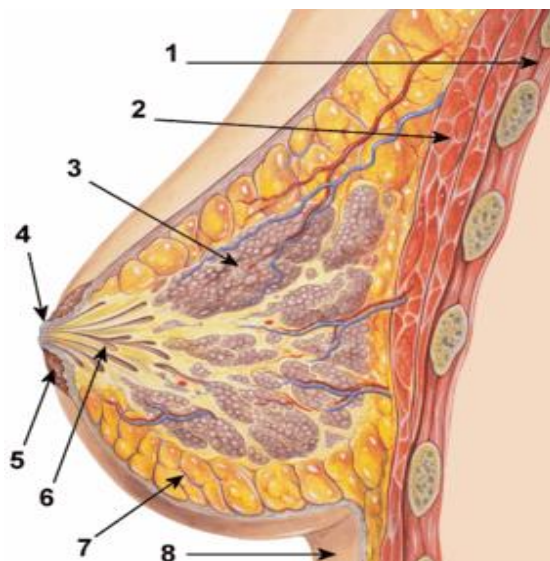


Figura 1: Representação anatômica da mama feminina humana. (1) Caixa Torácica, (2) Músculo peitoral, (3) Lóbulos, (4) Mamilo, (5) Aréola, (6) Ductos, (7) Tecido Adiposo e (8) Pele (adaptado LYNCH, 2006).

Assim como os demais tumores, o CM decorre de múltiplas alterações genéticas e eventos moleculares associados a aspectos hereditários, ambientais ou comportamentais (BRAGA *et al.*, 2018). Os principais fatores de risco são idade avançada, menarca precoce, menopausa tardia, nuliparidade, primeira gestação tardia, doença mamária benigna persistente, obesidade na pós-menopausa, histórico familiar, hiperplasia atípica prévia, densidade do tecido mamário, exposição à radiação ionizante e doença na mama contralateral (KAMIŃSKA *et al.*, 2015; MOMENIMOVAHED; SALEHINIYA, 2019). Ainda, uma maior exposição aos hormônios esteroides estrogênio e progesterona, os quais são importantes reguladores da proliferação e diferenciação celulares, pode ocasionar estresse hormonal, levando ao aparecimento de lesões pontuais malignas no tecido mamário (CARDOSO, 2020).

Fatores genéticos são responsáveis por, aproximadamente, 10% dos casos de CM (BASTOS, 2019), sendo os principais genes de predisposição: *BRCA1* (Gene Câncer de Mama 1), *BRCA2* (Gene Câncer de Mama 2), *TP53* (Gene que codifica a Proteína Tumoral 53), *PTEN* (Homólogo de Fosfatase e Tensina), *CHEK2* (Ponto de Verificação Quinase 2), *ATM* (Ataxia Telangiectasia Mutada) (MAHDAVI *et al.*, 2019). Mutações nos genes supressores tumorais *BRCA1* e *BRCA2* conferem um elevado risco tanto para o desenvolvimento de tumores de

mama, quanto de ovário (SANTOS *et al.*, 2018). Mulheres portadoras dessas alterações de alta penetrância têm, aproximadamente, 50% a 85% de probabilidade de desenvolver CM ao longo da vida (SHIOVITZ; KORDE, 2015).

O CM pode ser classificado de acordo com a sua morfologia em carcinomas, que acometem células epiteliais; adenocarcinomas, que se iniciam no tecido glandular; e os sarcomas, quando identificados em células do músculo, gordura, ou tecido conectivo (CARBONE, 2020). Histologicamente, pode ser definido como não-invasivo e invasivo. No Carcinoma Ductal *in situ* (CDIS) as células malignas ainda não atingiram outros tecidos além dos ductos mamários, sem risco inicial de metástase (FU; GILMORE; JACOBS, 2018). Similarmente, no carcinoma Lobular *in situ* (CLIS), o tumor permanece restrito aos lóbulos da glândula (WEN; BROGI, 2018).

O tipo mais comum, que compreende entre 80% e 90% do total de casos, é o Carcinoma Ductal Invasivo (CDI) (ZHAO, 2021), no qual as células tumorais rompem a membrana basal dos ductos, atingindo o tecido adiposo subjacente e, posteriormente, se instalam em sítios distantes através dos vasos linfáticos e da corrente sanguínea. O segundo mais comum é o Carcinoma Lobular Invasivo (CLI) que se inicia nos lóbulos, mas que também possui o potencial de metastização e atinge 15% das pacientes (REED *et al.*, 2015). Além dos tipos mais frequentes, existem alguns tumores mamários que exibem características distintas e comportamento celular e molecular particular, como os carcinomas medular, metaplásico, apócrino, mucinoso, lobular pleomórfico, tubular, papilar, cribriforme, neuroendócrino, cistosarcoma filóide, angiosarcoma e CM inflamatório (DIECI *et al.*, 2014; LIM *et al.*, 2018; NASCIMENTO; OTONI, 2020).

O CM é uma doença complexa e heterogênea e o sucesso terapêutico depende de seu diagnóstico precoce. Atualmente, este é baseado, principalmente, em exames de imagem, como a mamografia diagnóstica, ultrassonografia e ressonância magnética, além da análise microscópica do tecido lesionado após biópsia (MCDONALD *et al.*, 2016). Do ponto de vista clínico, a análise histopatológica é extremamente relevante, pois a identificação das características do tumores fornece elementos para avaliar a natureza, a extensão, a agressividade e a evolução da doença, definindo o prognóstico e direcionando as decisões quanto às estratégias terapêuticas a serem adotadas (CARBONE,

2020).

Neste contexto, o sistema TNM (*Tumor, Node, Metastasis*), desenvolvido em 1958 pela União Internacional Contra o Câncer (UICC, 2004), é o mais utilizado e preconizado. O método analisa o estadiamento das lesões mamárias conforme tamanho do tumor primário em sua maior dimensão (T), o comprometimento de nódulos linfáticos (N) e ausência ou presença de metástases (M) (Tabela 1) (BRIERLEY; GOSPODAROWICZ; WITTEKIND, 2017).

Tabela 1: Estadiamento dos tumores mamários conforme o sistema TNM (*Tumor, Node, Metastasis*) (Adaptado UICC, 2004).

Aspecto avaliado		Descrição
Tamanho Tumoral (T)	TX	Tumor primário não pode ser avaliado
	T0	Não há evidência de tumor primário
	T1	Tumor < 2 cm em sua maior dimensão
	T2	Tumor > 2 cm e <5 cm em sua maior dimensão
	T3	Tumor > 5 cm em sua maior dimensão
	T4	Tumor de qualquer tamanho com extensão direta à parede torácica ou à pele
Comprometimento Linfonodal (N)	NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
	N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais
	N1	Metástase em linfonodos axilares, homolaterais e móveis
	N2	Metástase em linfonodos axilares, homolaterais e fixos
	N3	Metástase em linfonodos infra claviculares, homolaterais, com ou sem envolvimento de linfonodos axilares.
Metástase (M)	MX	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada
	M0	Ausência de metástase
	M1	Presença de metástase

Com relação ao grau histológico, o método de avaliação mais utilizado é o de Nottingham, que corresponde a classificação de Scarff, Bloom, Richardson (ELSTON; ELLIS, 1991). A técnica indica o nível de diferenciação da peça

cirúrgica e é calculado de acordo com uma avaliação semiquantitativa das características morfológicas do tecido como a formação tubular (se o tumor se encontra indiferenciado, formando blocos celulares sólidos); pleomorfismo nuclear (o quanto difere de uma célula normal) e contagem mitótica (taxa de proliferação das células tumorais). São assim definidas três categorias: Grau 1, em que as células mostram crescimento lento e se assemelham ao tecido mamário normal (bem diferenciado); Grau 2, com células apresentando características histológicas moderadamente diferenciadas (intermediário); e Grau 3, em que há a perda das características originais e as células crescem de forma agressiva e invasiva (pouco diferenciado). O estadiamento histológico está relacionado à sobrevida das pacientes, pois tumores menos diferenciados são diretamente associados a um pior prognóstico (HARBECK *et al.*, 2019).

A análise dos perfis de expressão gênica também permite classificar o CM a nível molecular (PEROU *et al.*, 2000). Essa apresenta valor prognóstico e é imprescindível para a escolha do tratamento, juntamente com as variáveis clínico-patológicas (CINTRA *et al.*, 2012). Em 2013, durante o *13th St. Gallen International Breast Cancer Conference* foi proposta uma categorização simplificada, conforme a expressão de marcadores específicos. Avalia-se a expressão do receptor de estrogênio (RE), do receptor de progesterona (RP), do fator de crescimento epidérmico humano do tipo 2 (HER2) e do marcador de proliferação celular Ki-67 por imuno-histoquímica. Nesse contexto, os tumores mamários são classificados em quatro subtipos moleculares principais: Triplo-Negativo (TN), HER2-enriquecido, Luminal A e Luminal B (UNTCH *et al.*, 2013).

O subtipo TN é caracterizado pela ausência de RE, RP e HER2 (MAROTTI *et al.*, 2017). Biologicamente mais agressivo, carece de tratamento específico que abranja sua heterogeneidade. Portanto, cirurgia, quimioterapia e radioterapia são as opções de tratamento sistêmico nos estágios iniciais e avançados da doença (BIANCHINI *et al.*, 2016). As paciente portadoras de tumores deste subtipo possuem uma maior tendência ao surgimento de metástases e apresentam uma menor sobrevida após o primeiro evento metastático (KUMAR; AGGARWAL, 2016). Além disso, o tumores TN acometem principalmente mulheres jovens, com menos de 50 anos de idade, e correspondem a cerca de 15% a 20% dos casos de CM (VULCZAK, 2018).

O subtipo HER2-enriquecido, definido pela superexpressão deste oncogene na superfície de suas células, é negativo para os receptores hormonais. Os tumores tendem a crescer mais rapidamente que aqueles positivos para RE e RP e apresentam pior prognóstico (TYANOVA *et al.*, 2016). Contudo, com o advento do medicamento Trastuzumab, anticorpo monoclonal específico ao sítio extracelular do HER2, o tratamento para essas pacientes avançou drasticamente, controlando a progressão da doença. A resposta à terapia alvo, isolada ou combinada à quimioterapia adjuvante, beneficia tanto na sobrevida livre de doença quanto na sobrevida global, sendo similar à observada em tumores de melhor prognóstico (WOLFF; TUNG; CAREY, 2019).

O CM Luminal A (LA) apresenta características das células epiteliais luminais da mama, sendo RE positivo, RP positivo ($\geq 20\%$), não expressa HER2 e apresenta baixos níveis de Ki-67 ($< 14\%$) (ROCCA *et al.*, 2015). São tumores considerados de baixo grau e tendem a crescer lentamente, com um curso clínico mais indolente e, geralmente, com menor comprometimento linfonodal. Seu prognóstico e taxa de sobrevida são favoráveis em relação aos demais subtipos (GAO; SWAIN, 2018). A terapia hormonal é efetiva, tanto com moduladores seletivos do receptor de estrogênio, quanto com inibidores da aromatase (NASCIMENTO; OTONI, 2020).

O CM Luminal B (LB) apresenta menor expressão de receptores hormonais (RE e RP), altos níveis de Ki-67 ($> 14\%$) e podem ou não expressar a proteína HER2 (CHEANG *et al.*, 2009). Geralmente, este subtipo está associado a um pior prognóstico e a uma alta taxa de recorrência em relação do subtipo LA (WEIGELT; GEYER; REIS-FILHO, 2010). Dessa forma, os subtipos luminais diferem em sua complexidade genômica, alterações genéticas, prognóstico e resposta à terapia hormonal (VUONG *et al.*, 2014).

A hormonioterapia é recomendada para pacientes com tumores mamários que expressam os receptores hormonais, exercendo seus efeitos de forma gradual e com reações adversas leves (GROUP, 2005). Essa terapia costuma ser aplicada por longos períodos, geralmente de 5 a 10 anos, a menos que o tumor se torne refratário à terapia endócrina (ROMOND *et al.*, 2005; TREMONT; LU; COLE, 2017). Múltiplos mecanismos responsáveis pela resistência à terapia hormonal têm sido propostos e incluem: (i) a diminuição da expressão do RE α ; (ii)

expressão de isoformas truncadas; (iii) modificações pós-traducionais; (iv) mutações que afetam a atividade do receptor e (v) alterações no ciclo e sobrevivência celulares e em moléculas de sinalização (OSBORNE; SCHIFF, 2011).

Essa realidade promoveu a busca por melhores estratégias de tratamento capazes de superar a resistência, como terapias combinadas, terapia-alvo e imunoterapia (RANI *et al.*, 2019). Dessa forma, os avanços na medicina molecular e a construção de bibliotecas de fagos têm sido amplamente utilizados para a seleção de ligantes com alta afinidade, o quais podem ser usados para melhor diagnosticar a doença ou direcionar drogas capazes de conter o avanço das células malignas (DEWAN *et al.*, 2009; GANDRA *et al.*, 2013).

1.4 Seleção de moléculas bioativas por *Phage Display*

Criada por Smith em 1985, a técnica de *Phage Display* (PD) é uma ferramenta biotecnológica inovadora e em nítida expansão. A importância dessa tecnologia foi confirmada após a conquista do Prêmio Nobel de Química em 2018 (BARDERAS; BENITO-PEÑA, 2019). Reconhecida como uma das grandes revoluções da biologia molecular, possui importante aplicação em diversas áreas das biociências, como imunologia, oncologia, neurobiologia, eletrônica nanoestruturada, biossensorização e agricultura (OMIDFAR; DANESHPOUR, 2015). A metodologia é baseada na utilização de bacteriófagos filamentosos modificados geneticamente que expressam peptídeos recombinantes em sua superfície e interagem, na sua conformação nativa, com moléculas-alvo (SMITH, 1985).

O bacteriófago filamentoso M13 é frequentemente utilizado como veículo de clonagem de expressão. Possui genoma circular com DNA fita simples de aproximadamente 6400 pb e codifica 11 genes diferentes. Estes são traduzidos em proteínas funcionais, necessárias para a replicação e montagem do fago (genes I, II, IV, V, X, XI), e em proteínas estruturais do capsídeo (pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX) (WEN; YUAN, 2021). Os genes que codificam as moléculas de interesse estão, geralmente, em fusão a um dos genes que codificam as proteínas pIII ou pVIII. Cada partícula M13 tem de 3 a 5 cópias da pIII. Já a

proteína de revestimento pVIII apresenta cerca de 2700 cópias (SIOUD, 2019). A pVIII fornece uma ampla exibição multivalente, enquanto a pIII possibilita a descoberta de ligantes com alta afinidade, e não apenas daqueles que se destacam por sua avidéz (CABILLY, 1999).

Esses vírus utilizam a estrutura conjugativa do *pilus* F de bactérias gram-negativas *E. coli* como receptores para iniciar a infecção, para que, então, repliquem seu DNA e expressem as proteínas do capsídeo (PETRENKO, 2018). Os novos fagos são produzidos e montados no espaço periplasmático das células bacterianas e a secreção é feita em regiões específicas da membrana, por meio de um processo que não causa a morte da bactéria hospedeira (ciclo lisogênico), o que permite uma alta produção de novas partículas virais (BENHAR, 2001).

Para a execução da técnica de PD é realizado o *biopanning*, ou biosseleção (Figura 2), em que a biblioteca contendo bilhões de peptídeos randômicos é incubada com as moléculas-alvo, sendo em sua maioria imobilizadas em uma superfície sólida, como placa de microtitulação, microesferas magnéticas, resinas e membranas (BAZAN; CALKOSINSKI; GAMIAN, 2012). Células inteiras, órgãos ou tecidos também podem ser utilizados como alvos, evidenciando a versatilidade da técnica na identificação de ligantes frente à complexidade e heterogeneidade do organismo vivo (BÁBÍČKOVÁ *et al.*, 2013; BRADBURY; MARKS, 2004). Após a incubação com o alvo, a solução é lavada repetidas vezes para excluir os fagos fracamente ligados. Ao final de cada ciclo, os clones dos fagos de interesse são eluídos (competitivamente ou em solução ácida), para que sejam recuperados, titulados, amplificados e submetidos a um novo *round* (ciclo), visando o enriquecimento de suas sequências. São necessárias cerca de três a cinco rodadas para que os melhores fagos sejam selecionados. Após esse processo, as sequências de DNA são obtidas por sequenciamento e analisadas afim de identificar os aminoácidos presentes nos clones e, conseqüentemente, para a síntese química dos peptídeos, com modificações conforme os experimentos de validação a serem realizados e aos objetivos do estudo (SAW; SONG, 2019).

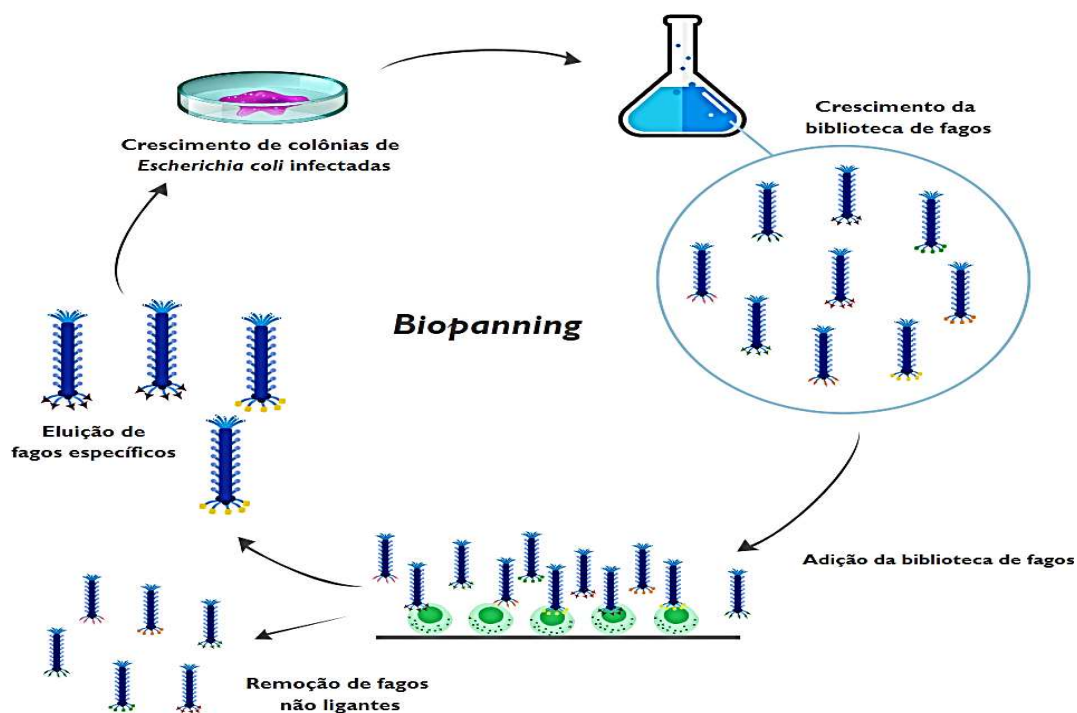


Figura 2: Representação esquemática do processo de *biopanning*. Durante o ciclo de seleção, a biblioteca de fagos exibindo peptídeos é exposta a um antígeno (alvo) para captura; os fagos não ligados são removidos por lavagem sucessiva e os fagos ligados são eluídos e amplificados em *Escherichia coli*.

A seleção *in vivo* também pode ser empregada, conduzida em camundongos, com a posterior análise de órgãos específicos (PASQUALINI; RUOSLAHTI, 1996), ou diretamente no corpo humano, conforme legislação específica. Nesses casos, são identificados marcadores moleculares potencialmente aplicáveis à entrega direcionada de medicamentos e ao diagnóstico utilizando agentes de imagem (SOENDERGAARD; NEWTON-NORTHUP; DEUTSCHER, 2014).

Essa metodologia é notória, uma vez que há uma direta relação entre o fenótipo exibido pelo peptídeo apresentado e o genótipo codificante clonado no DNA viral (AGHEBATI-MALEKI *et al.*, 2016). A validação de clones selecionados inclui diferentes abordagens, como imunocoloração, PCR quantitativa, biodistribuição, imagem *in vivo* e atividade enzimática. A identificação do alvo, quando necessária, pode ser realizada por meio da combinação de cromatografia de afinidade ou ensaio com espectrometria de massa (BÁBÍČKOVÁ *et al.*, 2013). Além disso, é uma técnica versátil por permitir reconhecer interações entre proteínas, mapear domínios e epítomos, identificar receptores da superfície

celular, mimetizar ligantes naturais e interagir com complexos fisiológicos (OMIDFAR; DANESHPOUR, 2015).

O interesse exponencial na aplicação de abordagens nanotecnológicas, como o PD, no campo da oncologia está relacionado ao diagnóstico imagiológico e ao potencial vacinal e terapêutico. Dessa forma, com a ampla aprovação de moléculas funcionais pela *U.S. Food and Drug Administration*, o uso de peptídeos cresceu substancialmente (SLIWKOWSKI; MELLMAN, 2013), com mais de 40 medicamentos já derivados da tecnologia (NIXON; SEXTON; LADNER, 2014). Além disso, vários peptídeos isolados de bibliotecas de fagos estão em estudos pré-clínicos ou clínicos e mais de 60 peptídeos terapêuticos já foram aprovados por esta agência regulamentadora (RAHBARNIA *et al.*, 2017). De modo geral, os medicamentos peptídicos representam uma proporção significativa do mercado farmacêutico, com vendas mundiais de mais de US\$ 70 bilhões em 2019, um aumento de mais de duas vezes em comparação com 2013 (WANG, L. *et al.*, 2022).

1.4.1 Peptídeos como direcionadores de drogas

Drogas tradicionais possuem diversas limitações, incluindo sua inespecificidade, dificuldade em alcançar o sítio de interesse e rápida degradação e eliminação do organismo (GAGLIARDI *et al.*, 2021; PATRA *et al.*, 2018). Estas podem ser superadas por meio de estratégias baseadas no direcionamento molecular, em sistemas personalizados e otimizados de tratamentos. Nesse contexto, anticorpos são rotineiramente empregados, mas também enfrentam problemas relacionados à imunogenicidade, elevado peso molecular (~150 KDa) e depuração não específica pelo sistema reticuloendotelial e fígado, resultando em baixa difusão passiva através das membranas e toxicidade sistêmica limitante da dose (LIU *et al.*, 2021). Portanto, a aplicação de compostos macromoleculares é limitada ao endotélio vascular tumoral e a malignidades hematológicas (WU, 2021).

Peptídeos bioativos, por sua vez, são considerados seguros, com baixa imunogenicidade e metabólitos não-tóxicos (AHRENS; BELLMANN-SICKERT; BECK-SICKINGER, 2012). Seu baixo peso molecular proporciona uma maior

penetração em tecidos, resultando em melhores efeitos antitumorais, com menor custo de produção e com síntese e modificação facilitadas (HOCK *et al.*, 2015). Os métodos atuais para aumentar a meia-vida de drogas peptídicas e melhorar sua entrega incluem a ciclização, a manipulação das sequências de aminoácidos, o acoplamento a nanopartículas e a conjugação a polímeros naturais ou sintéticos (HOPPENZ; ELS-HEINDL; BECK-SICKINGER, 2020).

Os conjugados peptídeo-droga (PDCs) são uma importante classe de agentes terapêuticos que combinam uma ou mais drogas com um peptídeo curto por meio de um ligante biodegradável. Estes podem ser divididos em duas categorias: peptídeos de penetração celular (CPPs) e peptídeos de direcionamento de células (CTPs). Os CPPs, carregados positivamente, se ligam preferencialmente à membrana de células cancerígenas, as quais se apresentam com carga negativa superior às células normais (LIU *et al.*, 2021). A descoberta dos CPPs tem sido uma ferramenta importante na administração intracelular de drogas, proteínas, segmentos de ácido nucleico (DNA, RNA e oligonucleotídeos antisense) e agentes de contraste de imagem (GUI *et al.*, 2020). Os CTPs permitem a entrega de conjugados a um tipo celular específico, poupando as demais células dos efeitos citotóxicos do fármaco. Os CTPs podem exercer seu efeito na membrana celular ou a partir da ligação ao seu alvo molecular, resultando na internalização do complexo peptídeo-droga (LI *et al.*, 2021).

A grande área de superfície de nanoestruturas permite que estas sejam decoradas com várias cópias de um mesmo peptídeo de interesse ou de diferentes sequências em um único construto, promovendo uma maior afinidade de ligação e uma maior eficácia terapêutica, sobretudo em tumores (JEONG *et al.*, 2018). Diversos nanomateriais funcionalizados com peptídeos já foram desenvolvidos para a entrega de fármacos e para aprimorar sistemas de imagens (LI *et al.*, 2021). Podem ser utilizados como carreadores de drogas citotóxicas, hormônios e radionuclídeos, com o intuito de aumentar a estabilidade química, prolongar a circulação dos compostos e promover a entrega de medicamentos (THUNDIMADATHIL, 2012).

Dessa forma, os peptídeos bioativos são considerados alternativas promissoras para diagnóstico e tratamento do câncer devido à sua maior diversidade, especificidade e capacidade de direcionamento (ALDEGHAITHER;

SMAGLO; WEINER, 2015). Diversos peptídeos selecionados por PD foram identificados para diferentes tipos de cânceres, incluindo o de esôfago, ovário, cólon, bexiga, estômago, próstata, pâncreas, mama, fígado e pulmão (ZHANG *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2016; HOU *et al.*, 2018; PENG *et al.*, 2018; SAHIN *et al.*, 2018; WADA *et al.*, 2019; SAR; FRANCO; SOENDERGAARD, 2020; YAN *et al.*, 2021; YU *et al.*, 2021; LIU *et al.*, 2021).

Dubikovskaya e colaboradores (2008) conjugaram o agente terapêutico Paclitaxel (PTX) ao peptídeo octaarginina através de um ligante biorredutível. Os conjugados exibiram atividade significativamente aumentada contra células malignas resistentes ao medicamento em modelos animais de câncer de ovário (DUBIKOVSKAYA *et al.*, 2008). Seguindo o mesmo princípio, Xiong e colaboradores (2005) fundiram o peptídeo RGD (Arginina-Glicina-Aspartato) na superfície de lipossomas estericamente estabilizadas (SSL) carregados com Doxorubicina (DOX). Como resultado, o RGD-SSL-DOX aumentou a eficácia deste fármaco contra células de melanoma murino e humano cultivadas *in vitro*, bem como em tumores cultivados *in vivo* em camundongos (XIONG *et al.*, 2005).

Em outro estudo, a DOX foi conjugada a um peptídeo híbrido de direcionamento duplo (T10-ERK-DOX), composto por um peptídeo de ligação a TfR e um inibidor de quinase regulada por sinal extracelular (ERK). O sistema reverteu a resistência de células tumorais à droga e restaurou a citotoxicidade da DOX, interferindo no efluxo de droga e induzindo apoptose. Ainda, foi observado que a estratégia de múltiplos alvos empregada produziu aumento da eficácia e causou menos suscetibilidade à resistência à DOX (SHENG; YOU; CHEN, 2016).

De fato, a tecnologia de PD representa um campo de pesquisa dinâmico, em virtude de sua simplicidade, alta eficiência, menor custo de produção em larga escala e melhor penetração em tecidos (TAN *et al.*, 2016). Seu uso expande os horizontes para a descoberta de peptídeos que atuam como agentes direcionadores, com ação nas moléculas envolvidas na transformação maligna, progressão de tumores e na identificação de subtipos específicos de células tumorais (SILVA, 2017).

Nanopartículas carregadas de PTX foram acopladas com o peptídeo F3 conjugado a maleimida - polietileno glicol- ácido polilático (mal-PEGPLA). A absorção e acúmulo de PTX pelas células MCF-7 controlou a proliferação tumoral

ao induzir a parada do ciclo celular. Além disso, F3-NP-PTX mostrou uma eficácia antitumoral proeminente em comparação com nanopartículas não direcionadas (NP-PTX), evidenciando seu potencial como um sistema de liberação de drogas de direcionamento eficaz para o tratamento do CM (CAI *et al.*, 2020).

Pacientes com CM Luminal são negligenciadas quanto à busca de novas abordagens terapêuticas, uma vez que a terapia hormonal é amplamente difundida e padronizada (BARCHIESI *et al.*, 2020). Contudo, muitas pacientes refratam ao tratamento e vias de escape são ativadas, promovendo a sobrevivência das células tumorais (BARKER *et al.*, 2015). Nesse contexto, os tumores avançam, com quadros de recidiva, pior prognóstico da doença e limitadas chances de cura (HANKER; SUDHAN; ARTEAGA, 2020). As decisões terapêuticas para os tumores luminais necessitam ser assertivas e precoces, substituindo ou complementando os tratamentos atuais. Portanto, é de suma importância a identificação de peptídeos que atuem como protótipos de alvos terapêuticos, de plataformas de diagnóstico e de tratamento customizado específico, culminando no desenvolvimento e a validação de terapias direcionadas, eficazes, seguras e com custo-benefício satisfatório.

2 OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a capacidade de reconhecimento e ligação de peptídeos sintéticos selecionados por PD a antígenos de CM para provável atuação como direcionadores de drogas.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o reconhecimento dos peptídeos biotinilados C3 e H2 às linhagens celulares mamárias MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB231 através de ensaios de marcação;
- Estabelecer a correlação entre o perfil de marcação dos peptídeos e o subtipo tumoral luminal;
- Avaliar citotoxicidade dos peptídeos em linhagens celulares mamárias e em PBMCs; e
- Avaliar a capacidade do peptídeo não-biotinilado C3 em modular a resposta imunológica por meio da produção de IL-6.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Síntese dos peptídeos

Os peptídeos lineares, denominados C3 e H2 (Tabela 3), previamente selecionados por Silva (2017), foram sintetizados quimicamente com pureza >95% (*GenScript Biotech*). Em um primeiro momento, para ensaios de marcação, foram utilizados peptídeos acetilados em sua porção N-terminal e biotinilados em sua porção C-terminal. Posteriormente, foi sintetizado quimicamente o peptídeo C3 sem a presença da sequência de biotina, contendo uma acetilação em sua porção N-terminal e uma amidação em sua porção C-Terminal para experimentos relacionados à resposta celular.

Tabela 2: Sequências de aminoácidos correspondentes aos peptídeos C3 e H2.

Peptídeos	Sequências de aminoácidos
C3	PPFYTAPGWGGGSAETVESCL
H2	FSQATGRSPTTLGGGSAETVESCL

3.2 Cultivo celular

Foram mantidas em cultura a linhagem não-tumorigênica MCF-10A e as linhagens tumorais mamárias MCF-7 (fenótipo luminal) e MDA-MB231 (fenótipo triplo-negativo). A linhagem MCF-10A foi mantida em meio DMEM-F12 (*Gibco*), enriquecido com 20 ng/mL de fator de crescimento epidérmico (EGF) (*Gibco*), 0,5 µg/mL de hidrocortisona (*Invitrogen*), 10 µg/mL de insulina (*Invitrogen*), 0,1 µg/mL de toxina colérica, 50 µg/mL de gentamicina (*Cultilab*) e 10% de soro fetal bovino (FBS) (*Gibco*). As linhagens tumorais MCF-7 e MDA-MB231 foram cultivadas em meio IMDM (*Gibco*), suplementado com 10% de FBS e 50 µg/mL de gentamicina. As linhagens foram cultivadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, mantidas livres de micoplasma e autenticadas por Repetições Curtas em Tandem (STR). O meio de cultivo foi trocado em dias alternados até que fosse obtido 80% de confluência.

3.3 Imunofluorescência

As células de cada uma das três linhagens foram cultivadas em placas de 6 poços (*Falcon*), sobre lamínulas quadradas (*Precision® Glass Line*) por 24 horas. Em seguida, o meio de cultivo foi descartado, as células foram lavadas com PBS 1X (Tampão Fosfato-Salino, Na_2HPO_4 1,2 mM, KH_2PO_4 1,2 mM, 137 mM NaCl e 2,7 mM KCl em pH 7,4) e fixadas com paraformaldeído (PFA) a 4% por 25 min em temperatura ambiente (TA). As células foram novamente lavadas com PBS 1X e incubadas com glicina 0,1 M por 10 min a TA. Posteriormente, foi realizada outra lavagem com PBS 1X e as células foram incubadas por 16 horas a 4°C com os peptídeos C3 ou H2 biotinilados (100 ng/mL) diluídos em tampão de lavagem (PBS 1X, BSA 1% e Azida Sódica 0,1%). Transcorrido esse período, as células foram lavadas com PBS 1X e incubadas com o anticorpo secundário conjugado a enzima estreptavidina marcada com Alexa-Fluor (Estreptavidina-Alexa Fluor 488, 1:500, S32354, Invitrogen) por 1 h a TA. Os controles das reações foram realizados pelo tratamento das lâminas: (i) com somente tampão de lavagem (PBS 1X, BSA 1% e Azida Sódica 0,1%), (ii) sem os peptídeos e (iii) com as células sem e com o anticorpo secundário. Após a preparação das lâminas, estas foram observadas em microscópio confocal (*ZEISS LSM510*) e analisadas pelo seu respectivo *software* (*ZEISS ZEN lite*).

3.4 Citometria de fluxo

Após 80% de confluência, as células foram desagregadas enzimaticamente e centrifugadas por 5 min a 200 *xg*. O sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas em 1 mL de meio de cultura e contadas utilizando o reagente azul de tripano 0,1%. Em seguida, foram adicionadas 1×10^6 células de cada linhagem em tubos para citometria de fluxo (*Sarstedt*), com posterior fixação em PFA a 4% por 25 min em TA. Transcorrido esse período, as células foram lavadas 2X com tampão de lavagem (PBS 1X, BSA 1% e Azida Sódica 0,1%), e incubadas por 16 horas a 4°C com o peptídeo C3 ou com H2 biotinilados (100 ng/mL) diluídos em tampão de lavagem. As células foram, então, lavadas 2X e incubadas com

Estreptavidina- *Alexa Fluor 488* (1:500) por 1 hora a TA. Após lavagem por 2X, as células foram ressuspensas em tampão de lavagem para aquisição pelo citômetro de fluxo *Accuri™ C6* (*BD Biosciences*) e analisadas pelo *software FloJo VX* (*BD Biosciences*).

3.5 Ensaio de citotoxicidade em linhagens celulares mamárias

A viabilidade das células tratadas com os peptídeos C3 e H2 foi determinada pelo ensaio de Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) (*M6494, Invitrogen*) (MOSMANN, 1983). Após a confluência, as células foram desagregadas enzimaticamente e centrifugadas por 5 min a 200 *xg*. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de seus respectivos meios de cultivo para a contagem utilizando azul de tripano 0,1%. Em uma placa de 96 poços (*Cralplast*) foram adicionadas 2×10^4 células/poço em um volume de 100 μ L de meio de cultura completo com incubação a 37°C e 5% CO₂ por 24 horas para a aderência. Em cada placa, foram incluídos o controle negativo (meio de cultura sem tratamento) e o branco (poços com apenas o meio de cultura correspondente). As concentrações dos peptídeos C3 e H2 utilizadas foram: 1 pg/mL, 10 pg/mL, 100 pg/mL, 1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL, 1 μ g/mL, 2 μ g/mL e 4 μ g/mL.

A placa foi mantida durante 48 horas a 37°C e 5% CO₂. Após incubação, foram adicionados 20 μ L de MTT (5 mg/mL) por poço e mantido por 4 horas. Em seguida, as placas foram retiradas da incubadora para adição de 50 μ L por poço de solução de SDS/DMF (dodecil sulfato de sódio 20%, N-dimetil-formamida 50%) e mantidas por 16 horas. Por fim, foi realizada a leitura da absorbância à 570 nm em espectrofotômetro (*Multiskan™ GO*). Os cálculos de viabilidade celular foram realizados utilizando a fórmula abaixo:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{(\text{AT} - \text{AB})}{(\text{ACN} - \text{AB})} \times 100$$

AT = Absorbância da Amostra

AB = Absorbância do Branco (apenas meio de cultura)

ACN = Absorbância do Controle Negativo de morte (células não tratadas)

3.6 Isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

O sangue periférico de voluntários saudáveis, sem sintomas inflamatórios e nem o uso de anti-inflamatórios nos 15 dias anteriores ao experimento, foi coletado em tubos plásticos heparinizados e centrifugados por 20 min a 300 *xg* em TA. Em um tubo cônico contendo 8 mL de PBS 1X, foi pipetado o anel leucocitário, o qual foi homogeneizado levemente por inversão. Essa diluição foi gentilmente adicionada sobre 6 mL de *Histopaque*®-1077 (*Sigma-Aldrich*) em um novo tubo cônico, e centrifugada por 20 min a 300 *xg* em TA. A fase contendo as PBMCs foi coletada e transferida para um novo tubo cônico. As células de interesse foram lavadas com PBS 1X e centrifugadas por 10 min a 300 *xg* em TA e mantidas em meio RPMI-1640 (*Gibco*) suplementado com 10% FBS. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer utilizando azul de tripano 0,1% e, posteriormente, as células foram tratadas com o peptídeo C3 sintético. O estudo foi conduzido de acordo com a Declaração de Helsinque e o Comitê de Ética da Universidade Federal de Uberlândia aprovou todos os procedimentos (nº 4.100.044/2020). O termo de consentimento livre e esclarecido foi assinado por todos os participantes.

3.7 Ensaio de citotoxicidade em PMBC

A viabilidade das PBMC tratadas com o peptídeo C3 foi determinada pelo ensaio de MTT. Em uma placa de 96 poços foram adicionadas 2×10^4 células/poço em um volume de 100 μ L de meio de cultura RPMI-1640 (*Gibco*). Em cada placa, foram incluídos o controle negativo e o branco conforme anteriormente. As concentrações do peptídeo C3 (não-biotinilado) utilizadas foram: 10 ng/mL, 100 ng/mL e 1 μ g/mL.

A placa foi mantida durante 24 e 48 horas a 37°C e 5% CO₂. Após incubação, foram adicionados 20 μ L de MTT (5 mg / 1 mL PBS 1X) por poço e mantido por 4 horas. Em seguida, 50 μ L de solução de SDS/DMF foram adicionados em cada poço e a placa mantida a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂

por 16 horas. Por fim, foi realizada a leitura da absorbância à 570 nm em espectrofotômetro (*Multiskan™ GO*). Os cálculos de viabilidade celular foram realizados utilizando a fórmula abaixo:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{(AT - AB)}{(ACN - AB)} \times 100$$

AT = Absorbância da Amostra

AB = Absorbância do Branco (apenas meio de cultura)

ACN = Absorbância do Controle Negativo de morte (células não tratadas)

3.8 Detecção de Interleucina-6 (IL-6)

As PBMCs obtidas de voluntários saudáveis e as linhagens celulares MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB231 foram tratadas com o peptídeo C3 não-biotinilado por 48 horas nas concentrações de 10 ng/mL, 100 ng/mL e 1 µg/mL. Após a incubação, as amostras de sobrenadante foram coletadas para análise dos níveis de IL-6 por meio do Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) utilizando o kit *Human IL-6 ELISA (555220, OptEIA™, BD)*, conforme as recomendações do fabricante. Todas as quantificações foram realizadas em triplicata.

3.9 Análises estatísticas

Foi utilizado o programa *GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software)* para a análise dos resultados e consideradas diferenças estatisticamente significantes quando $P < 0,05$. Após confirmação da distribuição normal dos dados pelo teste de Kolmogorov–Smirnov os dados foram submetidos à análise de variância univariada One-Way ANOVA seguida pelo teste de Tukey ou Dunnet.

4 RESULTADOS

Em um primeiro momento, ensaios celulares foram realizados para melhor compreender o comportamento dos peptídeos biotinilados C3 e H2 no CM. A especificidade em MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB231 foi confirmada por microscopia de fluorescência, validando o reconhecimento e a ligação dos peptídeos às células mamárias.

A Figura 3 mostra que a marcação observada por microscopia confocal foi mais intensa em MCF-7 e menos intensa em MCF-10A e MDA-MB231, para ambos os peptídeos, confirmando a especificidade dos peptídeos a células tumorais luminais. Interessantemente, o tratamento conduzido com o peptídeo biotinilado C3 apresentou marcação celular mais acentuada quando comparado à marcação obtida pelo tratamento com o peptídeo biotinilado H2.

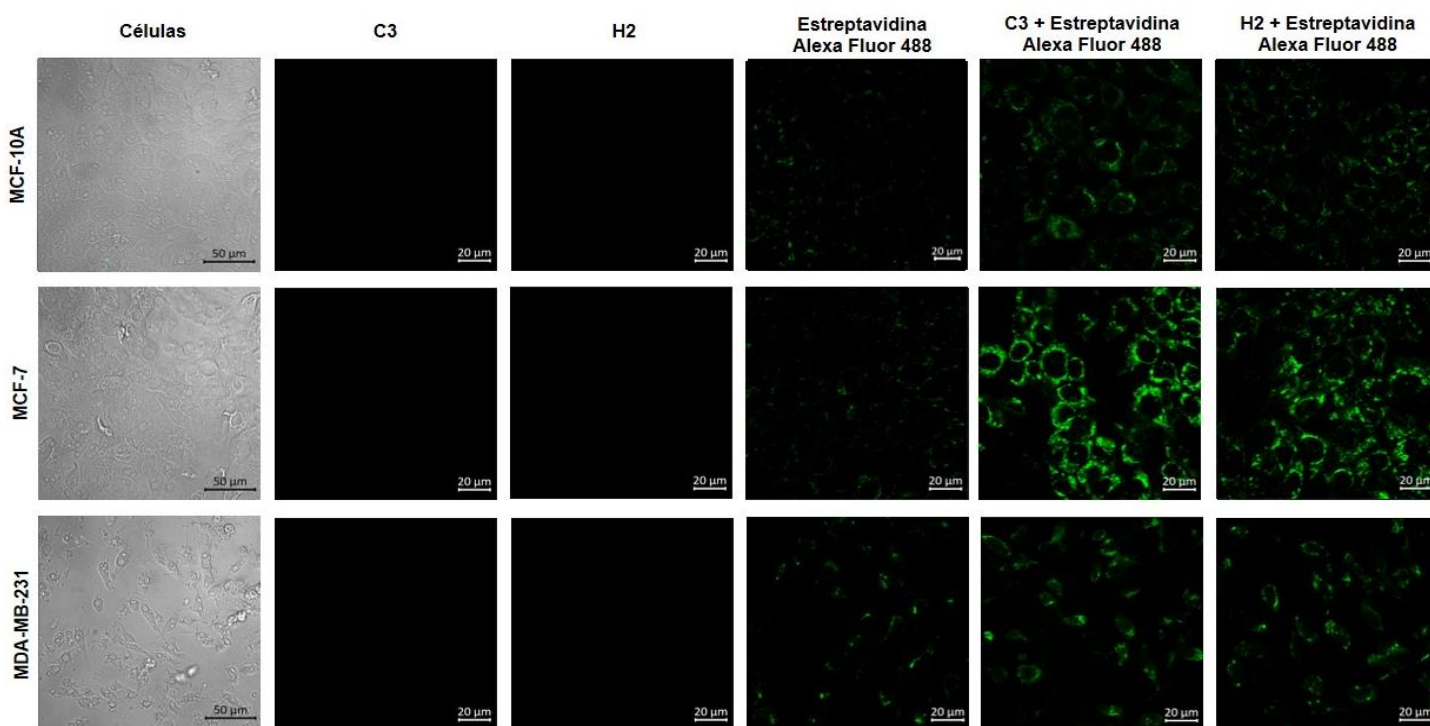


Figura 3: Ensaio de imunofluorescência realizado em células mamárias não permeabilizadas MCF-10A (linhagem não tumorigênica), MCF-7 (linhagem tumoral fenótipo luminal) e MDA-MB231 (linhagem tumoral fenótipo triplo-negativo), incubadas com os peptídeos biotinilados C3 e H2. Para localização fluorescente, foi utilizado o anticorpo secundário Estreptavidina-Alexa Fluor 488 (1:500). As imagens da lateral esquerda demonstram a morfologia celular sem tratamento. Como controle negativo, as células foram incubadas apenas com os peptídeos ou apenas com o anticorpo secundário. Escala = 50 µm e 20 µm (ampliação).

A fim de se confirmar a especificidade de ligação de ambos os peptídeos nas linhagens celulares, foi realizado a quantificação de marcação por citometria de fluxo (Figura 4). Os resultados confirmam a especificidade dos peptídeos biotinilados C3 e H2, sendo que as células incubadas apresentaram uma marcação mais acentuada quando comparadas aos controles experimentais. Estes incluíram células não incubadas com os peptídeos, células incubadas apenas com os peptídeos e células incubadas apenas com o anticorpo secundário (Figura 4A).

A Figura 4B demonstra a porcentagem de marcação positiva das células de cada linhagem. O peptídeo biotinilado C3 diferencia de forma estatisticamente significativa a linhagem não-tumorigênica e as linhagens tumorais mamárias. A porcentagem de marcação positiva é 3 vezes superior em MCF-7 e 2,7 vezes em MDA-MB231 em relação à MCF-10A. Para este peptídeo, observa-se também uma marcação positiva mais intensa na linhagem luminal MCF-7, corroborando com o resultado obtido na imunofluorescência. Já o peptídeo biotinilado H2, foi capaz de diferenciar a linhagem triplo-negativa MDA-MB231 das demais linhagens.

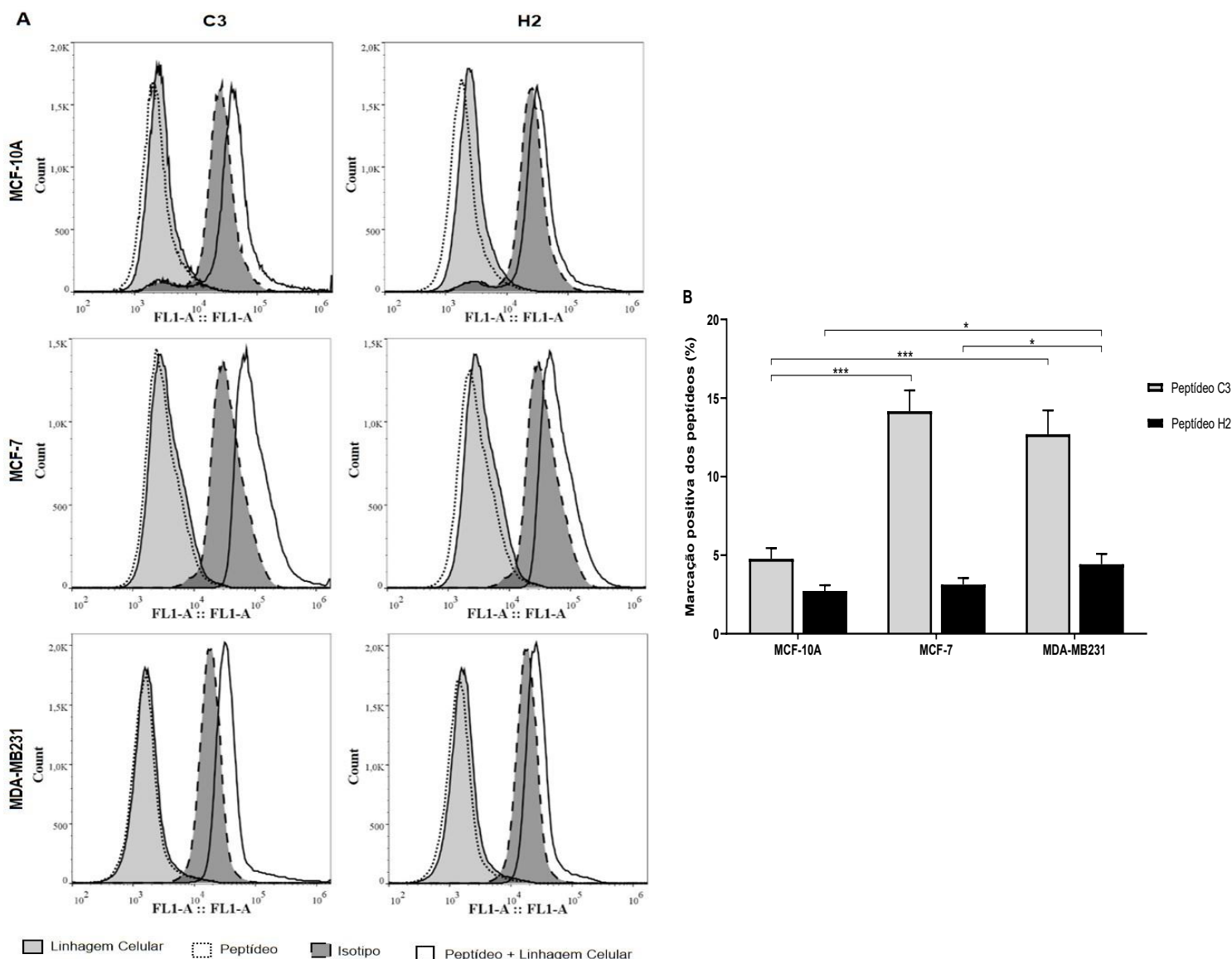
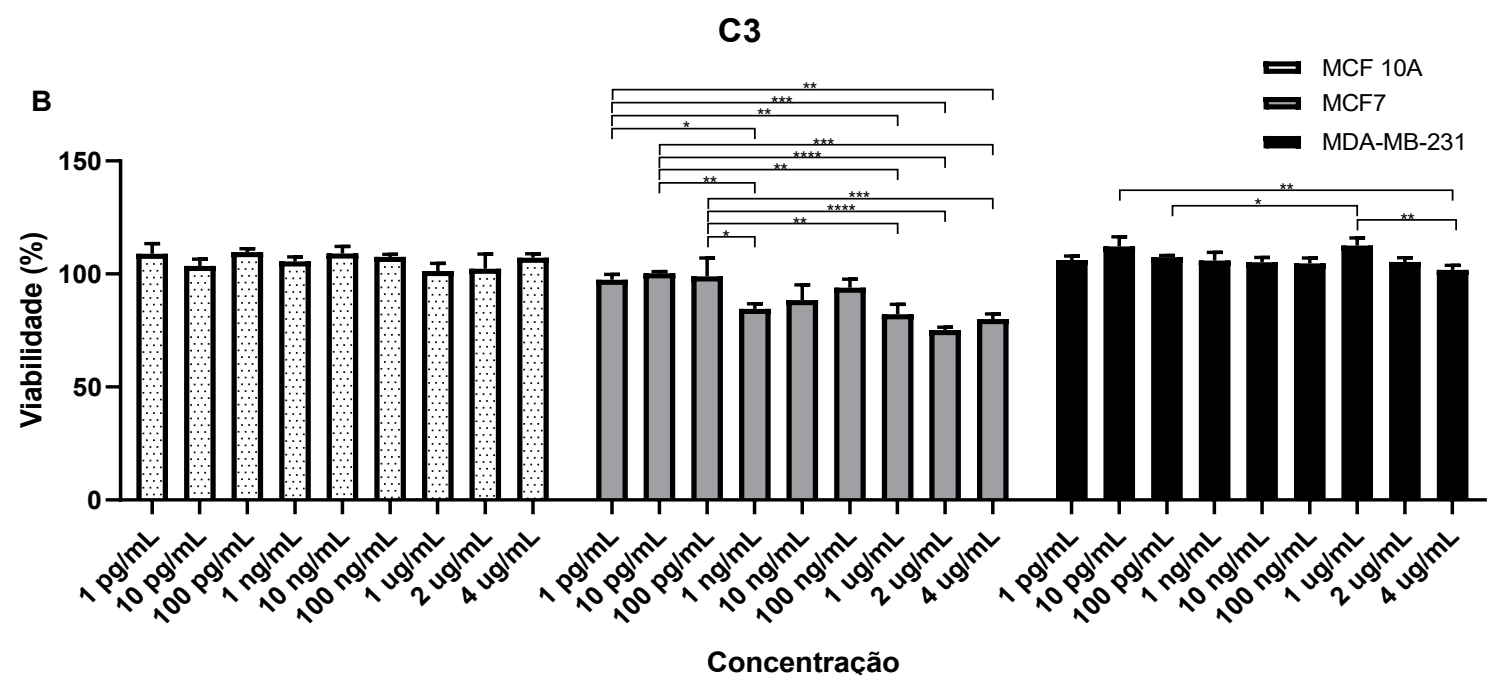
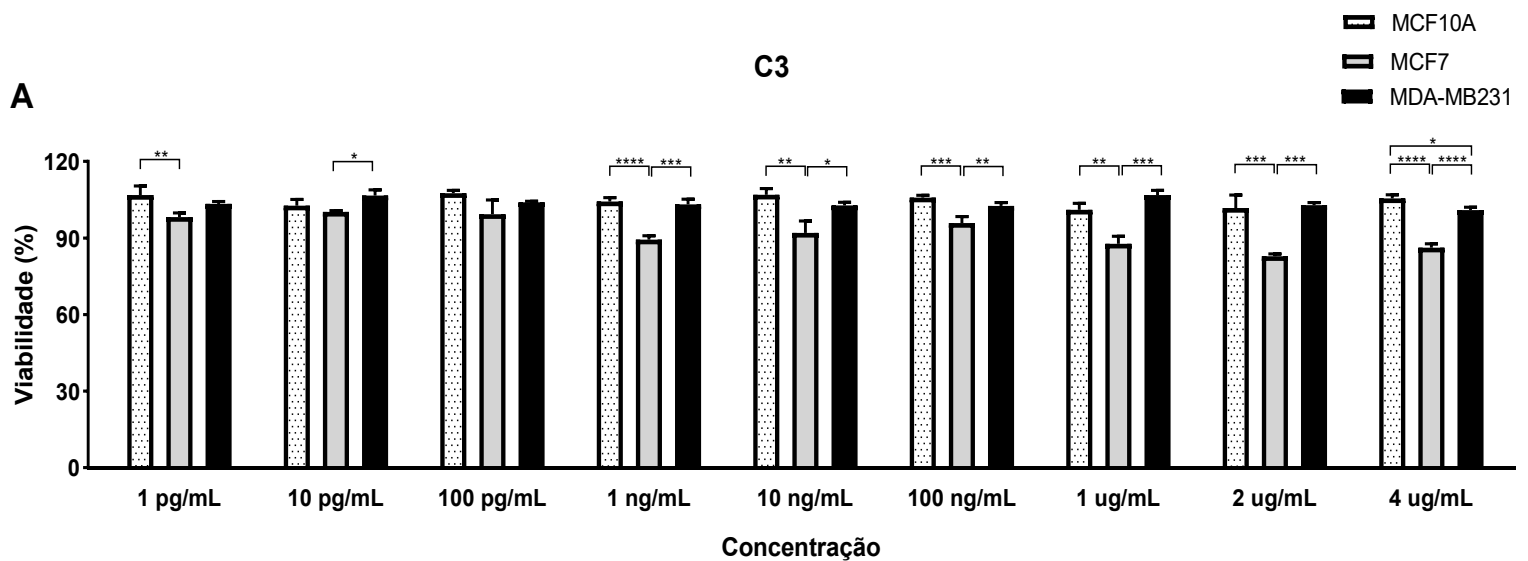


Figura 4: Ensaio de citometria de fluxo para confirmar o reconhecimento dos peptídeos biotinilados C3 e H2 às células MCF-10A (linhagem não tumorigênica), MCF-7 (linhagem tumoral fenótipo luminal) e MDA-MB231 (linhagem tumoral fenótipo triplo-negativo). (A) Histogramas representativos das marcações observadas. (B) Gráficos indicando a porcentagem de células MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB231 marcadas positivamente. A compensação foi realizada com a intensidade de fluorescência de cada peptídeo marcado com o anticorpo secundário Estreptavidina-Alexa Fluor 488 (1:500). Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes (n=3). A significância foi avaliada pelo teste One-Way ANOVA com pós-teste de Tukey. *p<0,05, ***p<0,001.

Posteriormente, o teste de MTT foi conduzido por 48 horas para avaliar a citotoxicidade dos peptídeos às linhagens celulares (Figura 5). Foram utilizadas nove diferentes concentrações dos peptídeos biotinilados C3 (Figura 5A-B) e H2 (Figura 5C-D). Para todos os tratamentos realizados, a viabilidade celular foi mantida acima de 90% nas linhagens MCF-10A e MDA-MB231. A linhagem MCF-

7, quando tratada, apresentou viabilidade abaixo de 90% nas concentrações a partir de 1 ng/mL com efeito dose dependente para ambos os peptídeos. É possível observar que o peptídeo C3 foi levemente mais citotóxico nas maiores concentrações avaliadas (Figura 5A). A análise comparativa entre as concentrações testadas evidenciou que o peptídeo C3 diminuiu a viabilidade da linhagem MCF7 quando utilizado a partir de 1ng/mL e, para o H2, quando estas células foram tratadas com suas três menores concentrações.



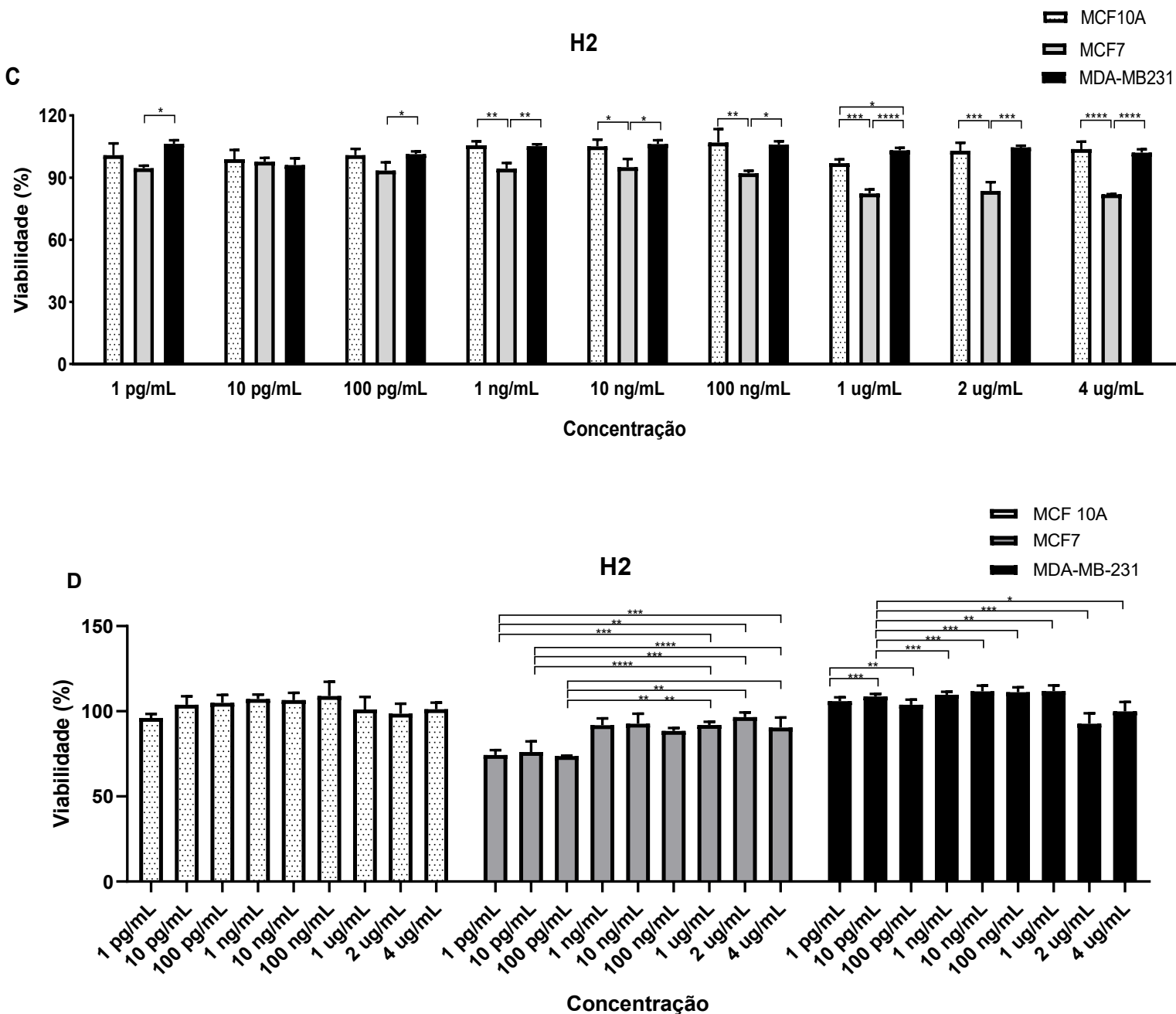


Figura 5: Comparação da viabilidade celular das linhagens MCF-10A (linhagem não tumorigênica), MCF-7 (linhagem tumoral fenótipo luminal) e MDA-MB231 (linhagem tumoral fenótipo triplo-negativo) após tratamento com os peptídeos selecionados por Phage Display por 48 horas. (A) e (B) Tratamento com o peptídeo biotinilado C3. (C) e (D) Tratamento com o peptídeo biotinilado H2. Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes ($n=3$). A significância foi avaliada pelo teste One-Way ANOVA com pós-teste de Tukey. * $p<0,05$, ** $p<0,005$, *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$.

Como o peptídeo biotinilado C3 apresentou marcação celular mais acentuada e não diferiu ao H2 quanto à citotoxicidade, esse foi sintetizado sem a sequência de biotina para ensaios relacionados a respostas imunológicas. Foram, então, também utilizadas PBMCs de voluntários saudáveis. Nestas células, o

ensaio de MTT demonstrou que o peptídeo testado nas concentrações de 10 ng/mL, 100 ng/mL e 1 µg/mL não afetou sua viabilidade não diferindo do controle sem tratamento (Figura 6).

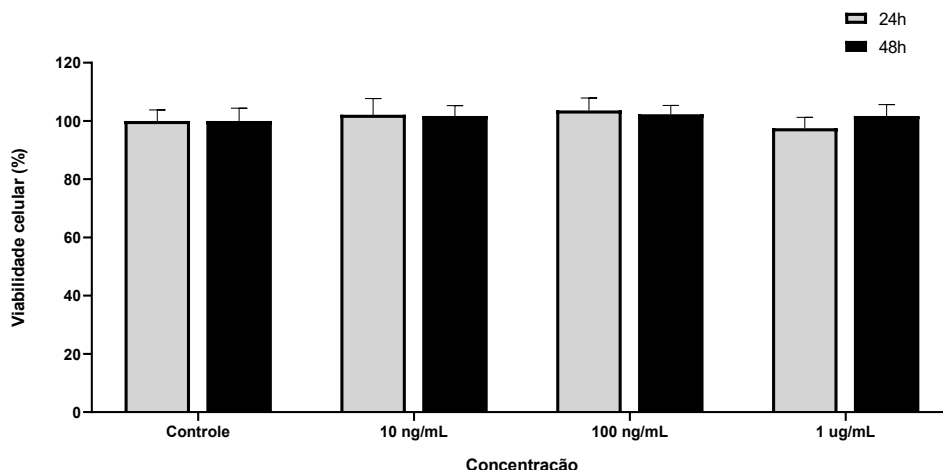


Figura 6: Comparação da viabilidade celular das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) após tratamento durante 24 horas e 48 horas com o peptídeo não-biotinilado C3. Os tratamentos foram avaliados utilizando o MTT e os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes ($n=3$). A significância foi avaliada pelo teste One-Way ANOVA com pós-teste de Dunnet.

Para verificar se o peptídeo é capaz de induzir ou inibir mecanismos pro-inflamatórios, as linhagens celulares MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB231 foram tratadas com C3 não-biotinilado nas concentrações de 10 ng/mL, 100 ng/mL e 1 µg/mL e a produção da IL-6 foi quantificada. O peptídeo não induziu a produção desta citocina tanto nas linhagens celulares tumorigênicas quanto na linhagem não-tumorigênica (Figura 7).

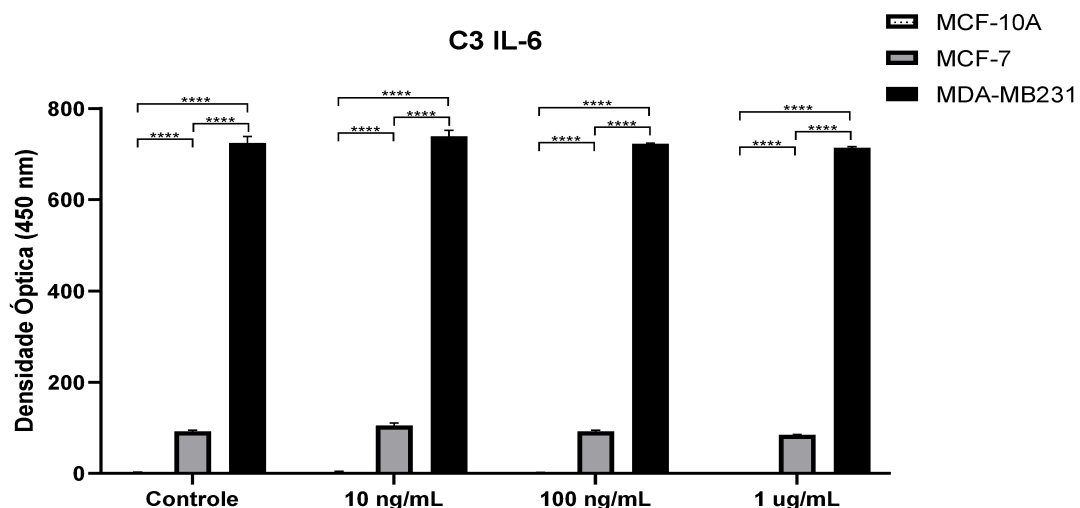


Figura 7: Análise da produção de Interleucina-6 (IL-6) nas linhagens MCF-10A (linhagem não tumorigênica), MCF-7 (linhagem tumoral fenótipo luminal) e MDA-MB231 (linhagem tumoral fenótipo triplo-negativo) após estimulação por 48 horas com o peptídeo não-biotinilado C3. Os tratamentos foram avaliados utilizando o teste de ELISA e os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes ($n=3$). A significância foi avaliada pelo teste One-Way ANOVA com pós-teste de Tukey. **** $p<0,0001$.

Em seguida, testamos o peptídeo não-biotinilado C3 em PBMCs e novamente os níveis de IL-6 foram registrados. Os tratamentos também não alteraram a produção desta citocina em células obtidas do sangue periférico, quando comparados com células sem estímulo (Figura 8).

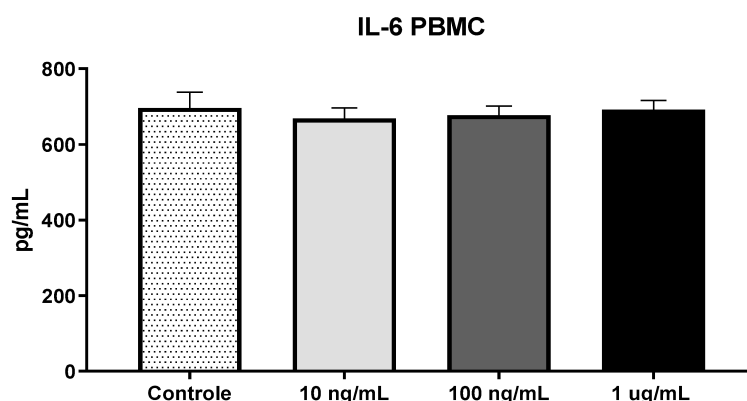


Figura 8: Análise da produção de Interleucina-6 (IL-6) em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) após tratamento por 48 horas com o peptídeo não-biotinilado C3. Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes ($n=3$). A significância foi avaliada pelo teste One-Way ANOVA com pós-teste de Dunnet.

5 DISCUSSÃO

O CM é um problema socioeconômico que sobrecarrega os sistemas de saúde em todo o mundo. Nas últimas décadas, o progresso científico, desde a pesquisa básica até os ensaios clínicos, possibilitou o desenvolvimento de diversas abordagens, contribuindo para avanço nos métodos de diagnóstico e tratamento. A heterogeneidade biológica e molecular desses tumores é desafiadora, uma vez que o índice de mortalidade pela doença permanece preocupante (FAHAD ULLAH, 2019).

A metodologia de PD tem sido empregada a fim de selecionar peptídeos que possuam a capacidade de se ligarem a células tumorais específicas da mama, servindo como uma nova estratégia diagnóstica e/ou terapêutica (teranóstica) (JONES *et al.*, 2018; SALES-DIAS *et al.*, 2021). Dane e colaboradores (2009) também selecionaram por PD ligantes peptídicos específicos a linhagens celulares derivadas de tumores de mama e sua estratégia foi semelhante a utilizada em nosso estudo, adotando a seleção negativa para o enriquecimento de clones específicos a linhagens de células transformadas (DANE; GOTTSTEIN; DAUGHERTY, 2009). De fato, a utilização de linhagens celulares como modelos biológicos contribui significativamente para a descoberta de marcadores e medicamentos, para estudos de toxicidade e para a predição do metabolismo celular (RAVI; SNEKA; JOSHIPURA, 2019). Com a classificação molecular dos tumores da mama estão disponíveis cerca de 84 linhagens celulares de CM atualmente (DAI *et al.*, 2017). Estas células são agrupadas com base na presença ou ausência de RE, RP e HER2, convencionalmente empregados para a subtipagem molecular da doença (SMITH, S. E. *et al.*, 2017).

A linhagem celular epitelial MCF-7 é a linhagem de CM mais estudada no mundo. Esta apresenta resposta ao estrogênio, característica encontrada em tumores hormônio dependentes (COMŞA; CÎMPEAN; RAICA, 2015; LIPPMAN; BOLAN; HUFF, 1976; SEREDYNSKI *et al.*, 2015). Jin e colaboradores (2021) também selecionaram, por PD, o peptídeo CSB1 de uma biblioteca de peptídeos exibidos em fagos usando as células MCF-7 como alvo. Seus resultados de imunofluorescência e microscopia confocal de varredura a laser (LSCM) indicaram que CSB1 se ligou especificamente a células MCF-7 e a tecidos CM de

forma sensível e com alta afinidade (JIN *et al.*, 2021). De forma semelhante, em nosso estudo, os ensaios de imunofluorescência e citometria de fluxo confirmaram a capacidade de ligação dos peptídeos biotinilados C3 e H2 às células das linhagens tumorais mamárias, MCF-7 e MDA-MB231. A observação do nível aumentado de fluorescência, principalmente na linhagem de fenótipo luminal (MCF-7), valida a especificidade e a capacidade de ligação dos peptídeos selecionados previamente pela técnica de PD, especialmente o peptídeo C3.

Ressaltamos que em nossos experimentos de imunofluorescência todas as linhagens foram fixadas e incubadas com os peptídeos sem que fosse conduzido o processo de permeabilização. Portanto, pressupomos que a marcação observada é decorrente do reconhecimento dos peptídeos à receptores presentes na membrana plasmática destas células, o que os tornam ainda mais relevantes em estratégias de diagnóstico e de entrega de fármacos uma vez que, devido à lipofilicidade, a membrana plasmática é um grande obstáculo no processo de penetração de fármacos em células-alvo. Nesse contexto, peptídeos em validação clínica têm almejado alvos extracelulares (LAU; DUNN, 2018) e nossos peptídeos estão em consonância com as estratégias clínicas recentemente adotadas. Os peptídeos alteram o padrão de captação celular, o que pode ser considerado em estratégias que incluem a complexação e a liberação de drogas (POON *et al.*, 2015).

Plataformas baseadas em peptídeos selecionados por PD são estáveis e pouco imunogênicas. As modificações químicas proporcionam maiores taxas de internalização e favorecem a farmacocinética (WANG, S.-H.; YU, 2018). Na nanomedicina, drogas têm sido formuladas em vários sistemas de nano-entrega, proporcionando uma oportunidade sem precedentes de revolucionar a terapia e o manejo do câncer. Em tumores sólidos como o CM, o direcionamento aumenta a permeabilidade e o efeito de retenção (EPR), permitindo o acúmulo de droga no microambiente tumoral (SUBHAN *et al.*, 2021). Dessa forma, a entrega direcionada por peptídeos capazes de reconhecer subtipos de células cancerígenas é particularmente atraente para a terapia do câncer. Contudo, é necessária a compreensão das características do peptídeo de forma isolada, antes de sua utilização. Dentre os vários aspectos importantes a serem testados, destacam-se (i) a capacidade de ligação de modo seletivo aos receptores da

superfície celular alvo, (ii) o receptor deve ser expresso apenas nas células-alvo ou a expressão deve ser maior nas células-alvo do que nas células não-alvo (LIU, M. *et al.*, 2021), (iii) o peptídeo deve ter um sítio de conjugação ideal para reter suas propriedades de reconhecimento do receptor, uma vez que a conjugação do fármaco pode impor um impedimento estérico e (iv) o transportador peptídico deve ser suficientemente estável na circulação sistêmica para atingir as células alvo em uma concentração eficaz (MAJUMDAR; SIAHAAN, 2012). Assim, também avaliamos a resposta celular ao tratamento com os peptídeos, com vistas ao desenvolvimento de sistemas de *drug-delivery*.

O ensaio de redução do MTT foi conduzido para estabelecer a citotoxicidade dos peptídeos C3 e H2 às linhagens utilizadas. Quando em maiores concentrações, houve uma tênue redução na viabilidade das células tumorais, sendo essa ainda mais proeminente para MCF7 quando tratada com o peptídeo C3, o que corrobora seu direcionamento ao subtipo luminal de CM. Quando o MTT foi realizado em PBMCs com o peptídeo C3 observamos que a viabilidade celular foi mantida em todas as concentrações tanto nas células controle, quanto nas células tratadas, sugerindo sua segurança às células sanguíneas circulantes.

Com o intuito de verificar a habilidade do peptídeo C3 em modular a resposta imunológica, os níveis de IL-6 foram dosados nas células MCF-10A, MCF-7, MDA-MB231 e PBMCs. Os resultados evidenciam que não houve aumento ou diminuição dos níveis de IL-6. A IL-6 é uma citocina pleiotrópica que desempenha um papel importante em vários processos fisiológicos, como incluindo resposta imune, proliferação celular e hematopoese (MANORE *et al.*, 2022). Em tumores, promove a carcinogênese, induzindo a inflamação e proliferação de células tumorais (BRIUKHOVETSKA *et al.*, 2021; MASJEDI *et al.*, 2018). Além disso, está envolvida na resistência aos medicamentos (FELCHER; BOGNI; KORDON, 2022). A literatura também aponta que a superexpressão dessa citocina pró-inflamatória em células MCF-7 aumenta a motilidade das células tumorais, induzindo transição epitélio-mesenquimal (EMT) possivelmente por meio da diminuição da expressão de E-caderina (ABAURREA; ARAUJO; CAFFAREL, 2021). Portanto, o peptídeo C3 não ativa mecanismos pró-tumorigênicos por meio dessa citocina, o que o torna aplicável ao direcionamento de drogas a tumores luminiais.

Portanto, inferimos que os comportamentos observados para os peptídeos C3 e H2 em linhagens possam ser transpostos e testados em modelos *in vivo*, em estratégias para o diagnóstico e tratamento individualizado da doença. De fato, já verificamos recentemente a capacidade desses peptídeos de identificar e de classificar molecularmente pacientes com CM utilizando biossensores (DA FONSECA ALVES *et al.*, 2022), o que torna nossa descoberta ainda mais promissora e com perspectiva teranóstica.

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram que os peptídeos C3 e H2 selecionados por PD por nosso grupo de pesquisa reconhecem e se ligam às células tumorais de linhagens mamárias, sobretudo àquelas de fenótipo luminal. Além disso, esses peptídeos apresentaram baixa citotoxicidade celular e não foram capazes de induzir mecanismos pró-inflamatórios tanto nas linhagens celulares quanto em PBMCs. Portanto, tais achados abrem horizontes para sua possível aplicação como direcionadores de drogas a tumores luminais da mama, sendo necessários estudos complementares para a descoberta das moléculas-chave as quais os peptídeos estão reconhecendo e se ligando, através de técnicas robustas, como a espectrometria de massas, e análises de bioinformática. Ainda, testes com novas citocinas podem ser utilizados para compreender o perfil dos peptídeos nas vias de sinalização tumoral. Futuramente, após as validações, aspiramos acoplar os peptídeos a nanopartículas e determinar seu papel no CM por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo* quando conjugados a fármacos empregados atualmente para o tratamento de pacientes do subtipo luminal.

REFERÊNCIAS

ABAUAREA, Andrea; ARAUJO, Angela M.; CAFFAREL, Maria M. The Role of the IL-6 Cytokine Family in Epithelial–Mesenchymal Plasticity in Cancer Progression. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 15, p. 8334, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms22158334>

ACS. **Cancer**. [S. l.], 2015. Disponível em: <https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/6105.00.pdf> 2015.

AGHEBATI-MALEKI, Leili *et al.* Phage display as a promising approach for vaccine development. **Journal of Biomedical Science**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 66, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12929-016-0285-9>

AHRENS, Verena M; BELLMANN-SICKERT, Kathrin; BECK-SICKINGER, Annette G. Peptides and peptide conjugates: therapeutics on the upward path. **Future Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 4, n. 12, p. 1567–1586, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.4155/fmc.12.76>

AL-MUGDADI, SUHAD; SHAKUR, Dalia;; SAEDI, Fitua. IMPORTANT DIAGNOSTIC METHODS OF CANCER BIOMARKERS RELATED DIAGNOSIS AND TREATMENT: A REVIEW. **Journal of Critical Reviews**, [s. l.], v. 7, n. 5, 2020.

ALDEGHAITHER, Dalal; SMAGLO, Brandon G; WEINER, Louis M. Beyond peptides and mAbs—current status and future perspectives for biotherapeutics with novel constructs. **The Journal of Clinical Pharmacology**, [s. l.], v. 55, n. S3, p. S4–S20, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcph.407>

ALKADHI, Hatem; EULER, André. The Future of Computed Tomography. **Investigative Radiology**, [s. l.], v. 55, n. 9, p. 545–555, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/RLI.0000000000000668>

ASAR, Mallika C.; FRANCO, April; SOENDERGAARD, Mette. Phage Display Selection, Identification, and Characterization of Novel Pancreatic Cancer Targeting Peptides. **Biomolecules**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 714, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biom10050714>

BÁBÍČKOVÁ, Janka *et al.* In vivo phage display — A discovery tool in molecular biomedicine. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 31, n. 8, p. 1247–1259, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.04.004>

BARCHIESI, Giacomo *et al.* Neoadjuvant Endocrine Therapy in Breast Cancer: Current Knowledge and Future Perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 10, p. 3528, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21103528>

BARDERAS, Rodrigo; BENITO-PENÑA, Elena. The 2018 Nobel Prize in Chemistry: phage display of peptides and antibodies. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 411, n. 12, p. 2475–2479, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01714-4>

BARKER, Holly E. *et al.* The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 15, n. 7, p. 409–425, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrc3958>

BASTOS, Daniel Rodrigues de. Risk factors related to breast cancer development. **Mastology**, [s. l.], v. 29, n. 4, p. 218–223, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.29289/2594539420190000461>

BAZAN, J; CALKOSINSKI, I; GAMIAN, A. Phage display--a powerful technique for immunotherapy: 2. Vaccine delivery. **Hum Vaccin Immunother**, [s. l.], v. 8, n. 12, p. 1829–1835, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/hv.21704>

BENHAR, Itai. Biotechnological applications of phage and cell display. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 1–33, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(00\)00054-9](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00054-9)

BIANCHINI, Giampaolo *et al.* Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [s. l.], v. 13, n. 11, p. 674–690, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.66>

BRADBURY, A R; MARKS, J D. Antibodies from phage antibody libraries. **J Immunol Methods**, [s. l.], v. 290, n. 1–2, p. 29–49, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.04.007>

BRAGA, Deisi *et al.* Ethanolic Extracts from *Azadirachta indica* Leaves Modulate Transcriptional Levels of Hormone Receptor Variant in Breast Cancer Cell Lines. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 19, n. 7, p. 1879, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms19071879>

BRIERLEY, J; GOSPODAROWICZ, MK; WITTEKIND, C. **The TNM Classification of Malignant Tumours 8th edition**. [S. l.: s. n.], 2017.

BRIUKHOVETSKA, Daria *et al.* Interleukins in cancer: from biology to therapy. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 21, n. 8, p. 481–499, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00363-z>

CABILLY, Shmuel. The Basic Structure of Filamentous Phage and its Use in the Display of Combinatorial Peptide Libraries. **Molecular Biotechnology**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 143–148, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1385/MB:12:2:143>

CAI, Yue *et al.* Tumor-targeting peptide functionalized PEG-PLA micelles for efficient drug delivery. **Biomaterials Science**, [s. l.], v. 8, n. 8, p. 2274–2282, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C9BM02036E>

CARBONE, Antonino. Cancer Classification at the Crossroads. **Cancers**, [s. l.], v.

12, n. 4, p. 980, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers12040980>

CARDOSO, M. P. C. **Associação entre câncer de mama e uso de contraceptivos orais de mulheres em idade fértil**. 2020. - Universidade Federal do Ceará, [s. l.], 2020.

CHEANG, Maggie C. U. *et al.* Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, [s. l.], v. 101, n. 10, p. 736–750, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jnci/djp082>

COMȘA, Șerban; CÎMPEAN, Anca Maria; RAICA, Marius. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. **Anticancer research**, [s. l.], v. 35, n. 6, p. 3147–3154, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26026074>

DA FONSECA ALVES, Rafael *et al.* A novel peptide-based electrochemical biosensor for breast cancer characterization over a poly 3-(3-aminophenyl) propionic acid matrix. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 205, p. 114081, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114081>

DAI, Xiaofeng *et al.* Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. **Journal of Cancer**, [s. l.], v. 8, n. 16, p. 3131–3141, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.7150/jca.18457>

DANE, Karen Y.; GOTTSTEIN, Claudia; DAUGHERTY, Patrick S. Cell surface profiling with peptide libraries yields ligand arrays that classify breast tumor subtypes. **Molecular Cancer Therapeutics**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 1312–1318, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-1105>

DEWAN, M Zahidunnabi *et al.* Fractionated but not single-dose radiotherapy induces an immune-mediated abscopal effect when combined with anti-CTLA-4 antibody. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 15, n. 17, p. 5379–5388, 2009.

DIECI, Maria Vittoria *et al.* Rare Breast Cancer Subtypes: Histological, Molecular, and Clinical Peculiarities. **The Oncologist**, [s. l.], v. 19, n. 8, p. 805–813, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2014-0108>

DUARTE CINTRA, Jane Rocha *et al.* Perfil imuno-histoquímico e variáveis clinicopatológicas no câncer de mama. **Revista da Associação Médica Brasileira**, [s. l.], v. 58, n. 2, p. 178–187, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0104-42302012000200013>

DUBIKOVSKAYA, Elena A. *et al.* Overcoming multidrug resistance of small-molecule therapeutics through conjugation with releasable octaarginine transporters. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 105, n. 34, p. 12128–12133, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0805374105>

ELSTON, C.W.; ELLIS, I.O. pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with

long-term follow-up. **Histopathology**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 403–410, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x>

FAHAD ULLAH, Mohammad. Breast Cancer: Current Perspectives on the Disease Status. *In*: [S. l.: s. n.], 2019. p. 51–64. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-030-20301-6_4

FELCHER, Carla M.; BOGNI, Emilia S.; KORDON, Edith C. IL-6 Cytokine Family: A Putative Target for Breast Cancer Prevention and Treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 1809, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms23031809>

FU, FangMeng; GILMORE, Richard C.; JACOBS, Lisa K. Ductal Carcinoma In Situ. **Surgical Clinics of North America**, [s. l.], v. 98, n. 4, p. 725–745, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.suc.2018.03.007>

GAGLIARDI, Agnese *et al.* Biodegradable Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to Solid Tumors. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 12, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.601626>

GALE, R. P. **Diagnóstico de câncer**. [S. l.], 2018. Disponível em: [https://www.msmanuals.com/pt-br/profissional/hematologia-e-oncologia/visão-geral-sobre-câncer/diagnóstico-de-câncer?query=Diagnóstico de câncer](https://www.msmanuals.com/pt-br/profissional/hematologia-e-oncologia/visão-geral-sobre-câncer/diagnóstico-de-câncer?query=Diagnóstico+de+câncer).

GANDRA, Naveen *et al.* Bacteriophage bionanowire as a carrier for both cancer-targeting peptides and photosensitizers and its use in selective cancer cell killing by photodynamic therapy. **Small**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 215–221, 2013.

GAO, Jennifer J.; SWAIN, Sandra M. Luminal A Breast Cancer and Molecular Assays: A Review. **The Oncologist**, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 556–565, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0535>

GAO, Su-wei; LIU, Feng. Novel insights into cell cycle regulation of cell fate determination. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 467–475, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1631/jzus.B1900197>

GROUP, Early Breast Cancer Trialists' Collaborative. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. **The Lancet**, [s. l.], v. 365, n. 9472, p. 1687–1717, 2005.

GUI, Lin *et al.* Cell-Penetrating Peptides and Polymers for Improved Drug Delivery. **ChemNanoMat**, [s. l.], v. 6, n. 8, p. 1138–1148, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cnma.202000118>

HANAHAHAN, Douglas. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 31–46, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>

HANAHAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, [s. l.], v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

HANAHAAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, [s. l.], v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)

HANKER, Ariella B.; SUDHAN, Dhivya R.; ARTEAGA, Carlos L. Overcoming Endocrine Resistance in Breast Cancer. **Cancer Cell**, [s. l.], v. 37, n. 4, p. 496–513, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.03.009>

HARBECK, Nadia *et al.* Breast cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 66, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>

HOCK, M. Benjamin *et al.* Immunogenicity of Antibody Drug Conjugates: Bioanalytical Methods and Monitoring Strategy for a Novel Therapeutic Modality. **The AAPS Journal**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 35–43, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1208/s12248-014-9684-6>

HOPPENZ, Paul; ELS-HEINDL, Sylvia; BECK-SICKINGER, Annette G. Peptide-Drug Conjugates and Their Targets in Advanced Cancer Therapies. **Frontiers in Chemistry**, [s. l.], v. 8, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00571>

HOU, Lidan *et al.* Identification of a specific peptide binding to colon cancer cells from a phage-displayed peptide library. **British Journal of Cancer**, [s. l.], v. 118, n. 1, p. 79–87, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.366>

IARC. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. [s. l.], 2020. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf>

INCA. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil**. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>.

JEONG, Woo-jin *et al.* Peptide–nanoparticle conjugates: a next generation of diagnostic and therapeutic platforms? **Nano Convergence**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 38, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40580-018-0170-1>

JESINGER, Robert A. Breast Anatomy for the Interventionalist. **Techniques in Vascular and Interventional Radiology**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 3–9, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/j.tvir.2013.12.002>

JIN, Huijuan *et al.* Screening and identification of a specific peptide binding to breast cancer cells from a phage-displayed peptide library. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 153–164, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10529-020-03044-3>

JONES, Kelvin M *et al.* Phage Ligands for Identification of Mesenchymal-Like Breast Cancer Cells and Cancer-Associated Fibroblasts. **Frontiers in oncology**,

[s. l.], v. 8, p. 625, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00625>

KAMIŃSKA, Marzena *et al.* Breast cancer risk factors. **Menopausal Review**, [s. l.], v. 3, p. 196–202, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.5114/pm.2015.54346>

KLYSIK, Michal *et al.* Challenges of Imaging for Cancer in Patients with Diabetes and Obesity. **Diabetes Technology & Therapeutics**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 266–274, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/dia.2014.0026>

KOBAYASHI, Daiki *et al.* Risk factors for adverse reactions from contrast agents for computed tomography. **BMC Medical Informatics and Decision Making**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 18, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1472-6947-13-18>

KUMAR, Pankaj; AGGARWAL, Rupali. An overview of triple-negative breast cancer. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, [s. l.], v. 293, n. 2, p. 247–269, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00404-015-3859-y>

LAU, Jolene L.; DUNN, Michael K. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 26, n. 10, p. 2700–2707, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.052>

LEWANDOWSKA, Anna *et al.* Environmental risk factors for cancer – review paper. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 1–7, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.26444/aaem/94299>

LI, Caroline M. *et al.* Novel Peptide Therapeutic Approaches for Cancer Treatment. **Cells**, [s. l.], v. 10, n. 11, p. 2908, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells10112908>

LI, Xiaotong *et al.* The Peptide Functionalized Inorganic Nanoparticles for Cancer-Related Bioanalytical and Biomedical Applications. **Molecules**, [s. l.], v. 26, n. 11, p. 3228, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules26113228>

LIM, Bora *et al.* Inflammatory breast cancer biology: the tumour microenvironment is key. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 18, n. 8, p. 485–499, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0010-y>

LIPPMAN, M; BOLAN, G; HUFF, K. The effects of estrogens and antiestrogens on hormone-responsive human breast cancer in long-term tissue culture. **Cancer research**, [s. l.], v. 36, n. 12, p. 4595–4601, 1976. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1000504>

LIU, Mingpeng *et al.* Peptide-Enabled Targeted Delivery Systems for Therapeutic Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 9, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.701504>

LIU, Tingting *et al.* Construction and Identification of New Molecular Markers of Triple-Negative Breast Cancer Stem Cells. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 11, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.647291>

LYNCH, Patrick J. **Breast anatomy normal scheme**. [S. l.], 2006. Disponível em: https://pt.m.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Breast_anatomy_normal_scheme.png.

MAHDAVI, Morteza *et al.* Hereditary breast cancer; Genetic penetrance and current status with BRCA. **Journal of Cellular Physiology**, [s. l.], v. 234, n. 5, p. 5741–5750, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcp.27464>

MAJUMDAR, Sumit; SIAHAAN, Teruna J. Peptide-mediated targeted drug delivery. **Medicinal Research Reviews**, [s. l.], v. 32, n. 3, p. 637–658, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/med.20225>

MANORE, Sara G. *et al.* IL-6/JAK/STAT3 Signaling in Breast Cancer Metastasis: Biology and Treatment. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 12, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.866014>

MAROTTI, Jonathan D. *et al.* Triple-Negative Breast Cancer. **The American Journal of Pathology**, [s. l.], v. 187, n. 10, p. 2133–2138, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.05.018>

MARTINS, Ivana *et al.* Liquid Biopsies: Applications for Cancer Diagnosis and Monitoring. **Genes**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 349, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/genes12030349>

MASJEDI, Ali *et al.* The significant role of interleukin-6 and its signaling pathway in the immunopathogenesis and treatment of breast cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 108, p. 1415–1424, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.177>

MCDONALD, Elizabeth S. *et al.* Clinical Diagnosis and Management of Breast Cancer. **Journal of Nuclear Medicine**, [s. l.], v. 57, n. Supplement 1, p. 9S-16S, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.157834>

MOMENIMOVAHED, Zohre; SALEHINIYA, Hamid. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, [s. l.], v. Volume 11, p. 151–164, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/BCTT.S176070>

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, [s. l.], v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

NASCIMENTO, Renan Gomes do; OTONI, Kaléu Mormino. Histological and molecular classification of breast cancer: what do we know? **Mastology**, [s. l.], v. 30, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.29289/25945394202020200024>

NIXON, A E; SEXTON, D J; LADNER, R C. Drugs derived from phage display: from candidate identification to clinical practice. **MAbs**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 73–85, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/mabs.27240>

OMIDFAR, Kobra; DANESHPOUR, Maryam. Advances in phage display

technology for drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 651–669, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1037738>

OSBORNE, C Kent; SCHIFF, Rachel. Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. **Annual review of medicine**, [s. l.], v. 62, p. 233–247, 2011.

PASQUALINI, R; RUOSLAHTI, E. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. **Nature**, [s. l.], v. 380, n. 6572, p. 364–366, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/380364a0>

PATRA, Jayanta Kumar *et al.* Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. **Journal of Nanobiotechnology**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 71, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>

PENG, Li *et al.* Phage Display-Derived Peptide-Based Dual-Modality Imaging Probe for Bladder Cancer Diagnosis and Resection Postinstillation: A Preclinical Study. **Molecular Cancer Therapeutics**, [s. l.], v. 17, n. 10, p. 2100–2111, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-18-0212>

PEROU, Charles M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, [s. l.], v. 406, n. 6797, p. 747–752, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/35021093>

PETRENKO, Valery. Landscape Phage: Evolution from Phage Display to Nanobiotechnology. **Viruses**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 311, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/v10060311>

PINHEIRO, P. **Ressonância Magnética–riscos, contraindicações e vantagens**. [S. l.], 2018. Disponível em: <https://www.mdsaude.com/2014/10/ressonanciamagnetica.html>.

POON, Wilson *et al.* Targeting B16 tumors in vivo with peptide-conjugated gold nanoparticles. **Nanotechnology**, [s. l.], v. 26, n. 28, p. 285101, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/0957-4484/26/28/285101>

RAHBARNIA, Leila *et al.* Evolution of phage display technology: from discovery to application. **Journal of Drug Targeting**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 216–224, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/1061186X.2016.1258570>

RAHMAN, Mohammad Shafiur; SURESH, Sithara; WALY, Mostafa I. Risk Factors for Cancer: Genetic and Environment. *In*: BIOACTIVE COMPONENTS, DIET AND MEDICAL TREATMENT IN CANCER PREVENTION. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 1–23. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-319-75693-6_1

RAI, V.; ROY, P. MOLECULAR DIAGNOSIS OF CANCER. **BioEvolution**, [s. l.], p. 12–19, 2014.

RANI, Aradhana *et al.* Endocrine Resistance in Hormone Receptor Positive Breast Cancer–From Mechanism to Therapy. **Frontiers in endocrinology**, [s. l.], v. 10,

2019.

RAVI, Maddaly; SNEKA, M.Kaviya; JOSHIPURA, Aastha. The culture conditions and outputs from breast cancer cell line in vitro experiments. **Experimental Cell Research**, [s. l.], v. 383, n. 2, p. 111548, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.111548>

REED, Amy E McCart *et al.* Invasive lobular carcinoma of the breast: morphology, biomarkers and 'omics. **Breast Cancer Research**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 12, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13058-015-0519-x>

ROCCA, Andrea *et al.* Efficacy of endocrine therapy in relation to progesterone receptor and Ki67 expression in advanced breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, [s. l.], v. 152, n. 1, p. 57–65, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10549-015-3423-2>

ROMOND, Edward H *et al.* Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 353, n. 16, p. 1673–1684, 2005.

ROY, P S; SAIKIA, B J. Cancer and cure: A critical analysis. **Indian journal of cancer**, [s. l.], v. 53, n. 3, p. 441–442, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/0019-509X.200658>

SAHIN, Deniz *et al.* Screening and Identification of Peptides Specifically Targeted to Gastric Cancer Cells from a Phage Display Peptide Library. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 927–932, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.22034/APJCP.2018.19.4.927>

SALES-DIAS, Joana *et al.* Development of antibodies against the notch ligand Delta-Like-1 by phage display with activity against breast cancer cells. **New Biotechnology**, [s. l.], v. 64, p. 17–26, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2021.05.003>

SANTANA DOS SANTOS, Elizabeth *et al.* Non-Coding Variants in BRCA1 and BRCA2 Genes: Potential Impact on Breast and Ovarian Cancer Predisposition. **Cancers**, [s. l.], v. 10, n. 11, p. 453, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers10110453>

SAW, Phei Er; SONG, Er-Wei. Phage display screening of therapeutic peptide for cancer targeting and therapy. **Protein & Cell**, [s. l.], v. 10, n. 11, p. 787–807, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13238-019-0639-7>

SCHIFFMAN, Joshua D.; FISHER, Paul G.; GIBBS, Peter. Early Detection of Cancer: Past, Present, and Future. **American Society of Clinical Oncology Educational Book**, [s. l.], n. 35, p. 57–65, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.14694/EdBook_AM.2015.35.57

SEREDYNSKI, A. L. *et al.* Estrogen Receptor Activation Rapidly Modulates Male Sexual Motivation through the Transactivation of Metabotropic Glutamate Receptor 1a. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 35, n. 38, p. 13110–13123,

2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2056-15.2015>

SHENG, Yuan; YOU, Yiwen; CHEN, Yun. Dual-targeting hybrid peptide-conjugated doxorubicin for drug resistance reversal in breast cancer. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 512, n. 1, p. 1–13, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.08.016>

SHIOVITZ, S.; KORDE, L.A. Genetics of breast cancer: a topic in evolution. **Annals of Oncology**, [s. l.], v. 26, n. 7, p. 1291–1299, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv022>

SIEGEL, Rebecca L. *et al.* Cancer statistics, 2022. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], v. 72, n. 1, p. 7–33, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3322/caac.21708>

SILVA, Adriane. **IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS LIGANTES A PROTEÍNAS DE CÉLULAS TUMORAIS MAMÁRIAS**. 71 f. 2017. - Universidade Federal de Uberlândia, [s. l.], 2017.

SINGH, H. Biopsy- A vision of life. **International Journal of Contemporary Medical Research**, [s. l.], v. 3, n. 6, 2016.

SIOUD, Mouldy. Phage Display Libraries: From Binders to Targeted Drug Delivery and Human Therapeutics. **Molecular Biotechnology**, [s. l.], v. 61, n. 4, p. 286–303, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12033-019-00156-8>

SLIWKOWSKI, M X; MELLMAN, I. Antibody therapeutics in cancer. **science**, [s. l.], v. 341, n. 6151, p. 1192–1198, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1241145>

SMITH, George P. Filamentous Fusion Phage: Novel Expression Vectors That Display Cloned Antigens on the Virion Surface. **Science**, [s. l.], v. 228, n. 4705, p. 1315–1317, 1985. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.4001944>

SMITH, Shari E. *et al.* Molecular characterization of breast cancer cell lines through multiple omic approaches. **Breast Cancer Research**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 65, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13058-017-0855-0>

SOENDERGAARD, Mette; NEWTON-NORTHUP, Jessica R; DEUTSCHER, Susan L. In vivo phage display selection of an ovarian cancer targeting peptide for SPECT/CT imaging. **American journal of nuclear medicine and molecular imaging**, [s. l.], v. 4, n. 6, p. 561–570, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25250205>

SUBHAN, Md Abdus *et al.* Recent Advances in Tumor Targeting via EPR Effect for Cancer Treatment. **Journal of Personalized Medicine**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 571, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jpm11060571>

SUNDIN, Anders; WILLS, Mark; ROCKALL, Andrea. Radiological Imaging: Computed Tomography, Magnetic Resonance Imaging and Ultrasonography. *In: [S. l.: s. n.], [s. d.]. p. 58–72. Disponível em: https://doi.org/10.1159/000382056*

SUNG, Hyuna *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

TAN, Yuyu *et al.* Advance in phage display technology for bioanalysis. **Biotechnology Journal**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 732–745, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/biot.201500458>

THUNDIMADATHIL, J. Cancer treatment using peptides: current therapies and future prospects. **J Amino Acids**, [s. l.], v. 2012, p. 967347, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2012/967347>

TREMONT, A; LU, J; COLE, J T. Endocrine Therapy for Early Breast Cancer: Updated Review. **Ochsner J**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 405–411, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29230126>

TREVETHAN, Robert. Sensitivity, Specificity, and Predictive Values: Foundations, Plausibilities, and Pitfalls in Research and Practice. **Frontiers in Public Health**, [s. l.], v. 5, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00307>

TYANOVA, Stefka *et al.* Proteomic maps of breast cancer subtypes. **Nature Communications**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 10259, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncomms10259>

TYSNES, B; BJERKVIG, R. Cancer initiation and progression: Involvement of stem cells and the microenvironment. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, [s. l.], v. 1775, n. 2, p. 283–297, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2007.01.001>

UICC. **TNM. Classificação de Tumores Malignos**. 6. ed. [S. l.: s. n.], 2004.

UNTCH*, Michael *et al.* 13th St. Gallen International Breast Cancer Conference 2013: Primary Therapy of Early Breast Cancer Evidence, Controversies, Consensus - Opinion of a German Team of Experts (Zurich 2013). **Breast Care**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 1–1, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000351692>

VULCZAK, A. **Exercício físico aeróbico de intensidade moderada reduz a velocidade de crescimento e modula o metabolismo energético tumoral em modelo experimental de câncer de mama triplo-negativo**. 95 f. 2018. [s. l.], 2018.

VUONG, Darina *et al.* Molecular classification of breast cancer. **Virchows Archiv**, [s. l.], v. 465, n. 1, p. 1–14, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00428-014-1593-7>

WADA, Akinori *et al.* Efficient Prostate Cancer Therapy with Tissue-Specific Homing Peptides Identified by Advanced Phage Display Technology. **Molecular Therapy - Oncolytics**, [s. l.], v. 12, p. 138–146, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.omto.2019.01.001>

WANG, LEDAN *et al.* Identification of a peptide specifically targeting ovarian cancer by the screening of a phage display peptide library. **Oncology Letters**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 4022–4026, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4549>

WANG, Lei *et al.* Therapeutic peptides: current applications and future directions. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 48, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00904-4>

WANG, Sheng-Hung; YU, John. Structure-based design for binding peptides in anti-cancer therapy. **Biomaterials**, [s. l.], v. 156, p. 1–15, 2018.

WCRF. **Breast cancer statistics**. [S. l.], 2021. Disponível em: <https://www.wcrf.org/dietandcancer/breast-cancer-statistics/>.

WEIGELT, Britta; GEYER, Felipe C.; REIS-FILHO, Jorge S. Histological types of breast cancer: How special are they? **Molecular Oncology**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 192–208, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.04.004>

WELCH, H. G.; BLACK, W. C. Overdiagnosis in Cancer. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, [s. l.], v. 102, n. 9, p. 605–613, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jnci/djq099>

WEN, Hannah Y.; BROGI, Edi. Lobular Carcinoma In Situ. **Surgical Pathology Clinics**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 123–145, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.path.2017.09.009>

WEN, Jianxin; YUAN, Kunpeng. Phage Display Technology, Phage Display System, Antibody Library, Prospects and Challenges. **Advances in Microbiology**, [s. l.], v. 11, n. 03, p. 181–189, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.4236/aim.2021.113013>

WHITEMAN, David C.; WILSON, Louise F. The fractions of cancer attributable to modifiable factors: A global review. **Cancer Epidemiology**, [s. l.], v. 44, p. 203–221, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.canep.2016.06.013>

WHO. **Cancer**. [S. l.], 2018. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.

WOLFF, Antonio C.; TUNG, Nadine M.; CAREY, Lisa A. Implications of Neoadjuvant Therapy in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Positive Breast Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 37, n. 25, p. 2189–2192, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1200/JCO.19.01159>

WU, Jun. The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect: The Significance of the Concept and Methods to Enhance Its Application. **Journal of Personalized Medicine**, [s. l.], v. 11, n. 8, p. 771, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jpm11080771>

WU, Song *et al.* Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. **Nature Communications**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 3490, 2018. Disponível em:

<https://doi.org/10.1038/s41467-018-05467-z>

XIONG, Xiao-Bing *et al.* Intracellular delivery of doxorubicin with RGD-modified sterically stabilized liposomes for an improved antitumor efficacy: In vitro and in vivo. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 94, n. 8, p. 1782–1793, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jps.20397>

YAN, Jiayao *et al.* Identification of a Glypican-3 Binding Peptide From a Phage-Displayed Peptide Library for PET Imaging of Hepatocellular Carcinoma. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 11, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.679336>

YU, Xiaoxiao *et al.* Identification of a peptide binding to cancer antigen Kita-kyushu lung cancer antigen 1 from a phage-display library. **Cancer Science**, [s. l.], v. 112, n. 10, p. 4335–4345, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/cas.15109>

ZHANG, Zhe-Feng *et al.* Screening and selection of peptides specific for esophageal cancer cells from a phage display peptide library. **Journal of Cardiothoracic Surgery**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 76, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1749-8090-9-76>

ZHAO, Hengqiang. The prognosis of invasive ductal carcinoma, lobular carcinoma and mixed ductal and lobular carcinoma according to molecular subtypes of the breast. **Breast Cancer**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 187–195, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12282-020-01146-4>

ZHOU, Yin *et al.* Diagnosis of cancer as an emergency: a critical review of current evidence. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 45–56, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.155>