



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA**



Ana Carolini Almeida Marcarini

**Aprimoramento de sequências peptídicas com potencial biomarcador e
antitumoral atuantes no câncer de mama através de análises *in silico***

Ouro Preto – MG

2025

Ana Carolini Almeida Marcarini

Aprimoramento de sequências peptídicas com potencial biomarcador e antitumoral atuantes no câncer de mama através de análises *in silico*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dra. Karina Taciana Santos Rubio.

Coorientador: Mestre Isabella Fagundes Gurgel

Ouro Preto – MG

2025

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

M313a Marcarini, Ana Carolini Almeida.

Aprimoramento de sequências peptídicas com potencial biomarcador e antitumoral atuantes no câncer de mama através de análises in silico. [manuscrito] / Ana Carolini Almeida Marcarini. - 2025.

78 f.: il.: color., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Karina Taciana Santos Rubio.

Coorientadora: Ma. Isabella Fagundes Gurgel.

Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Mamas - Câncer. 2. Peptídeos. 3. Simulação de Acoplamento Molecular. 4. Bioinformática. I. Rubio, Karina Taciana Santos. II. Gurgel, Isabella Fagundes. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 615:577.1

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - CRB6/2322



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
ESCOLA DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Carolini Almeida Marcarini

Aprimoramento de sequências peptídicas com potencial biomarcador e antitumoral atuantes no câncer de mama através de análises *in silico*

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Farmácia

Aprovada em 17 de dezembro de 2025

Membros da banca

Dr^a - Karina Taciana Santos Rubio - Orientadora - Universidade Federal de Ouro Preto
Msc. - Isabella Fagundes Gurgel - Universidade Federal de Ouro Preto
Msc. - Sayonara Quaresma Alves Campos - Universidade Federal de Ouro Preto
Msc. - Carlos Marchioro Lacerda - Universidade Federal de Ouro Preto

Karina Taciana Santos Rubio, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 19/08/2026



Documento assinado eletronicamente por **Karina Taciana Santos Rubio, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 31/08/2026, às 08:32, 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 http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1168937** e o código CRC **A31CEEFE**.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Adriana e Everaldo, por todo amor, apoio e pelos valores que me guiaram até aqui.

À minha irmã, Thamires, por ser minha companheira e refúgio.

Ao meu amor, João Vitor, pelo carinho e incentivo.

À minha orientadora, Prof.^a Dra. Karina, por toda orientação e ensinamentos ao longo deste projeto.

À minha coorientadora, Isabella, pela parceria e aprendizados compartilhados neste tempo.

À Deus, por me proporcionar tantas pessoas e realizações incríveis nesta minha caminhada.

RESUMO

O câncer de mama é uma das principais causas de mortalidade entre mulheres, caracterizando-se pelo crescimento desordenado de células mamárias resultante de mutações genéticas. Embora abordagens terapêuticas convencionais, como cirurgia, quimioterapia, radioterapia e hormonioterapia, sejam amplamente empregadas, seus efeitos colaterais e baixa seletividade ainda representam desafios clínicos importantes. Nesse contexto, o presente estudo teve como propósito investigar o potencial terapêutico de peptídeos com propriedades antitumorais, visando ao desenvolvimento de alternativas mais seguras e eficazes no tratamento do câncer de mama. Foram selecionadas nove sequências peptídicas previamente identificadas com possível aplicação terapêutica, que passaram por modificações estruturais e análises computacionais utilizando ferramentas de predição de atividade antitumoral e imunogenicidade. As sequências com melhores resultados foram submetidas a estudos de *docking* molecular, permitindo avaliar a afinidade e a estabilidade das interações entre os peptídeos e proteínas-alvo associadas à carcinogênese mamária. Os complexos que apresentaram maior estabilidade e interação favorável indicaram que o aprimoramento das sequências contribuiu para o aumento de seu potencial antitumoral. As sequências selecionadas foram então sintetizadas em fase sólida e caracterizadas por espectrometria de massas, etapa que antecede os testes de citotoxicidade *in vitro*. Os resultados obtidos reforçam a aplicabilidade dos peptídeos como agentes terapêuticos promissores e destacam a importância das análises *in silico* como ferramenta estratégica no desenvolvimento de novas terapias direcionadas contra o câncer de mama.

Palavras-chave: câncer de mama; peptídeos; *docking* molecular; análises *in silico*; terapias antitumorais.

ABSTRACT

Breast cancer is one of the leading causes of mortality among women and is characterized by the uncontrolled proliferation of mammary cells resulting from genetic mutations. Although conventional therapeutic approaches—such as surgery, chemotherapy, radiotherapy, and hormone therapy—remain widely used, their adverse effects and lack of selectivity continue to pose significant clinical challenges. In this context, the present study aimed to investigate the therapeutic potential of peptides with antitumor properties, seeking to develop safer and more effective alternatives for breast cancer treatment. Nine peptide sequences previously identified as potential therapeutic candidates were selected, structurally modified, and analyzed through computational prediction tools to assess their antitumor activity and immunogenicity. The most promising sequences were subjected to molecular docking studies to evaluate the affinity and stability of interactions between the peptides and target proteins associated with breast carcinogenesis. The resulting complexes demonstrated that structural optimization enhanced binding stability and interaction energy, indicating improved therapeutic potential. The selected sequences were then synthesized via solid-phase peptide synthesis and characterized by mass spectrometry, preceding future *in vitro* cytotoxicity assays. Overall, the findings reinforce the potential of peptides as promising therapeutic agents and highlight the relevance of *in silico* analyses as a strategic tool in the design of novel targeted therapies for breast cancer.

Keywords: breast cancer; peptides; molecular docking; *in silico* analysis; antitumor therapies.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Etapas da síntese de peptídeos por fase sólida utilizando a estratégia Fmoc.....32

Figura 2 - Estrutura ANXA5-CLIINNKNF (complexo proteína alvo - peptídeo original). À direita o complexo inteiro com as superfícies moleculares com a estrutura da proteína em azul do peptídeo em verde, e à esquerda uma aproximação da região de interação com destaque para as cadeias laterais mais próximas entre as moléculas.....38

Figura 3 - Ligação dos peptídeos selecionados CLWINNKNF (A), CLIWNNKNF (B) e CLIIWNKNF (C) à proteína alvo ANXA5. À esquerda o complexo inteiro com as superfícies moleculares com a estrutura da proteína em azul e do peptídeo em verde, e à direita uma aproximação da região de interação com destaque para as cadeias laterais mais próximas entre as moléculas.....39

Figura 4 - Estrutura AXL-MEPWRQCAQW (complexo proteína alvo - peptídeo original). À direita o complexo inteiro com as superfícies moleculares com a estrutura da proteína em azul e do peptídeo em verde, e à esquerda uma aproximação da região de interação com destaque para as cadeias laterais mais próximas entre as moléculas.....42

Figura 5 - Ligação dos peptídeos selecionados MFPWRQCAQW (A), MEPWRQYAQW (B), YEPWRQCAQW (C), MEPWRQCFQW (D), MEPWRQCYQW (E) à proteína alvo AXL. À esquerda o complexo inteiro com as superfícies moleculares com a estrutura da proteína em azul e do peptídeo em verde, e à direita uma aproximação da região de interação com destaque para as cadeias laterais mais próximas entre as moléculas.....44

Figura 6 - Estrutura GSDMD-RTRLALIICN (complexo proteína alvo - peptídeo original). À direita o complexo inteiro com as superfícies moleculares com a estrutura da proteína em azul do peptídeo em verde, e à esquerda uma aproximação da região de interação com destaque para as cadeias laterais mais próximas entre as moléculas.....49

Figura 7 - Ligação dos peptídeos selecionados RTRLALIICG (A), RTRGALIICN (B), RTRHALIICN (C), RTRWALIICN (D) à proteína alvo GSDMD. À esquerda o complexo inteiro com as superfícies moleculares com a estrutura da proteína em azul e do peptídeo em verde, e à direita uma aproximação da região de interação com destaque para as cadeias laterais mais próximas entre as moléculas.....50

Figura 8 - Estrutura IGF1R-RVCGDRGFCF (complexo proteína alvo – peptídeo original). À direita o complexo inteiro com as superfícies moleculares com a estrutura da proteína em azul do peptídeo em verde, e à esquerda uma aproximação da região de interação com destaque para as cadeias laterais mais próximas entre as moléculas.....53

Figura 9 - Ligação dos peptídeos selecionados RVCGDRGFCF (A), RVCGDRGFFC (B), CVCGDRGFFF (C), à proteína alvo IGF1R. À esquerda o complexo inteiro com as superfícies moleculares com a estrutura da proteína em azul e do peptídeo em verde, e à direita uma aproximação da região de interação com destaque para as cadeias laterais mais próximas entre as moléculas.....54

Figura 10 - Ligação dos peptídeos selecionados TCAYYRGAVG (A), TSAYYRGCVG (B), CSAYYRGAVG (C), à proteína alvo RAB5A. À esquerda o complexo inteiro com as superfícies moleculares com a estrutura da proteína em azul e do peptídeo em verde, e à direita uma aproximação da região de interação com destaque para as cadeias laterais mais próximas entre as moléculas.....57

Figura 11 - RMSD dos peptídeos ancorados às respectivas proteínas alvo.....62

Figura 12 - RMSD dos complexos proteína alvo - peptídeo.....63

Figura 13 - Espectro de massas dos peptídeos analisados no LC-MS-MS, destacando os picos correspondentes às massas de cada peptídeo sintetizado. O peptídeo 1 corresponde ao MEPWRQYAQW, o peptídeo 2 ao YEPWRQCAQW, o peptídeo 3 ao RVCGDRGFFC, e o peptídeo 4 ao RTRLALIICG.....64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos subtipos moleculares do câncer de mama de acordo com a expressão dos receptores hormonais e comportamento clínico.....	20
Tabela 2 - Síntese das etapas metodológicas empregadas na seleção, avaliação e caracterização dos peptídeos.....	33
Tabela 3 - Sequências peptídicas analisadas nos softwares AntiCP e Vaxijen com seus respectivos valores de <i>score</i> . Em cinza, são destacadas apenas as sequências que demonstraram os melhores scores em ambos os softwares. Em negrito estão os peptídeos originais e seus valores de <i>score</i> para os softwares AntiCP e Vaxijen.....	34
Tabela 4. Distâncias entre os aminoácidos da proteína alvo ANXA5 e de resíduos de peptídeos que se apresentaram menores que 4 Å.....	40
Tabela 5. Ligações de hidrogênio observadas entre aminoácidos da proteína ANXA5 e dos aminoácidos dos peptídeos CLIWNNKNF e CLIWNKNF com seus respectivos comprimentos.....	41
Tabela 6 - Distâncias entre os aminoácidos da proteína alvo AXL e peptídeos que se apresentaram menores que 4 Å.....	45
Tabela 7 - Ligações de hidrogênio observadas entre aminoácidos da proteína AXL e dos peptídeos MFPWRQCAQW, MEPWRQYAQW, MEPWRQCFQW, MEPWRQCYQW com seus respectivos comprimentos.....	48
Tabela 8 - Distâncias entre os aminoácidos da proteína alvo GSDMD e peptídeos que se apresentaram menores que 4 Å.....	51
Tabela 9 - Ligações de hidrogênio observadas entre aminoácidos da proteína GSDMD e os peptídeos RTRLALIICG e RTRGALIICN com seus respectivos comprimentos.....	52
Tabela 10 - Distâncias entre os aminoácidos da proteína alvo IGF1R e peptídeos que se apresentaram menores que 4 Å.....	55
Tabela 11 - Ligações de hidrogênio observadas entre aminoácidos da proteína IGF1R e os peptídeos RVCGDRGFCF, RVCGDRGFFC e CVCGDRGFFF com seus respectivos comprimentos.....	56
Tabela 12 - Distâncias entre os aminoácidos da proteína alvo RAB5A e peptídeos que se apresentaram menores que 4 Å.....	58

Tabela 13 - Ligações de hidrogênio observadas entre aminoácidos da proteína RAB5A e os peptídeos TCAYYRGAVG, TSAYYRGCVG e CSAYYRGAVG com seus respectivos comprimentos.....	59
Tabela 14 - Resultados de energia relacionados à estabilização dos complexos proteína alvo - peptídeo originais (em negrito) e modificados (texto normal) fornecidos pelo <i>software</i> Firedock.....	60
Tabela 15 - Preparo e solubilização das sequências peptídicas para posterior caracterização.....	63
Tabela 16 - Sequências peptídicas e suas respectivas purezas.....	65
Tabela 17 - Representação da estrutura linear e estrutura secundária 3D do peptídeo original e dos peptídeos derivados da linhagem MCF-7, obtida pelos <i>softwares</i> ferramentas Pepdraw e PEP-FOLD4, respectivamente. Em cinza destacado o aminoácido alterado em comparação ao do peptídeo original.....	66
Tabela 18 - Representação da estrutura linear e estrutura secundária 3D dos peptídeo original e do peptídeo derivado da linhagem MDA-MB-231, obtida pelos <i>softwares</i> ferramentas Pepdraw e PEP-FOLD4, respectivamente. Em cinza destacado o aminoácido alterado em comparação ao do peptídeo original.....	66
Tabela 19 - Representação da estrutura linear e estrutura secundária 3D do peptídeo original e do peptídeo derivado da linhagem MDA-MB-231, obtida pelos <i>softwares</i> ferramentas Pepdraw e PEP-FOLD4, respectivamente. Em cinza destacado o aminoácido alterado em comparação ao do peptídeo original.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DCM	Diclorometano
DIPC	Diisopropilcarbodiimida
DM	Dinâmica Molecular
DMF	Dimetilformamida
HB	Ligação de Hidrogênio
HDACs	Histona Desacetilases
HER2	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LCMS-IT-TOF	<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Ion-Trap Time-of-Flight</i> (Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas com Armadilha Iônica e Tempo de Voo)
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PME	<i>Particle Mesh Ewald</i>
RE	Receptor de Estrogênio
RP	Receptor de Progesterona
SBRT	<i>Stereotactic Body Radiation Therapy</i> (Radioterapia Corporal Estereotáxica)
SVM	<i>Support Vector Machine</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TFA	Ácido Trifluoroacético
TILs	<i>Tumor-Infiltrating Lymphocytes</i> (Linfócitos Infiltrantes de Tumor)
TNBC	<i>Triple-Negative Breast Cancer</i> (Câncer de Mama Triplo-Negativo)

Aminoácido	Símbolo	Abreviação
Alanina	A	Ala
Arginina	R	Arg
Asparagina	N	Asn
Ácido aspártico	D	Asp
Cisteína	C	Cys
Glutamina	Q	Gln
Ácido glutâmico	E	Glu
Fenilalanina	F	Phe
Glicina	G	Gly
Histidina	H	His
Isoleucina	I	Ile
Leucina	L	Leu
Lisina	K	Lys
Metionina	M	Met
Metionina	M	Met
Prolina	P	Pro
Serina	S	Ser
Treonina	T	Thr
Triptofano	W	Trp
Tirosina	Y	Tyr
Valina	V	Val

SUMÁRIO

I.	INTRODUÇÃO	16
II.	OBJETIVOS.....	18
	2.1. Objetivo Geral	18
	2.2. Objetivos Específicos.....	18
III.	REVISÃO DE LITERATURA	19
	3.1. Câncer de mama	19
	3.2. Alterações moleculares no câncer	20
	3.2.1. <i>Oncogenes</i>	20
	3.2.2. <i>Genes supressores de tumor</i>	21
	3.2.3. <i>Genes de reparo de DNA</i>	21
	3.2.4. <i>Modificações de Histonas</i>	21
	3.2.5. <i>Proteínas de Membrana</i>	21
	3.3. Tratamentos Convencionais.....	22
	3.3.1. <i>Quimioterapia</i>	22
	3.3.2. <i>Radioterapia</i>	23
	3.3.3. <i>Cirurgia</i>	23
	3.3.4. <i>Imunoterapia</i>	23
	3.3.5. <i>Hormonioterapia</i>	24
	3.4. Novos tratamentos para o câncer de mama	24
	3.4.1. <i>Vacinas</i>	24
	3.4.2. <i>Peptídeos</i>	25
	3.5. Uso de ferramentas <i>in silico</i> no câncer	26
IV.	METODOLOGIA	28
	4.1. Seleção de modificações de sequências primárias	28
	4.2. Avaliação do potencial imunogênico	28
	4.3. Docking molecular.....	29
	4.4. Dinâmica molecular	29
	4.5. Síntese de peptídeos em fase sólida	31

4.6. Caracterização dos peptídeos por espectrometria de massas.....	32
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1. Seleção de modificações de sequências primárias e avaliação do potencial imunogênico	34
5.2. <i>Docking</i> molecular	36
5.3. Dinâmica molecular	61
5.4. Síntese e caracterização de peptídeos	63
VI. CONCLUSÃO	70
VII. PERSPECTIVAS	71
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

I. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é uma doença causada pelo crescimento exacerbado de células da mama, que ocorre devido a mutações no DNA da célula normal. Essas mutações podem ocorrer por diferentes fatores como hereditariedade, idade, histórico reprodutivo e uso de contraceptivos orais. Além disso, o estilo de vida do indivíduo pode influenciar no surgimento da doença, principalmente práticas como o tabagismo, o alcoolismo e o sedentarismo (Veloso *et al.*, 2024).

No Brasil, o câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais incidente em mulheres em todas as regiões do país, estimando-se 73.610 novos casos no ano de 2023, segundo o Instituto Nacional do Câncer - INCA. Aliado a isso, esse tipo de câncer apresenta uma das maiores taxas de mortalidade em mulheres, com 18.139 óbitos na população feminina em 2021. Em escala global, a doença também apresenta índices elevados de mortalidade em mulheres, alcançando a marca de 11,71 óbitos por 100.000 mulheres, em 2021 (BRASIL, I.N.D.C.I.-. 2023).

Tratamentos locais, que englobam a cirurgia e a radioterapia, e tratamentos sistêmicos, como a quimioterapia e a hormonioterapia, têm como objetivo impedir a progressão da doença. Tais tratamentos são escolhidos levando em consideração fatores como o estágio de progressão da doença, condições clínicas gerais e de saúde do paciente. No entanto, embora contribuam para a sobrevida dos pacientes, muitas dessas terapias convencionais apresentam baixa seletividade no organismo, afetando, além das células tumorais, tecidos saudáveis do indivíduo em tratamento (Waks; Winer, 2019).

Os efeitos colaterais provocados pelos tratamentos convencionais podem ser diversos dependendo da terapia escolhida. No caso dos tratamentos locais, como a radioterapia, os efeitos mais apontados pelos pacientes são a perda de cabelo, enjoos, vômitos e feridas na pele. Em relação aos tratamentos sistêmicos, os efeitos mais relatados são fadiga, perda de peso, diarreia e dor abdominal (Kameo, S. *et al.*, 2021). Considerando os efeitos mencionados e o desconforto destes para os pacientes, faz-se necessária a busca por novas terapias para o tratamento do câncer de mama.

Nesse sentido, os peptídeos podem ser uma alternativa para o tratamento da doença. Além de serem capazes de atingir receptores diferencialmente expressos nas células tumorais, eles apresentam como vantagens o fato de serem moléculas simples e com baixo custo de síntese. Aliado a isso, a investigação sobre as aplicações dos peptídeos no tratamento do câncer tem demonstrado progresso ao longo dos anos,

principalmente na produção de vacinas, o que reforça o caráter promissor desses compostos na terapia antitumoral (Huang *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2022).

Desse modo, considerando a aplicabilidade desses compostos e a necessidade de terapias que sejam menos danosas ao paciente, este estudo visou aprimorar sequências peptídicas pré-selecionadas em trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa. Através de análises *in silico*, sequências que apresentaram capacidade de interação com proteínas superexpressas em duas linhagens tumorais de mama, MDA-MB-231 e MCF-7, foram avaliadas quanto ao potencial antitumoral.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Aprimorar, a partir de sequências identificadas em projeto anterior, sequências peptídicas capazes de interferir no crescimento de células tumorais de linhagens mamárias ou ainda servirem como biomarcadores para diagnóstico da doença.

2.2. Objetivos Específicos

- Modificar as sequências peptídicas selecionadas em projeto anterior através da utilização de *softwares* de predição de atividade antitumoral e potencial imunogênico.
- Determinar os possíveis mecanismos de ação a partir da avaliação da predição de interação entre os peptídeos modificados e as proteínas alvo de membrana celular.

III. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Câncer de mama

O câncer de mama é uma doença altamente heterogênea, que apresenta variações significativas em seus tipos histológicos, comportamento clínico e resposta aos tratamentos disponíveis (Guo *et al.*, 2023). No Brasil, a estimativa para o triênio de 2023 a 2025 é de 73.610 novos casos da doença. O número é superior ao projetado para o triênio de 2020 a 2022, que era de 66.280 casos (BRASIL, I.N.D.C.I.-. 2023). Nos últimos 15 anos, ocorreram avanços expressivos no entendimento e no manejo do câncer de mama, em especial com o desenvolvimento de terapias direcionadas para subgrupos específicos da doença. Esses tratamentos têm sido especialmente eficazes em cânceres de mama que expressam receptores hormonais, como o receptor de estrogênio (RE) e o receptor de progesterona (RP), além de tumores positivos para o receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) (Derakhshan; Reis-Filho, 2022).

No início dos anos 2000, o termo câncer de mama triplo-negativo (TNBC) foi introduzido para descrever um subtipo específico e extremamente agressivo da doença que não expressa os receptores RE (Receptor de Estrogênio), RP (Receptor de Progesterona) e HER2 (Receptor para proteína HER2). Esta classificação destacou o TNBC como um subgrupo único, com resposta ao tratamento e prognóstico distintos dos outros subtipos. Os avanços na caracterização molecular dos tumores de mama têm sido fundamentais para orientar estratégias terapêuticas mais precisas e eficazes (Xiong *et al.*, 2024).

Na prática clínica, a classificação dos subtipos intrínsecos do carcinoma de mama é amplamente adotada. Tumores de mama que expressam receptores de estrogênio ou progesterona são classificados como luminal A ou luminal B, com ou sem expressão do receptor HER2. O subtipo luminal A, caracterizado por alta expressão de ER, apresenta um prognóstico mais favorável em comparação com o subtipo luminal B (Fernández-Tortolero; Reigosa-Yániz, 2021). A Tabela 1 apresenta as principais características desses subtipos, incluindo o perfil de receptores e o comportamento clínico associado.

Tabela 1- Características dos subtipos moleculares do câncer de mama de acordo com a expressão dos receptores hormonais e comportamento clínico.

Subtipo	Características Principais	Receptores	Comportamento Clínico
Luminal A	Crescimento mais lento, baixa proliferação	RE+, RP+, HER2–	Menos agressivo
Luminal B	Maior proliferação que Luminal A	RE+, RP±, HER2±	Moderadamente agressivo
HER2-Enriquecido	Alta expressão de HER2	HER2+, RE–, RP–	Agressivo, rápido crescimento
Triplo Negativo (TNBC)	Ausência de receptores hormonais	RE–, RP–, HER2–	Altamente agressivo, comum em mulheres jovens

3.2. Alterações moleculares no câncer

O câncer é uma doença caracterizada por um conjunto de alterações celulares e moleculares que promovem o crescimento descontrolado e a disseminação de células malignas. Essas alterações moleculares são fundamentais tanto para a iniciação quanto para a progressão do câncer, envolvendo uma série de mutações genéticas, modificações epigenéticas, alterações no metabolismo celular, disfunções na comunicação celular e evasão dos mecanismos de defesa do organismo. Com os avanços tecnológicos e as novas abordagens de sequenciamento de genomas e transcriptomas, a compreensão das alterações moleculares no câncer tem se expandido, trazendo novos *insights* sobre os mecanismos patológicos e abrindo caminhos para terapias mais direcionadas e personalizadas (Chaube; Malvi, 2023; Matter; Gkretsi, 2023).

3.2.1. Oncogenes

Os oncogenes são genes que, quando ativados por mutações, ganham função que favorece a proliferação celular descontrolada. Um exemplo estudado de forma ampla é o HER2 (ERBB2), onde seu gene codifica um receptor de tirosina quinase da família dos receptores de fator de crescimento epidérmico. A sua ampliação ou superexpressão está relacionada a grande agressividade tumoral (Swain *et al.*, 2023). Outro exemplo é o KRAS, um oncogene mutado que aparece em alguns tipos de cânceres, incluindo câncer de pulmão, pâncreas e cólon. Nesse contexto, o termo "oncogene" refere-se sobretudo a genes como CDKN2A, cuja alteração disruptiva pode promover

crescimento descontrolado e favorecer a carcinogênese mamária, funcionando de modo similar a um oncogene convencional quando seus mecanismos de regulação são comprometidos (Wilcox *et al.*, 2023).

3.2.2. Genes supressores de tumor

Por outro lado, os genes supressores de tumor, como TP53, desempenham papéis na regulação do ciclo celular e no estímulo à apoptose. O gene TP53 codifica a proteína p53, que atua como uma sentinela contra o câncer, promovendo a morte celular programada em resposta a danos genéticos. A mutação em TP53 está associada a uma série de cânceres, incluindo os de pulmão, mama, e cólon, e sua perda contribui para a instabilidade genômica característica das células tumorais (Marei *et al.*, 2021).

3.2.3. Genes de reparo de DNA

Genes envolvidos no reparo do DNA também são frequentemente alterados no câncer. As mutações nos genes BRCA1 e BRCA2, que codificam proteínas responsáveis pela reparação de quebras de DNA por recombinação homóloga, estão associadas ao aumento do risco de câncer de mama e ovário (Cheng *et al.*, 2023).

3.2.4. Modificações de Histonas

Além das mutações genéticas, as alterações epigenéticas também podem influenciar no câncer. Tais alterações podem ser feitas através de modificações de histonas, como acetilação, metilação e fosforilação. Por exemplo, a acetilação de histonas facilita a transcrição de genes. Inibidores de histona desacetilases (HDACs) têm sido investigados como terapias potenciais em cânceres que apresentam disfunção na regulação da cromatina (Lonning *et al.*, 2022; Shi *et al.*, 2024).

3.2.5. Proteínas de Membrana

As proteínas de membrana têm papel central no desenvolvimento e progressão do câncer de mama, uma vez que estão diretamente envolvidas em processos como sinalização celular, adesão, migração e interação com o microambiente tumoral.

Alterações na sua expressão são frequentemente observadas em células neoplásicas, resultando em superexpressão de receptores de tirosina-quinase, como HER2 e AXL, ou na modulação de proteínas relacionadas ao controle da apoptose, como ANXA5 (Adam- Artigues *et al.*, 2022). Entre essas proteínas, a ANXA5 está relacionada frequentemente a estudos de câncer de mama luminal, descritas na linhagem MCF-7 (Ghasemi *et al.*, 2024). A proteína de membrana IGF1R, por outro lado, está associada a maior agressividade devido seu envolvimento em vias que favorecem a proliferação celular, característica da linhagem MDA-MB-231 (Chandran *et al.*, 2012).

Nesse contexto, o estudo de proteínas de membrana torna-se altamente relevante não apenas para compreender os mecanismos moleculares associados à agressividade tumoral, mas também para identificar potenciais biomarcadores diagnósticos e prognósticos. Além disso, essas proteínas representam alvos promissores para o desenvolvimento de novas terapias, como o uso de peptídeos antitumorais capazes de interagir de forma seletiva com essas moléculas, bloqueando sua atividade.

3.3. Tratamentos Convencionais

Os tratamentos convencionais do câncer de mama englobam uma variedade de abordagens, incluindo cirurgia, radioterapia, quimioterapia e terapia hormonal.

3.3.1. Quimioterapia

A quimioterapia continua a ser uma estratégia crucial, principalmente para cânceres de mama agressivos e muito avançados, como por exemplo o triplo-negativo, onde medicamentos como antraciclinas e taxanos combinados têm mostrado melhorar a sobrevida do paciente. A administração antes da cirurgia é comum para reduzir o tamanho do tumor e tornar a cirurgia mais eficaz (quimioterapia neoadjuvante). Estudos recentes exploram combinações de quimioterápicos com imunoterapias para aumentar a resposta em pacientes de alto risco, embora efeitos colaterais sigam sendo uma preocupação contínua (Alaluf *et al.*, 2024).

Os efeitos adversos da quimioterapia são variados e podem impactar consideravelmente a qualidade de vida dos pacientes. Entre os sintomas mais comuns estão náuseas, vômitos, fadiga, alopecia (queda de cabelo), neuropatia periférica (danos nos nervos que causam dor ou dormência) e toxicidades gastrointestinais, como diarreia e constipação. Um estudo identificou que 74,2% das pacientes em tratamento

quimioterápico para câncer de mama relataram náusea, 43,3% dor abdominal, 40,7% diarreia e 39,2% vômito (Kameo *et al.*, 2021; Pimentel *et al.*, 2024).

A taxa de sucesso da quimioterapia está intimamente relacionada ao tipo e estágio do tumor. No contexto do câncer de mama localmente avançado, a resposta patológica completa à quimioterapia neoadjuvante foi observada em 10,3% das pacientes em um estudo, indicando que fatores como idade, volume tumoral e comprometimento axilar podem influenciar os resultados (Kaya *et al.*, 2010).

3.3.2. Radioterapia

A radioterapia tem sido uma opção padrão para controlar o câncer localmente após a cirurgia. Progressos nessa terapêutica, como a Radioterapia Corporal Estereotáxica (SBRT), oferecem alta precisão no tratamento do tumor, reduzindo os danos ao tecido saudável que estão ao redor. A SBRT é especialmente favorável para pacientes com tumores localizados, permitindo doses mais altas e um tratamento mais curto, o que ajuda a colaborar para qualidade de vida dos pacientes (Bilski *et al.*, 2024). Na radioterapia é empregado o uso de radiações ionizantes, com o objetivo de eliminar as células cancerígenas do tumor ou inibir sua capacidade de se reproduzir (BRASIL, M.S.-. 2023). A perda de apetite, dificuldade de ingerir certos alimentos, cansaço e reações cutâneas são sintomas indesejados que acometem o tratamento (INCA, 2023).

3.3.3. Cirurgia

A cirurgia é um tipo de tratamento que inclui mastectomia e cirurgia conservadora da mama. Em casos de tumores menores e em estágio inicial, a cirurgia conservadora combinada com radioterapia torna-se altamente eficaz. Nos últimos anos, técnicas como a biópsia de linfonodo sentinela reduziram a necessidade de dissecação axilar completa, diminuindo complicações e promovendo a recuperação (Torras *et al.*, 2024).

3.3.4. Imunoterapia

A imunoterapia tem ganhado destaque como um campo promissor, especialmente para tipos mais agressivos, como TNBC e HER2-positivo. Novos estudos mostram que linfócitos infiltrantes de tumor (TILs, na sigla em inglês) e terapias de

inibição de pontos de controle imunológico podem oferecer benefícios. Além disso, as terapias combinadas de imunoterapia e quimioterapia têm demonstrado melhores respostas no cenário neoadjuvante e podem se tornar parte das abordagens padrão para tipos específicos de câncer de mama. No entanto, a imunoterapia ainda é limitada em alguns tipos de câncer de mama e requer mais estudos para determinar sua eficácia em longo prazo (Alaluf *et al.*, 2024).

3.3.5. Hormonioterapia

Outro tipo de tratamento é a hormonioterapia. Nela existem diferentes alvos, como inibição da aromatase, ou modulação seletiva de receptores de estrogênio, e até mesmo antagonistas dos receptores de estrogênio. Alguns possíveis efeitos colaterais incluem ondas de calor, fadiga, ganho de peso com diminuição da massa muscular e perda óssea (Rademaker *et al.*, 2025).

3.4. Novos tratamentos para o câncer de mama

O tratamento do câncer de mama tem avançado consideravelmente com a introdução de terapias inovadoras, como vacinas terapêuticas e peptídeos, que têm o potencial de melhorar a eficácia e reduzir os efeitos colaterais dos tratamentos convencionais. Estas abordagens têm o objetivo de estimular o sistema imunológico a reconhecer e eliminar as células tumorais de maneira mais eficiente e direcionada, com menos efeitos colaterais em comparação aos tratamentos convencionais, como quimioterapia e radioterapia (Liu *et al.*, 2021). Embora ainda existam desafios a serem superados, esses tratamentos emergentes têm o potencial de transformar o manejo do câncer de mama, proporcionando uma abordagem mais personalizada e eficaz.

3.4.1. Vacinas

As vacinas representam uma das abordagens mais promissoras no tratamento do câncer de mama, tendo como objetivo estimular uma resposta imune específica contra as células tumorais. Essas vacinas podem ser divididas em diferentes tipos, incluindo vacinas de DNA, RNA, peptídicas e baseadas em células dendríticas. Esse tratamento melhora a capacidade do sistema imunológico de detectar e destruir células cancerígenas, principalmente aquelas que apresentam antígenos tumorais específicos (Jou *et al.*, 2021).

Um dos tipos mais explorados de vacinas terapêuticas para o câncer de mama são aquelas baseadas em antígenos tumorais específicos. Estes antígenos, como HER2/neu, MUC1, Wilms' Tumor 1 (WT1), e NY-ESO-1, são frequentemente expressos em células tumorais e podem ser alvos de uma resposta imunológica (Coveler *et al.*, 2010).

O HER2/neu é um dos antígenos mais investigados, especialmente em pacientes com câncer de mama HER2-positivo. Vacinas que estimulam uma resposta imune contra o HER2 têm mostrado resultados promissores em ensaios clínicos. Por exemplo, a vacina NeuVax, que utiliza uma versão do peptídeo HER2, foi testada em um estudo clínico e demonstrou aumentar a resposta imune, retardando o retorno da doença em pacientes com câncer de mama HER2-positivo em estágio precoce (O'shea *et al.*, 2023).

Vacinas de DNA e RNA tem como ação a introdução de material genético do antígeno tumoral diretamente nas células do paciente. Essas vacinas visam estimular uma resposta imune robusta através da produção do antígeno tumoral diretamente nas células do paciente (Jou *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2023).

3.4.2. Peptídeos

Os peptídeos terapêuticos estão ganhando cada vez mais atenção devido à sua especificidade, potencial de menor toxicidade e facilidade de produção. Eles podem ser utilizados para direcionar respostas imunes específicas ou para interromper as vias de sinalização tumorais diretamente.

Em relação à indução da resposta imunológica ativa, ocorre a participação de células T específicas. Por exemplo, peptídeos baseados em HER2 têm mostrado resultados promissores como parte de vacinas terapêuticas. Um estudo recente demonstrou que a combinação de peptídeos HER2 com adjuvantes imunológicos pode aumentar significativamente a ativação das células T, resultando em uma maior destruição das células tumorais e controle do crescimento tumoral (Firuzpour *et al.*, 2025; Tobias *et al.*, 2022).

Além de peptídeos que estimulam uma resposta imune, peptídeos com propriedades antitumorais diretas também têm sido investigados. Estes peptídeos podem ser projetados para se ligar a células tumorais e induzir morte celular ou inibir vias de sinalização essenciais para o crescimento tumoral. Um exemplo promissor é o peptídeo melitina, que foi identificado como capaz de induzir apoptose em células tumorais de mama, ao se ligar e formar poros na membrana celular das células cancerígenas (Prince *et*

al., 2025).

O processo para a classificação dos candidatos de interesse para a pesquisa exige múltiplos níveis de evidência, seguindo as diretrizes mais recentes da ClinGen. Vários filtros, incluindo qualidade de sequenciamento, frequência populacional, informações biológicas e clínicas, localização e tipo de variante, e ferramentas de previsão *in silico* são aplicados para identificar variantes relevantes a fim de obter descobertas que levem a melhores diagnósticos, tratamento mais eficazes e uma melhor compreensão do corpo humano (Garcia *et al.*, 2022).

3.5. Uso de ferramentas *in silico* no câncer

Softwares são comumente usados para inúmeras pesquisas. A dinâmica molecular é uma técnica computacional que simula o movimento de átomos e moléculas ao longo do tempo, permitindo observar como as interações moleculares evoluem em um sistema dinâmico. Enquanto o *docking* molecular é focado na interação estática entre um ligante e um alvo, a dinâmica molecular leva em conta as flutuações e as mudanças conformacionais que ocorrem durante a interação, proporcionando uma visão mais detalhada da estabilidade do complexo proteína-ligante ao longo do tempo (Pieroni *et al.*, 2023).

Os sistemas são descritos por potenciais de interação que estimam a energia potencial de cada átomo, permitindo a simulação do comportamento das moléculas. O cálculo da energia total do sistema inclui contribuições de várias forças, como ligações covalentes, forças de van der Waals e interações eletrostáticas (Pieroni *et al.*, 2023).

A dinâmica molecular é particularmente útil na avaliação da estabilidade de complexos proteína-ligante e na identificação de regiões de interação críticas. Ela é comumente usada em conjunto com o *docking* molecular, para validar e refinar as interações iniciais preditas pelo *docking*. A dinâmica molecular permite, por exemplo, observar como um ligante se adapta ao sítio de ligação de uma proteína ao longo do tempo, oferecendo informações sobre a flexibilidade das interações e a formação de possíveis ligações hidrogênio ou interações hidrofóbicas (Salmaso; Moro, 2018). Dessa forma, bases de dados são adquiridas oferecendo informações moleculares relevantes para novas pesquisas como *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), *The Catalog of Somatic Mutations In* e *UniProt* (UNIPROT, 2019).

Diante dos avanços, o emprego de ferramentas computacionais, como *docking* molecular e dinâmica molecular, tem se mostrado essencial para a modelagem de

interações biomoleculares, auxiliando no desenvolvimento de novos fármacos e terapias personalizadas. Essas abordagens não apenas ampliam o conhecimento sobre os mecanismos moleculares do câncer, mas também abrem caminho para a descoberta de novas alternativas terapêuticas. Com a contínua evolução dessas metodologias, espera-se um impacto cada vez maior na medicina de forma precisa, permitindo tratamentos mais específicos e eficazes, além de uma compreensão mais profunda dos processos biológicos do câncer.

IV. METODOLOGIA

4.1. Seleção de modificações de sequências primárias

Em projeto anterior conduzido por nosso grupo de pesquisa, foram identificadas nove sequências peptídicas com potencial aplicação no tratamento de diferentes formas clínicas do câncer de mama. Agora, deseja-se realizar modificações nessas sequências, visando aprimorar suas propriedades antitumorais e reduzir sua imunogenicidade prevista.

Para avaliar as modificações propostas, utilizamos o software AntiCP v.2.0 (disponível em <https://webs.iitd.edu.in/raghava/anticp2/>). Este software foi empregado no modo de predição, utilizando as sequências FASTA dos motivos como dados de entrada. Especificamente, o Modelo 2 do software foi selecionado, que se baseia na composição de aminoácidos, desenvolvido para discriminar peptídeos anticâncer de peptídeos não anticâncer aleatórios. Como o servidor permite diferentes limiares (*thresholds*) para classificar o *Support Vector Machine* (SVM), e considerando que os valores mais altos correspondem a maior probabilidade preditiva de atividade anticâncer, neste estudo foi estabelecido limiar em 0,40, com objetivo de aumentar a confiança preditiva e reduzir as chances de inclusão de sequências com baixo potencial anticâncer. Sequências com um limiar abaixo desse valor serão excluídas do estudo.

4.2. Avaliação do potencial imunogênico

Considerando os possíveis efeitos adversos, como o desencadeamento de uma resposta imunológica severa e o risco de desenvolvimento de doenças autoimunes associadas ao uso de proteínas ou seus fragmentos na terapia, é essencial avaliar o potencial imunogênico das sequências propostas. Para aprimorar os resultados e selecionar sequências viáveis para o tratamento do câncer, os motivos identificados anteriormente foram submetidos à análise de seu potencial imunogênico utilizando o software VaxiJen v.2 (disponível em <http://www.ddgpharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>). No processo de avaliação, o parâmetro de busca escolhido foi o organismo alvo "Tumor", com um limiar definido em 0,5. Conforme este parâmetro, sequências com um *score* inferior a 0,50 foram consideradas não imunogênicas e adequadas para uso terapêutico, enquanto motivos com

score superior a 0,5 foram desconsiderados (Doytchinova; Flower, 2007).

4.3. Docking molecular

Após seleção de sequências com melhor potencial antitumoral e menor potencial imunogênico, foi conduzido um modelo de acoplamento molecular entre o peptídeo e sua proteína-alvo correspondente, tendo como objetivo prever as relações intermoleculares entre ambos. As estruturas tridimensionais das proteínas-alvo foram obtidas do banco de dados *Protein Data Bank* (PDB) (<http://www.rcsb.org/>). Considerando os peptídeos selecionados e suas respectivas proteínas alvo, para a linhagem MCF 7 utilizou-se a estrutura tridimensional da proteína ANXA5 (código PDB 6K25) e da proteína AXL (código PDB 5U6B). Para a linhagem MDA MB-321, as proteínas GSDMD (código PDB 5WQT), IGF1R (código PDB 5U8R) e RAB5A (código PDB 1N6H) foram utilizadas. As estruturas foram editadas utilizando o *software* Chimera v.1.15 para remoção de resíduos padrão e cadeias proteicas diferentes daquela de interesse. As estruturas tridimensionais dos peptídeos foram criadas pelo *software* PEPFOLD v.3 (<http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD3/>), utilizando as sequências de aminoácidos no formato FASTA para cada peptídeo. Foi realizado então o acoplamento molecular entre as estruturas proteicas e seus respectivos peptídeos através dos servidores PatchDock (<https://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/>) e seguido de validação pelo servidor FireDock (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/FireDock/>). Este docking foi feito no modo cego (*blind docking*), no qual não foi definido previamente um sítio de ligação específico na proteína-alvo. Assim toda a superfície da proteína foi considerada como potencial região de interação. Foram selecionadas as conformações com base nos parâmetros energéticos fornecidos pelo FireDock, onde foi avaliado principalmente os valores de energia global, indicando maior estabilidade do complexo formado.

4.4. Dinâmica molecular

Para confirmar as posições resultantes do acoplamento molecular e compreender o comportamento dinâmico dos complexos formados, foi conduzida uma análise de dinâmica molecular utilizando o pacote de software GROMACS versão 2022. Além disso, foi feita uma inspeção detalhada das moléculas das proteínas-alvo para identificar e corrigir possíveis falhas estruturais e anomalias nas sequências. Para

validar as conformações de *docking*, foram realizadas simulações de dinâmica molecular (DM) utilizando o pacote GROMACS 2022.1 (Abraham *et al.*, 2015). Inicialmente, todos os complexos gerados a partir do docking foram inspecionados no *Swiss PDB Viewer* para corrigir átomos ausentes (Guex e Peitsch 1997). Resíduos ausentes foram modelados no Modeller versão 10.2, utilizando a classe “*Auto Model*”, limitando a modelagem às regiões faltantes para minimizar perturbações na estrutura global (Webb; Sali, 2016). A topologia de cada complexo peptídeo-proteína foi gerada a partir do arquivo PDB correspondente, utilizando o campo de força CHARMM36 (Best *et al.*, 2012). Uma caixa em formato de dodecaedro rômico foi criada ao redor de cada complexo, com uma distância mínima de 10 Å entre a proteína e as bordas da caixa. O sistema foi solvatado utilizando o modelo de água TIP3P, e íons Na⁺ e Cl⁻ foram adicionados para neutralizar o sistema até uma concentração final de 0,15 M. A minimização de energia foi realizada utilizando 50.000 passos do algoritmo de descida mais íngreme para aliviar interações desfavoráveis (força máxima < 100 kJ/mol). O equilíbrio do sistema foi realizado sob condições NVT e NPT, com duração de 1 ns cada. Durante a fase NVT, a temperatura foi mantida em 310 K utilizando o termostato V-rescale. Na fase NPT, a pressão foi mantida em 1 bar utilizando o barostato de Berendsen. As simulações de produção foram executadas por até 100 ns, utilizando um integrador “*leap-frog*” com passo de tempo de 2 fs sob condições de contorno periódicas. As simulações foram monitoradas em intervalos de 25 ns e encerradas antecipadamente caso o peptídeo saísse do sítio de ligação. Interações eletrostáticas de longo alcance foram tratadas pelo método *Particle Mesh Ewald* (PME) com um *cutoff* de 1,2 nm, e um esquema de *cutoff* de Verlet de 1,2 nm foi aplicado para as interações de curto alcance. Ligações entre hidrogênio e átomos pesados foram restringidas utilizando o algoritmo LINCS. O termostato V-rescale e o barostato de Parrinello-Rahman foram utilizados durante as corridas de produção. Energias e coordenadas foram salvas a cada 10 ps para análises posteriores. Para parâmetros detalhados, consulte a seção “*Protein-Ligand Complex*” dos tutoriais do GROMACS de Lemkul (Lemkul, 2018). Todas as análises de DM foram realizadas utilizando ferramentas nativas do GROMACS e visualizadas com o software R. A dinâmica das trajetórias foi examinada utilizando o VMD (Humphrey *et al.*, 1996). As simulações foram executadas em um computador desktop equipado com processador Intel Core i5-7400 de 3,00 GHz, 16 GB de RAM e GPU NVIDIA GeForce GTX 1060.

As simulações de produção foram realizadas por até 100 ns. Complexos nos quais o peptídeo se dissociou nos primeiros nanossegundos — fato claramente

identificado pela inspeção visual das trajetórias — foram descartados. Complexos que permaneceram estavelmente ligados (RMSD de 10 Å em relação à pose inicial de *docking* por mais de 20 ns foram selecionados para posterior síntese e validação experimental.

4.5. Síntese de peptídeos em fase sólida

Os peptídeos que apresentaram os melhores resultados nas análises de *docking* e dinâmica molecular foram então sintetizados e caracterizados para posterior utilização em ensaios de citotoxicidade *in vitro*. Para tal, o método de síntese escolhido foi a síntese em fase sólida desenvolvida por Merrifield em 1965, com algumas adaptações. Para ativação da resina, adiciona-se 40 micromoles de resina (104 mg) a um tubo de síntese contendo dimetilformamida (DMF) suficiente para cobrir toda a resina. O tubo é agitado continuamente por três horas a temperatura ambiente. Em seguida, para remover o grupamento fluorenilmetoxycarbonil (Fmoc) de proteção, a resina é coberta com 3 mL de 4-metilpiperidina a 20% em DMF e agitada a temperatura ambiente por 20 minutos, repetindo o procedimento por três vezes. Posteriormente, a resina é lavada alternadamente três vezes com metanol e DMF, utilizando 2 mL de solvente em cada etapa, com auxílio de uma bomba de vácuo.

Os aminoácidos e outros reagentes auxiliares são adicionados em concentrações quatro vezes superiores (160 micromoles) à quantidade de resina, para favorecer o acoplamento. Inicialmente, o aminoácido é adicionado ao tubo de síntese contendo 2 mL de DMF, juntamente com 25 µL de diisopropilcarbodiimida (DIPC) e 23 mg de oxima [ethyl 2-cyano-2- (hydroxyimino)acetate]. Após 2 horas de agitação a temperatura ambiente, o líquido é removido e o peptídeo em crescimento é submetido à acetilação para prevenir o crescimento de cadeias não reagidas com o aminoácido incorporado. Para isso, adiciona-se 50 µL de uma solução 1:1 de DIPC e anidrido acético a 1 mL de DMF no tubo de síntese, agitando por 30 minutos. Em seguida, a resina é lavada alternadamente três vezes com metanol e DMF, e o grupamento amino do primeiro aminoácido acoplado será desprotegido lavando-se a resina com 3 mL de uma solução de 4-metilpiperidina a 20% em DMF, por três vezes de 20 minutos cada, a temperatura ambiente. O acoplamento dos demais aminoácidos é realizado conforme descrito anteriormente.

Após os ciclos de acoplamento, remove-se o último grupamento Fmoc com 4-metilpiperidina a 20% em DMF, lava-se a resina três vezes com 3 mL de diclorometano

(DCM) durante 5 minutos. O peptídeo é clivado da resina utilizando 5 mL de uma solução aquosa contendo 95% de ácido trifluoroacético (TFA), agitando por quatro horas. Os produtos da síntese são precipitados com 50 mL de éter etílico a 4 °C, centrifugados três vezes a 1.500 x g por 5 minutos e o sobrenadante é descartado. Por fim, os peptídeos são ressuspensos em 3 mL de água ultrapura e liofilizados. A Figura 1 apresenta um esquema resumido das principais etapas desse processo, desde a ativação da resina até a precipitação do peptídeo obtido.

Figura 1 - Etapas da síntese de peptídeos por fase sólida utilizando a estratégia Fmoc.



Fonte: Elaborado pela autora

4.6. Caracterização dos peptídeos por espectrometria de massas

Os peptídeos produzidos foram submetidos à análise utilizando um cromatógrafo líquido espectrômetro de massa (LCMS-IT-TOF), o qual utiliza o método de ionização conhecido como *electrospray*. As amostras são introduzidas no sistema por meio de injeções diretas de alíquotas de 5 microlitros. Para determinar as massas moleculares teóricas dos peptídeos sintetizados, utilizou-se a ferramenta ExPASy - Compute PI / MW tool (http://web.expasy.org/compute_pi/).

Para facilitar a visualização do delineamento experimental, a Tabela 2 resume

as etapas metodológicas, os softwares empregados e o número de sequências selecionadas ao longo do processo.

Tabela 2 - Síntese das etapas metodológicas empregadas na seleção, avaliação e caracterização dos peptídeos.

Experimento	Software/Modelo	Sequências de Entrada	Sequências Selecionadas
Seleção de Modificações	AntiCP	9 iniciais	45
Avaliação do Potencial Imunogênico	VaxiJen	45	18
Docking Molecular	PatchDock/FireDock	18	8
Dinâmica Molecular	GROMACS	8	4
Síntese e Caracterização	LCMS-IT-TOF	4	2

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Seleção de modificações de sequências primárias e avaliação do potencial imunogênico

Para a base da avaliação da atividade antitumoral, foram usados os peptídeos promissores adquiridos em estudo anterior, sendo nove deles: WFHGK, CLIINNKNF, MEPWRQCAQW, TSAYYRGAVG, AFGTVYKGIW, GKVPIKWMA, RVCGDRGFFF, RTRLALIICN e WYLKMMWQW. Seus valores de AntiCP, podendo ser verificados na Tabela 3, não obtiverem *scores* inferiores a 0.40, tendo esse valor como um dos parâmetros na obtenção dos novos peptídeos. Dessa forma com o objetivo de encontrar sequências com maior atividade anticâncer, novas sequências foram geradas e avaliadas pelo mesmo *software*. Sequências com *scores* de AntiCP inferiores aos dos peptídeos originais foram descartadas, priorizando-se apenas aquelas que demonstraram um desempenho superior.

Após a seleção inicial, os peptídeos foram analisados utilizando a ferramenta de bioinformática Vaxijen v2.0. Essa etapa foi crucial para avaliar a probabilidade de cada peptídeo em desencadear uma resposta autoimune. O Vaxijen opera com base em propriedades físico-químicas da sequência de aminoácidos, gerando um *score* de antigenicidade que reflete o potencial de um peptídeo ser reconhecido como um antígeno.

Para garantir a segurança e a especificidade do nosso estudo, foram selecionadas apenas as sequências que apresentaram um *score* inferior a 0,5, que é o *threshold* padrão do software para classificar sequências como não antigênicas. Peptídeos com um *score* abaixo desse limite foram considerados menos propensos a induzir uma resposta imune indesejada. Na Tabela 3 são demonstradas todas as sequências selecionadas pelo AntiCP e analisadas no Vaxijen.

Tabela 3 - Sequências peptídicas analisadas nos *softwares* AntiCP e Vaxijen com seus respectivos valores de *score*. Em cinza, são destacadas apenas as sequências que demonstraram os melhores *scores* em ambos os *softwares*. Em negrito estão os peptídeos originais e seus valores de *score* para os *softwares* AntiCP e Vaxijen.

Peptídeos	score AntiCP	score Vaxijen
<i>Linhagem MCF-7</i>		
WFHGK	1.08	
WFHKK	0.92	

WFHLK	0.92	
KFHGK	0.87	
WFKGK	0.87	
WFLGK	0.87	
CLIINNKNF	0.42	0.3354
WLIINNKNF	0.55	0.6234
CLWINNKNF	0.55	-0.2577
CLIWNNKNF	0.55	0.0252
CLIWNNKNF	0.55	-0.1907
CLIINWKNF	0.55	1.6326
MEPWRQCAQW	0.47	0.0229
MFPWRQCAQW	0.68	0.1422
MEPWRQYAQW	0.66	-0.0433
YEPWRQCAQW	0.65	-0.0689
MEPWRQCFQW	0.65	0.2736
MEPWRQCYQW	0.65	0.0493
<i>Linhagem MDA-MB-231</i>		
TSAYYRGAVG	0.41	0.4100
TCAYYRGAVG	0.67	0.1907
TSCYYRGAVG	0.62	0.4710
TSAYYRGCVG	0.62	0.1687
CSAYYRGAVG	0.60	0.0626
TSAYYRGACG	0.60	0.5779
AFGTVYKGIW	0.99	-0.1232
AFGTVKKGIW	0.82	-0.0991
AFGTVLKGIW	0.79	-0.5944
AFGTVCKGIW	0.77	-0.4421
CFGTVYKGIW	0.76	-0.0037
ACGTVYKGIW	0.76	-0.1519
GKVPIKWMA	0.94	-0.8360
GKVFIKWMA	0.86	-1.1501
GKVPIKWKA	0.85	-0.4807
GKVPIKWFA	0.84	-0.8764
GKFPIKWMA	0.83	-0.4718

GKVPFKWMA	0.83	-0.5924
RVCGDRGFFF	0.48	0.3931
RVCGCRGFFF	0.77	0.5776
RVCGDRGCFF	0.71	0.6840
RVCGDRGFCF	0.71	0.2282
RVCGDRGFFC	0.71	-0.4658
CVCGDRGFFF	0.70	0.2117
RTRLALIICN	0.42	-0.2984
RTRLALIICG	0.68	-0.5233
RTRGALIICN	0.64	-0.7516
RTRLAGIICN	0.64	0.8860
RTRHALIICN	0.62	0.1633
RTRWALIICN	0.62	0.4120
WYLKMMWQW	0.73	0.3481
WKLKMMWQW	0.65	-0.1807
WRLKMMWQW	0.63	-0.1293
WYLKMMWRW	0.63	0.5684
WYLKMMWIW	0.62	0.1388
WYLKMMWPW	0.62	0.6056

5.2. Docking molecular

As interações entre peptídeos candidatos e proteínas alvo associadas às linhagens de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231, foram avaliadas por meio do *docking* molecular, sendo 18 sequências selecionadas para uma análise aprofundada com o auxílio do *software* Chimera. O objetivo dessa etapa foi avaliar a estabilidade da interação entre os peptídeos candidatos e suas respectivas proteínas alvo. Para isso, foi analisado primeiramente o número de ligações de hidrogênio formadas nos resíduos da interface de acoplamento.

As ligações de hidrogênio desempenham um papel crucial na manutenção da estrutura tridimensional de proteínas e, quando presentes na interface de ligação, contribuem significativamente para a força e a especificidade da interação entre o peptídeo e a proteína alvo. Por serem ligações fortes, a identificação desse tipo de interação reforça a possibilidade de ocorrência de interação entre o peptídeo e a proteína alvo em ambiente real (Madushanka *et al.*, 2023; Tan *et al.*, 2021).

Além das ligações de hidrogênio, as distâncias entre os aminoácidos foram analisadas para avaliar a proximidade entre a proteína e o peptídeo. Um critério de corte de 4 Ångströms (4 Å) foi utilizado, por ser um valor frequentemente usado para análises de proximidade proteína-peptídeo. De acordo com Hazarika *et al.* (2018), átomos que estejam neste limite são considerados de contatos próximos para a análise, contribuindo para estabilidade do complexo por meio de interações hidrofóbicas, eletrostáticas e força de Van der Waals.

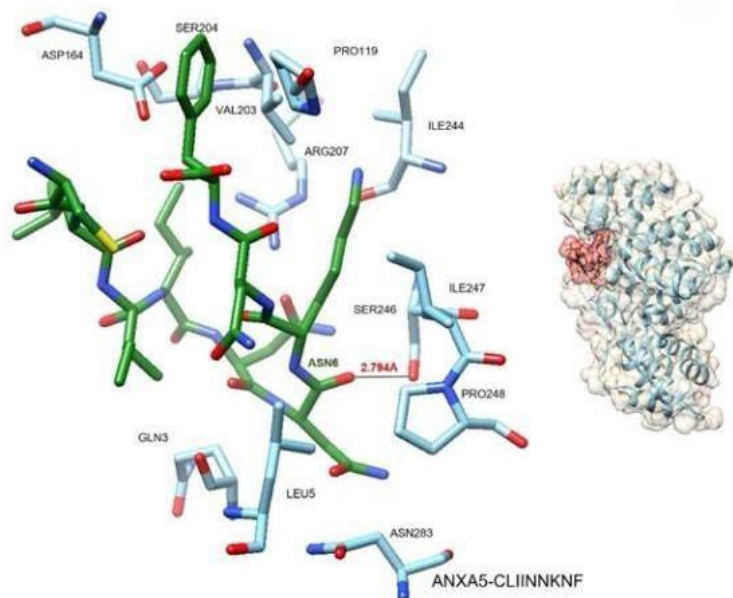
Por último, são demonstradas as energias de ligação obtidas para cada par proteína alvo - peptídeo geradas pelo Firedock (Tabela 14). Nesse caso, quanto menor a energia global mais estável o complexo se apresenta.

Para cada par proteína alvo - peptídeo estão mostrados respectivamente: a estrutura do complexo gerada por *docking* molecular entre a proteína alvo e o peptídeo original (Figuras 2, 4, 6 e 8); a estrutura do complexo gerada por *docking* molecular entre a proteína alvo e os peptídeos melhorados (Figuras 3, 5, 7, 9 e 10); tabelas com os valores entre as distâncias de átomos nas cadeias laterais dos peptídeos selecionados e a estrutura da proteína-alvo (Tabelas 4, 6, 8, 10 e 12); e tabelas com a identificação e os respectivos comprimentos das ligações de hidrogênio entre as proteínas alvo e os peptídeos selecionados (Tabelas 5, 7, 9, 11 e 13).

O primeiro peptídeo que demonstrou a possibilidade de melhorias na sequência original foi o CLIINNKNF. Esse peptídeo foi selecionado a partir da rede de interação obtida em projeto anterior para a proteína alvo anexina V. As anexinas representam uma família de 12 proteínas, com diferentes funções biológicas, que estão presentes em variados tipos de câncer, como o câncer gástrico, o câncer de ovário e o câncer de mama. Expressas diferencialmente nos tecidos, as anexinas podem desempenhar diversas funções no câncer, atuando tanto na inibição de vias de sinalização importantes para o desenvolvimento da doença, quanto para estimulação da angiogênese e da metástase (Zhang *et al.*, 2023).

A anexina A5 – ANXA5- (Ghasemi *et al.*, 2024) participa da ativação dos linfócitos T. Aliado a isso, essa proteína também pode desencadear efeitos anti-inflamatórios, reparo de membrana celular e participar da anti-coagulação. No câncer de mama, a superexpressão dessa proteína está relacionada ao controle da apoptose através da regulação dos genes Bax e BCL2, influenciando diretamente na redução da proliferação celular (Ghasemi *et al.*, 2024).

Figura 2 - Estrutura ANXA5-CLIINNKNF (complexo proteína alvo - peptídeo original). À direita o complexo inteiro com as superfícies moleculares com a estrutura da proteína em azul e do peptídeo em vermelho, e à esquerda uma aproximação da região de interação com destaque para as cadeias laterais mais próximas entre as moléculas (peptídeo em verde).

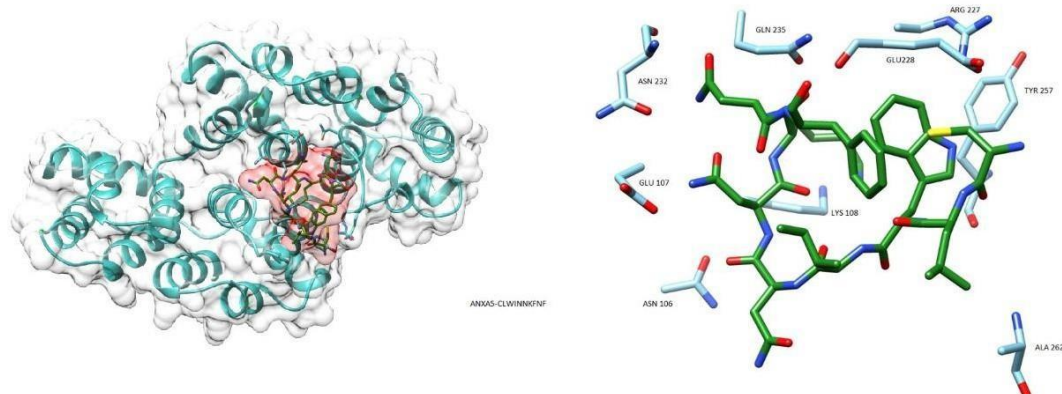


Os resultados do *docking* molecular, do projeto anterior, demonstraram duas regiões com ligações de hidrogênio entre a proteína ANXA5 e o peptídeo CLIINNKNF (SER246-ASN6 – 2,794 Å) conforme demonstrado na Figura 2 (em vermelho com traço em preto).

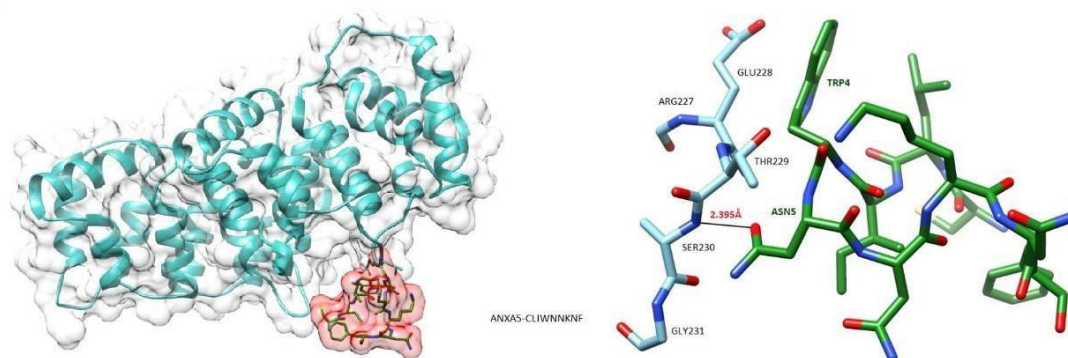
Na Figura 3 está demonstrado como as sequências de peptídeos aprimorados se ligaram a essa proteína-alvo. De acordo com os resultados obtidos no item anterior as sequências CLWNNKNF (Figura 3-A), CLIWNNKNF (Figura 3-B) e CLIIWNNKNF (Figura 3-C) para a proteína ANXA5 mostraram proximidade com a proteína em regiões diferentes quando comparados ao complexo com o peptídeo original. Foi observado que os peptídeos A e C se encaixam na mesma região mas com aminoácidos diferentes, e que B está próxima a esse encaixe, porém mais externo à proteína. A e C se ligam aos aminoácidos ASN232, GLN235, ARG227, GLU228, TYR257, ALA262, LYS108 da proteína-alvo. Por B estar mais a borda da proteína, apresenta menos ligações de valores menores que 4Å. Há uma região interessante onde tanto o peptídeo A e C quanto o B tem em comum em proximidade ao aminoácido da proteína, sendo ela o aminoácido GLU228 da proteína ANXA5. Os resultados obtidos com esse experimento demonstram que as sequências CLWNNKNF e CLIIWNNKNF têm maior potencial de interação com a proteína alvo.

Figura 3 - Ligação dos peptídeos selecionados CLWINNKNF (A), CLIWNNKNF (B) e CLIIWNNKNF (C) à proteína alvo ANXA5. À esquerda o complexo inteiro com as superfícies moleculares com a estrutura da proteína em azul e do peptídeo em verde, e à direita uma aproximação da região de interação com destaque para as cadeias laterais mais próximas entre as moléculas.

A-



B-



C-

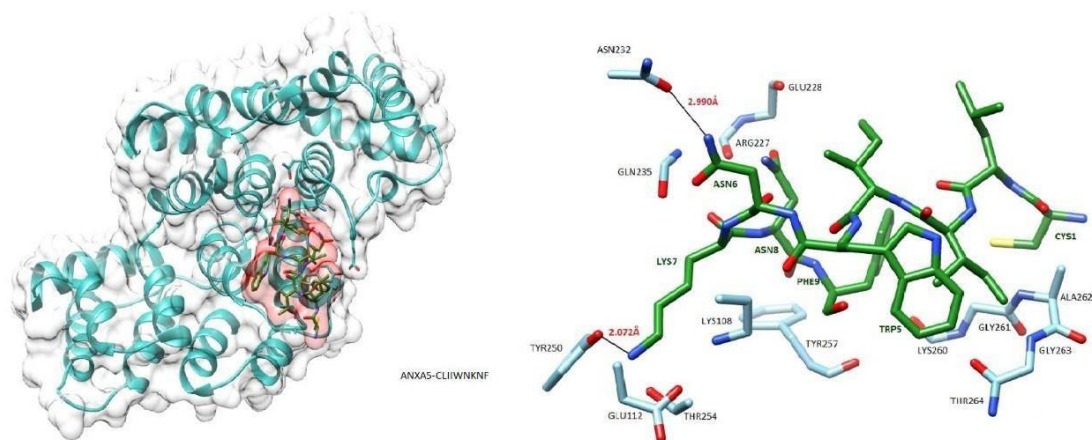


Tabela 4 - Distâncias entre os aminoácidos da proteína alvo ANXA5 e de resíduos de peptídeos que se apresentaram menores que 4 Å.

Proteína Central	Peptídeo	Aminoácidos Proteína Central	Aminoácidos Peptídeo	Distância da Ligação em Å
ANXA5	CLWINNKFNF	GLU 228.A OE2	CYS 1 CB	2.852Å
		ALA 262.A N	LEU 2 CD1	3.015Å
		TYR 257.A CD1	TRP 3 NE1	2.621Å
		TYR 257.A O	TRP 3 CD1	3.206Å
		ARG 227.A NH1	TRP 3 CZ2	2.928Å
		ARG 227.A CG	TRP 3 CH2	3.389Å
		ASN 106.A OD1	ASN 5 O	2.490Å
		GLU 107.A OE2	ASN 6 ND2	3.260Å
		LYS 108.A CD	ASN 6 O	2.631Å
		LYS 108.A CB	ASN 6 C	2.913Å
		GLN 235.A NE2	LYS 7 O	2.652Å
		GLN 235.A OE1	LYS 7 CB	2.928Å
		LYS 108.A CE	LYS 7 CE	3.029Å
		GLN 235.A CB	ASN 8 OD1	2.740Å
		ASN 232.A N	ASN 8 OD1	2.739Å
		ASN 232. A OD1	ASN 8 ND2	2.900Å
		GLU 228.A O	PHE 9 O	2.300Å
	CLIWNNKNF	GLU 228.A OE1	TRP 4 CZ2	3062Å
		GLU 228.A CB	TRP 4 CG	2739Å
		GLU 228.A O	TRP 4 CB	2872Å
		THR 229.A OG1	TRP 4 C	2561Å
		THR 229.A CG2	ASN 5 CA	2733Å
		SER 230.A O	ASN 5 ND2	2739Å
	CLIIWNKNF	ALA 262.A CB	CYS 1 O	2738Å
		ALA 262.A N	CYS 1 CB	2618Å
		GLY 261.A CA	CYS 1 SG	3004Å
		GLY 263.A O	ILE 3 CD1	3113Å

LYS 108.A CD	TRP 5 O	2207Å
GLN 235.A OE1	LYS 7 O	2456Å
LYS 108.A NZ	LYS 7 CE	2497Å
THR 254.A OG1	LYS 7 NZ	3564Å
GLU 112.A CB	LYS 7 NZ	2568Å
GLU 112.A OE2	LYS 7 NZ	3211Å
TYR 257.A CG	ASN 8 O	2983Å
GLU 228.A CA	ASN 8 OD1	2248Å
GLU 228.A O	ASN 8 OD1	3046Å
ARG 227.A O	ASN 8 OD1	2088Å
LYS 260.A O	PHE 9 CD2	2756Å
TYR 257.A O	PHE 9 CA	3385Å

Conforme demonstrado na Tabela 5, o peptídeo CLIWNNKNF foi capaz de realizar uma ligação de hidrogênio com a proteína alvo e o peptídeo CLIIWNNKNF, duas ligações. Apenas o peptídeo CLWINNKNF não realizou ligação de hidrogênio com a proteína alvo mas, apesar disso, é possível observar que tal peptídeo encontra-se inserido em uma região mais encoberta por resíduos da proteína (Figura 3-A), como ARG227, GLU228, TYR257, ASN232, GLN235. Essa aproximação de resíduos gera uma interação entre resíduos da proteína com características carregadas e polares que podem interagir com os resíduos do peptídeo, como o da lisina (K) que possui cadeia lateral carregada positivamente onde interage de forma eletrostática com resíduos negativos da proteína, como GLU; também resíduo de asparagina (N) que apresenta uma cadeia lateral polar não carregada onde favorece interações dipolo-dipolo, o que possivelmente contribuiu para a estabilidade do complexo (Tabela 4).

Tabela 5 - Ligações de hidrogênio observadas entre aminoácidos da proteína ANXA5 e dos aminoácidos dos peptídeos CLIWNNKNF e CLIIWNNKNF com seus respectivos comprimentos.

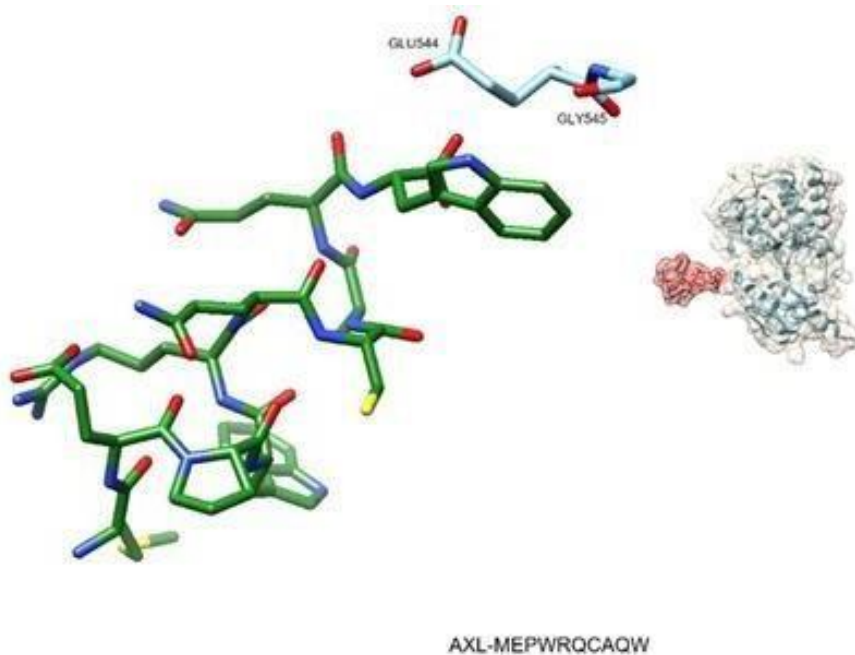
Proteína	Peptídeo	Aminoácidos da proteína	Aminoácidos do peptídeo	Comprimento da Ligação de H (Å)
ANXA5	CLIWNNKNF	SER 230.A N	ASN 5 OD1	2.395
		ASN 232.A OD1	ASN 6 ND2	2.990
	CLIIWNNKNF	TYR 250.A OH	LYS 7 NZ	2.072

No câncer de mama, a expressão da proteína AXL é um importante fator

prognóstico. Isso porque, AXL participa de diferentes atividades no processo de oncogene, como na regulação de importantes vias de sinalização na doença através das vias MAPK, PI3K, JAK e NFκB, que são vias relacionadas ao processo de migração e invasão celular. Aliado a isso, AXL também participa da degradação da matriz extracelular e atua como um mediador entre as células tumorais e o microambiente tumoral, sendo sua superexpressão relacionada a um pior prognóstico na doença (Falcone *et al.*, 2020).

Ao realizar o *docking* entre a proteína AXL e o peptídeo original MEPWRQCAQW, não foram observadas interações relevantes, conforme apresentado na Figura 4. Adicionalmente, os resultados de energia global também não foram favoráveis.

Figura 4 - Estrutura AXL-MEPWRQCAQW (complexo proteína alvo - peptídeo original). À direita o complexo inteiro com as superfícies moleculares com a estrutura da proteína em azul do peptídeo em verde, e à esquerda uma aproximação da região de interação com destaque para as cadeias laterais mais próximas entre as moléculas.



Diferente de seu peptídeo original, os resultados do aprimoramento mostraram diversas interações relevantes. Todos os peptídeos gerados se encaixam na mesma região da proteína ou em uma parte bem próxima a ela (Figura 5). As distâncias observadas entre a estrutura da proteína original e os respectivos peptídeos foram menores que 4Å como pode demonstrado na Tabela 6. Os principais aminoácidos envolvidos na interação com os peptídeos foram: ASP627, ARG676 e GLU544. Em relação às ligações de hidrogênio, apenas um dos cinco peptídeos modificados — YEPWRQCAQM — não apresentou esse tipo de interação (Figura 5-C). Os demais estabeleceram de uma a cinco

ligações, como evidenciado na Tabela 7. O peptídeo MEPWRQY⁺AQW foi o que apresentou o maior número, com cinco ligações de hidrogênio, enquanto os outros candidatos exibiram apenas uma ou duas. Curiosamente, embora o YEPWRQCAQM não tenha estabelecido ligações de hidrogênio, foi o que apresentou o maior número de contatos com distâncias inferiores a 4 Å, onde pode-se observar na Tabela 6, sugerindo que sua estabilidade de interação pode estar mais relacionada a forças não-covalentes de curta distância (como interações hidrofóbicas e de Van der Waals) do que a ligações específicas. Esse achado reforça que a análise deve considerar não apenas o número de ligações de hidrogênio, mas também a contribuição de contatos proximais na formação de um complexo estável.

Figura 5 - Ligação dos peptídeos selecionados MFPWRQCAQW (A), MEPWRQYAQW (B), YEPWRQCAQW (C), MEPWRQCFQW (D), MEPWRQCYQW (E) à proteína alvo AXL. À esquerda o complexo inteiro com as superfícies moleculares com a estrutura da proteína em azul e do peptídeo em verde, e à direita uma aproximação da região de interação com destaque para as cadeias laterais mais próximas entre as moléculas.

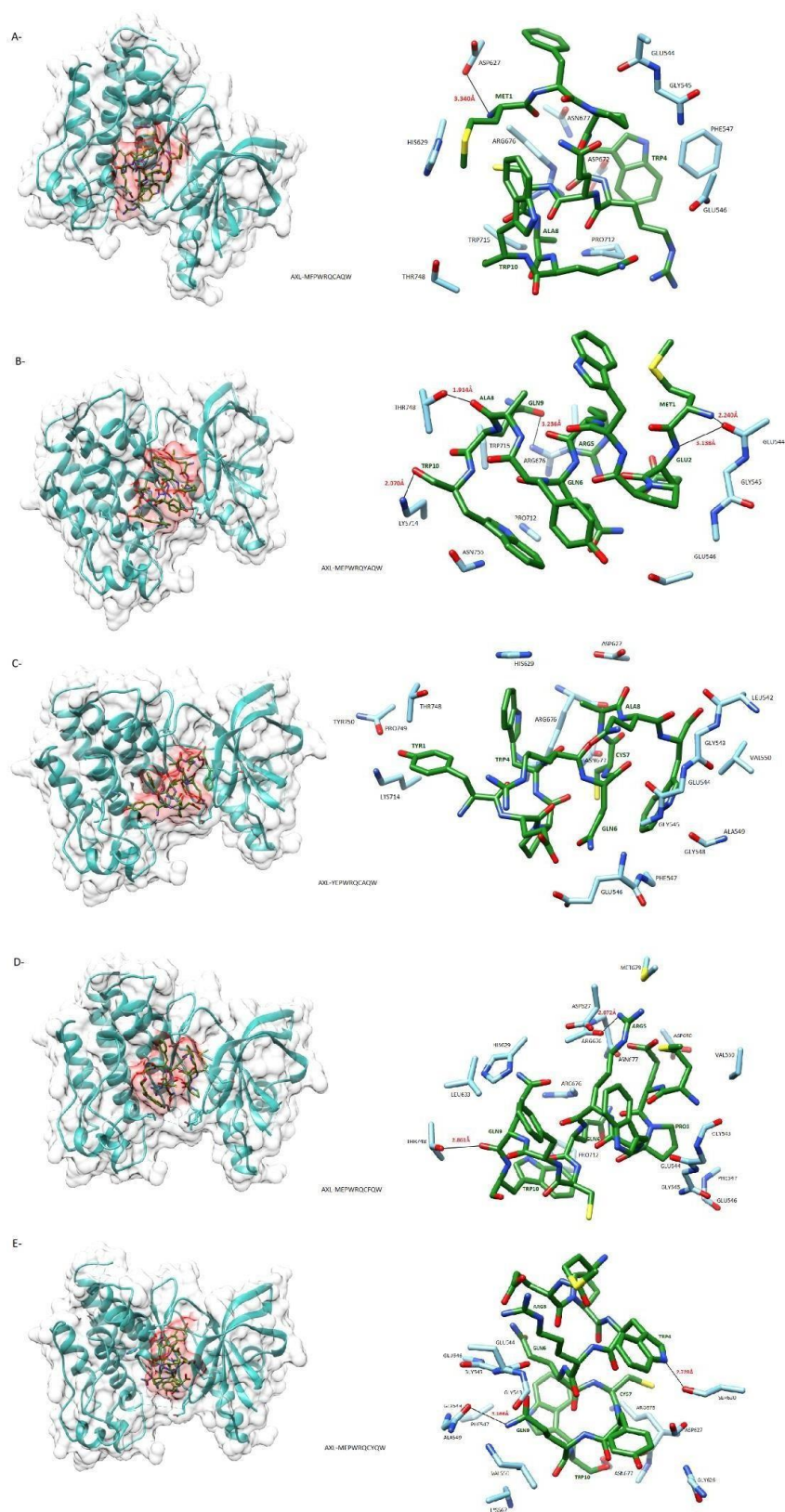


Tabela 6 - Distâncias entre os aminoácidos da proteína alvo AXL e peptídeos que se apresentaram menores que 4 Å.

Proteína Central	Peptídeo	Aminoácidos Proteína Central	Aminoácidos Peptídeo	Distância da Ligação em Å
AXL	MFPWRQCAQW	HIS 629.A CE1	MET 1 CE	2835Å
		HIS 629.A CB	MET 1 N	3270Å
		HIS 629.A ND1	MET 1 CG	3101Å
		ARG 676.A CB	MET 1 O	3112Å
		ASP 627.A OD2	PHE 2 CE1	3218Å
		GLY 545.A CA	PRO 3 CG	3181Å
		GLU 544.A O	PRO 3 CD	3216Å
		PHE 547.A CE2	TRP 4 NE1	3373Å
		ASP 672.A OD2	TRP 4 CD2	2890Å
		ANS 677.A OD1	TRP 4 CB	3455Å
		ARG 676.A CD	TRP 4 CA	2644Å
		ARG 676.A NE	TRP 4 CA	2554Å
		ARG 676.A CZ	TRP 4 O	3124Å
		GLU 546.A OE1	ARG 5 CD	3501Å
		PRO 712.A CG	ARG 5 CZ	3488Å
		ARG 676.A CD	CYS 7 SG	3659Å
		PRO 712.A N	ALA 8 CB	2420Å
		TRP 715.A CZ3	ALA 8 CB	2728Å
		THR 748.A CG2	TRP 10 O	2625Å
		THR 748.A OG1	TRP 10 C	3187Å
	MEPWRQYAQW	GLY 545.A CA	GLU 2 CB	3141Å
		GLU 546.A N	GLU 2 CB	2761Å
		ARG 676.A CD	ARG 5 CZ	2783Å
		GLU 546.A OE2	GLN 6 NE2	3626Å
		TRP 715.A CH2	GLN 9 CB	3165Å
		THR 748.A CG2	GLN 9 C	2664Å

	ASN 755.A ND2	TRP 10 NE1	2390Å
	LYS 714.A CD	TRP 10 CA	3408Å
	ASN 755.A OD1	TRP 10 CG	2694Å
	PRO 712.A CD	TRP 10 NE1	2950Å
	THR 748.A CG2	TYR 1 CZ	2524Å
	PRO 749.A O	TYR 1 OH	2695Å
	LYS 714.A NZ	TYR 1 OH	2069Å
	HIS 629.A CE1	TRP 4 CZ2	2433Å
	ARG 676.A NH1	TRP 4 CD1	2429Å
	ARG 676.A NE	TRP 4 CA	3113Å
	ARG 676.A CD	TRP 4 O	2843Å
	GLU 546.A OE2	GLN 6 OE1	3681Å
	GLU 546.A CB	GLN 6 OE1	2656Å
	GLU 546.A N	GLN 6 NE2	2660Å
	GLY 545.A CA	GLN 6 CG	2890Å
YEPWRQCAQW	ARG 676.A O	CYS 7 O	2927Å
	ASN 677.A OD1	CYS 7 CB	2917Å
	ASP 627.A OD2	ALA 8 O	2775Å
	ARG 676.A CB	ALA 8 CB	3359Å
	LEU 542.A O	GLN 9 O	3167Å
	GLY 545.A N	TRP 10 NE1	2448Å
	GLY 543.A O	TRP 10 CD1	3379Å
	LEU 542.A CB	TRP 10 O	3802Å
	VAL 550.A CG2	TRP 10 CG	3433Å
	GLY 548.A O	TRP 10 CE2	3164Å
	PHE 547.A N	TRP 10 CZ2	3331Å
MEPWRQCFQW	VAL 550.A CG2	MET 1 CB	2993Å

	GLY 543.A O	MET 1 N	3774Å
	ASN 677.A CA	GLU 2 OE1	3113Å
	ASN 677.A OD1	GLU 2 CG	3148Å
	ASP 690.A OD2	GLU 2 CG	3669Å
	GLY 545.A CA	PRO 3 CG	3565Å
	GLU 546.A N	PRO 3 CB	2676Å
	PHE 547.A N	PRO 3 CG	3280Å
	GLU 544.A O	TRP 4 CB	2213Å
	ASP 627.A CB	ARG 5 CZ	2603Å
	ASP 627.A CG	ARG 5 NE	3232Å
	MET 679.A SD	ARG 5 NH2	2331Å
	ARG 676.A CA	ARG 5 CD	3814Å
	ARG 676.A NE	GLN 6 CD	2773Å
	LEU 633.A CD1	PHE 8 CZ	2999Å
	HIS 629.A CE1	GLN 9 CG	2647Å
	HIS 629.A CG	GLN 9 CD	2896Å
	PRO 712.A CD	TRP 10 CZ2	2551Å
MEPWRQCYQW	GLU 544.A CB	ARG 5 NH1	3158Å
	GLY 545.A CA	GLN 6 NE2	3511Å
	GLY 545.A CA	GLN 6 CG	2658Å
	GLU 546.A N	GLN 6 NE2	3317Å
	ARG 676.A CB	CYS 7 SG	2413Å
	ARG 676.A CA	CYS 7 O	3323Å
	ASP 627.A N	TYR 8 CD1	3672Å
	GLY 626.A CA	TYR 8 CE1	3350Å
	ASP 627.A OD2	TYR 8 CA	3489Å
	VAL 550.A CB	GLN 9 CG	3565Å
	LYS 567.A CD	GLN 9 O	3451Å
	VAL 550.A N	GLN 9 NE2	2982Å

GLU 544.A O	GLN 9 OE1	2434Å
GLY 543.A O	GLN 9 CD	2588Å
ARG 676.A CD	TRP 10 CE3	3568Å
ASN 677.A CA	TRP 10 O	3207Å
ASN 677.A OD1	TRP 10 O	2657Å
PHE 547.A CD2	TRP 10 CZ2	3459Å

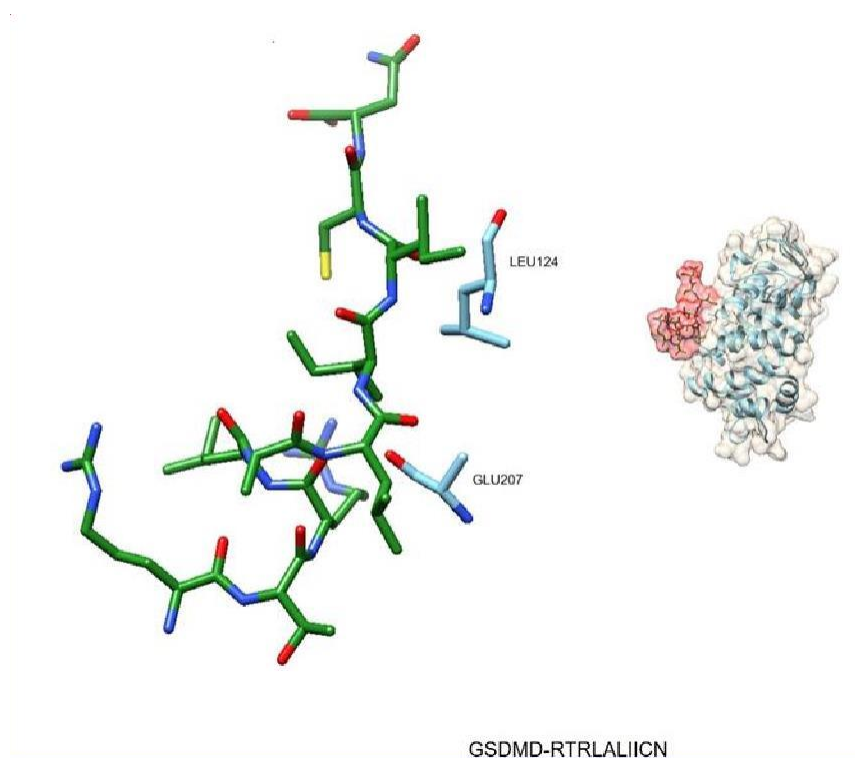
Tabela 7 - Ligações de hidrogênio observadas entre aminoácidos da proteína AXL e dos peptídeos MFPWRQCAQW, MEPWRQYAQW, MEPWRQCFQW, MEPWRQCYQW com seus respectivos comprimentos.

Proteína	Peptídeo	Aminoácidos da proteína	Aminoácidos do peptídeo	Comprimento da Ligação de H (Å)
AXL	MFPWRQCAQW	ASP 627.A OD1	MET 1 N	3.340Å
		GLU 544.A O	MET 1 N	2.240Å
		GLU 544.A O	GLU 2 N	3.138Å
	MEPWRQYAQW	THR 748.A OG1	ALA 8 O	1.914Å
		ARG 676.A NH1	GLN 9 OE1	3.236Å
		LYS 714.A NZ	TRP 10 O	2.070Å
	MEPWRQCFQW	ARG 676.A O	ARG 5 NH1	2.072Å
		THR 748.A OG1	GLN 9 OE1	2.861Å
	MEPWRQCYQW	SER 630.A OG	TRP 4 NE1	2.728Å
		GLY 548.A O	GLN 9 NE2	3.166Å

Gasdermina D (GSDMD) é uma proteína que atua como substrato para as caspases inflamatórias e participa do processo de piroptose. Essa proteína atua em variados tipos de câncer, sendo encontrada superexpressa em tecidos de câncer de mama, quando comparado aos tecidos normais da mama. Essa superexpressão demonstrou ser um importante fator para o prognóstico da doença, uma vez que GSDMD pode atuar como um supressor tumoral na doença e, portanto, sua alta expressão foi relacionada a um melhor prognóstico nos pacientes (Chen *et al.* ; Yang; Tang, 2023).

Os resultados do *docking* entre a proteína GSDMD e o peptídeo RTRLALIICN não demonstraram bons resultados em relação a energia global. Adicionalmente, nenhuma interação relevante foi observada, conforme pode ser observado na Figura 6.

Figura 6 - Estrutura GSDMD-RTRLALIICN (complexo proteína alvo - peptídeo original). À direita o complexo inteiro com as superfícies moleculares com a estrutura da proteína em azul e do peptídeo em verde, e à esquerda uma aproximação da região de interação com destaque para as cadeias laterais mais próximas entre as moléculas.



Já em relação às sequências aprimoradas obtivemos diferenças entre os peptídeos dessa mesma proteína. Entre as variantes testadas, o peptídeo RTRLALIICG destacou-se por se acomodar de forma mais central e interna na estrutura da GSDMD (Figura 7-A), proporcionando maior superfície de contato e maior probabilidade de interações estáveis com resíduos funcionais da proteína. Em contraste, RTRGALIICN ligou-se a uma extremidade da molécula (Figura 7-B), região normalmente mais exposta e associada a interações menos estáveis; RTRHALIICN apresentou um encaixe semelhante ao do peptídeo A, com contatos próximos a LEU124, GLU20, ARG16 e TYR195 (Figura 7-C); já RTRWALIICN ficou próximo a uma cadeia solta, o que reduz sua probabilidade de ancoragem duradoura (Figura 7-D).

A-

GSDMD-RTRLALIICG

B-

GSDMD-RTRGALIICN

C-

GSDMD-RTRHALIICN

D-

GSDMD-RTRWALIICN

Tabela 8 - Distâncias entre os aminoácidos da proteína alvo GSDMD e peptídeos que se apresentaram menores que 4 Å.

Proteína	Peptídeo	Aminoácidos	Aminoácidos	Distância da
Central		Proteína Central	Peptídeo	Ligação em Å
GSDMD	RTRLALIICG	GLU 20.A CG	ARG 3 CG	2789Å
		GLU 27.A OE2	ARG 3 CD	2937Å
		SER 23.A OG	ARG 3 CZ	3371Å
		ARG 16.A NE	LEU 4 CD2	2470Å
		GLU 20.A OE2	LEU 4 N	3175Å
		GLU 20.A OE1	LEU 4 CG	3094Å
		TYR 195.A OH	ILE 7 CG2	2643Å
		ARG 16.A NH1	ILE 8 CD1	2592Å
		GLU 128.A OE1	ILE 8 O	2533Å
		GLU 128.A OE2	CYS 9 O	2365Å
		LEU 124.A CD1	GLY 10 C	3134Å
	RTRGALIICN	LEU 92.A CG	ARG 1 CA	3654Å
		LEU 29.A CD2	ARG 1 NH1	3607Å
		VAL 89.A CG2	THR 2 C	3155Å
		GLU 91.A OE1	GLY 4 O	2889Å
		GLU 91.A CD	ALA 5 N	2809Å
		GLU 91.A CG	LEU 6 N	3420Å
		GLU 91.A CB	LEU 6 CD1	3044Å
		LEU 28.A CB	ILE 8 CG2	2835Å
		ASP 30.A N	CYS 9 O	2586Å
		ASP 30.A CA	ASN 10 O	3634Å
	RTRHALIICN	GLU 128.A OE2	ARG 3 NH2	3314Å
		LEU 124.A CD2	HIS 4 NE2	2613Å
		LEU 127.A CD2	HIS 4 CE1	2957Å
		ARG 16.A CZ	LEU 6 CD2	3208Å
		GLU 20.A OE2	LEU 6 C	2459Å
		GLU 20.A CD	LEU 6 O	2554Å
		TYR 195.A OH	ILE 7 CD1	2794Å
		GLU 27.A OE1	ILE 8 C	2579Å

	GLU 27.A OE2	ILE 8 CA	2480Å
	LYS 24.A CE	CYS 9 CB	2771Å
	LYS 24.A CD	CYS 9 O	3628Å
	GLU 27.A O	ASN 10 ND2	2578Å
	GLU 27.A CB	ASN 10 CA	3564Å
RTRWALIICN	GLN 188.A NE2	TRP 4 CH2	2970Å
	PHE 8.A O	TRP 4 CZ2	3080Å
	PHE 8.A CB	TRP 4 NE1	2463Å
	PHE 8.A CE2	ALA 5 CA	2613Å
	ALA 7.A O	ILE 8 CG2	3685Å
	PHE 8.A CD2	ILE 8 CG1	2639Å
	PHE 8.A O	CYS 9 O	3389Å
	GLU 10.A CG	ASN 10 C	2469Å

Tabela 9 - Ligações de hidrogênio observadas entre aminoácidos da proteína GSDMD e os peptídeos RTRLALIICG e RTRGALIICN com seus respectivos comprimentos.

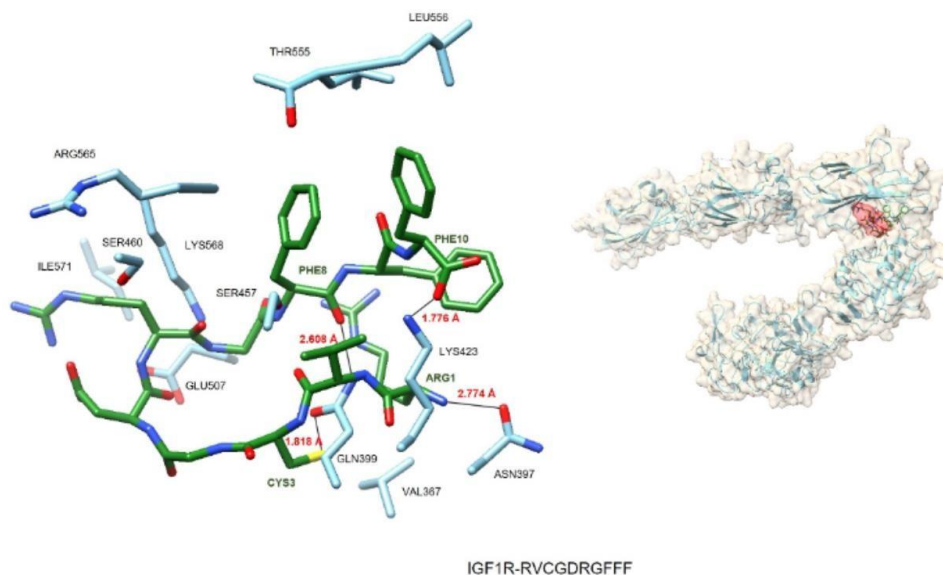
Proteína	Peptídeo	Aminoácidos da proteína	Aminoácidos do peptídeo	Comprimento da Ligação de H (Å)
GSDMD	RTRLALIICG	ALA 199.A O	ARG 3 NH2	3.478Å
	RTRGALIICN	LEU 88.A O	ARG 3 NH1	1.894Å

A expressão da proteína IGF1R - Receptor do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina 1- demonstrou estar relacionada a uma baixa sobrevivência em pacientes em câncer de mama com receptor hormonal positivo. Isso porque, essa proteína atua em vias de sinalização responsáveis pelo aumento da proliferação tumoral, influencia a produção de citocinas que auxiliam na remodelação da matriz celular e no desenvolvimento de um tumor agressivo (Obr *et al.*, 2018).

O *docking* entre o peptídeo RVCGDRGFFF e a proteína IGF1R havia demonstrado que o peptídeo se insere na interface entre um dos domínios ricos em leucina (L) e um dos domínios de fibronectina (FnIII-1). No entanto, verificou-se que a conformação apresentava resíduos que não interagem bem devido a impedimentos estéricos, como os resíduos GLN399 e LYS423. Embora não tenha apresentado uma pose válida no *docking*, procedeu-se com as simulações de dinâmica molecular para este complexo, na qual, após a retirada dos impedimentos estéricos, uma conformação válida

foi atingida.

Figura 8 - Estrutura IGF1R-RVCGDRGFFF (complexo proteína alvo – peptídeo original). À direita o complexo inteiro com as superfícies moleculares com a estrutura da proteína em azul e do peptídeo em verde, e à esquerda uma aproximação da região de interação com destaque para as cadeias laterais mais próximas entre as moléculas.



Estabelecendo uma comparação com as sequências aprimoradas, observamos que as três sequências modificadas se inseriram em regiões próximas à original. A sequência RVCGDRGFCF (Figura 9-A) se localizou na parte mais externa do meio da molécula, não ficando encoberta pela proteína. Apesar de permitir contatos, essa posição exposta tende a gerar interações menos estáveis e mais suscetíveis à influência do solvente, o que pode reduzir sua afinidade global. Em contraste, os peptídeos RVCGDRGFFC (Figura 9-B) e CVCGRGFFFF (Figura 9-C) apresentaram um padrão de ancoragem mais envolto pela estrutura da IGF1R, sugerindo um encaixe mais firme e protegido pela proteína. Esse tipo de posicionamento é relevante, pois amplia a superfície de contato e favorece a formação de interações não covalentes adicionais que podem contribuir para maior estabilidade do complexo. Além disso, ambos os peptídeos compartilharam uma interação recorrente com o resíduo GLU507, o que sugere a presença de um possível “hotspot” de ligação, reforçando a plausibilidade dessas interações. Os três peptídeos modificados apresentaram interações do tipo ligação de hidrogênio com a proteína-alvo. Os peptídeos RVCGDRGFCF e RVCGDRGFFC formaram uma ligação de hidrogênio cada, enquanto o peptídeo CVCGRGFFFF formou duas ligações de hidrogênio (Tabela 11).

Tabela 10 - Distâncias entre os aminoácidos da proteína alvo IGF1R e peptídeos que se apresentaram menores que 4 Å.

Proteína Central	Peptídeo	Aminoácidos Proteína Central	Aminoácidos Peptídeos	Distância da Ligação em Å
IGF1R	RVCGDRGFCF	MET 558.A CE	PHE 8 CZ	3222Å
		ARG 488.A CZ	PHE 10 C	2825Å
		ARG 488.A NH2	PHE 10 O	3236Å
		MET 558.A CE	PHE 10 CE1	3203Å
		ARG 488.A CD	PHE 10 CA	3802Å
		ARG 488.A NE	PHE 10 O	2583Å
	RVCGDRGFFC	GLU 459.A OE1	GLY 4 CA	2594Å
		GLU 459.A CD	GLY 4 C	3417Å
		CYS 458.A O	GLY 4 O	2068Å
		CYS 458.A CA	GLY 4 O	2973Å
		GLU 428.A OE1	ASP 5 O	3174Å
		GLN 400.A CB	ARG 6 CG	2737Å
		GLN 400.A N	ARG 6 NH1	3305Å
		GLN 399.A OE1	ARG 6 NH2	2731Å
		SER 457.A O	GLY 7 CA	2691Å
		SER 460.A OG	GLY 7 O	3526Å
		LYS 568.A NZ	PHE 8 CE2	2255Å
		LYS 568.A CD	PHE 9 N	2978Å
		LYS 568.A CB	PHE 9 CB	3144Å
		GLU 507.A CB	PHE 9 CE2	2770Å
		LYS 568.A O	PHE 9 CD1	3301Å
	CVCGDRGFFF	VAL 462.A CB	PHE 9 CE1	3425Å
		VAL 462.A CG1	PHE 9 CZ	3155Å
		ASN 504.A ND2	CYS 3 O	3083Å
		ASN 504.A CG	CYS 3 O	3098Å
	CVCGDRGFFF	ASN 504.A CB	CYS 3 O	2341Å
		ASN 504.A O	GLY 4 CA	3918Å

THR 506.A CG2	ASP 5 N	3043Å
GLU 345.A OE1	ARG 6 C	3794Å
SER 342.A OG	ARG 6 NH1	2320Å
ALA 341.A CB	ARG 6 CD	2967Å
TRP 404.A CZ2	PHE 8 O	2783Å
GLU 507.A OE2	PHE 9 CD1	3119Å
GLU 507.A OE2	PHE 9 CE1	3133Å
HIS 406.A ND1	PHE 10 CD1	2909Å
HIS 406.A CG	PHE 10 CE1	3546Å
HIS 406.A CD2	PHE 10 CE2	3670Å
HIS 406.A NE2	PHE 10 CD2	3129Å

Tabela 11 - Ligações de hidrogênio observadas entre aminoácidos da proteína IGF1R e os peptídeos RVCGDRGFCF, RVCGDRGFFC e CVCGDRGFFF com seus respectivos comprimentos.

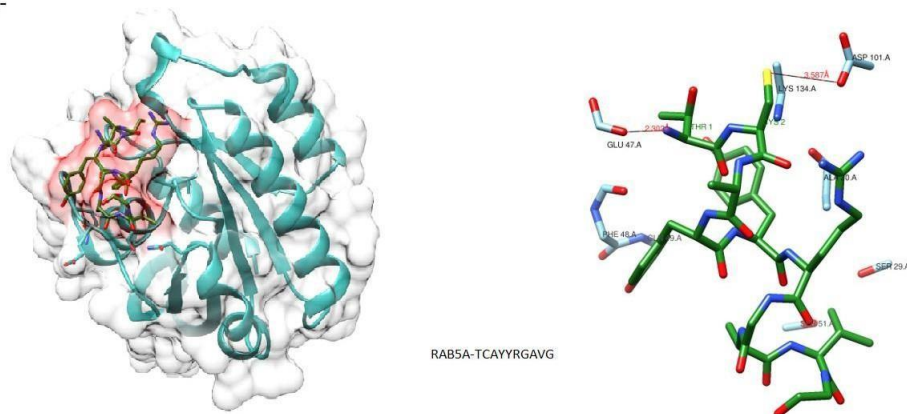
Proteína	Peptídeo	Aminoácidos da proteína	Aminoácidos do peptídeo	Comprimento da Ligação de H (Å)
IGF1R	RVCGDRGFCF	TYR 487.A O	CYS 9 SG	3.519Å
	RVCGDRGFFC	GLU 507.A OE2	CYS 10 SG	3.559Å
	CVCGDRGFFF	THR 506.A OG1	ASP 5 OD1	2.609Å
		SER 370.A OG	ARG 6 O	2.636Å

A alta taxa de expressão de RAB5A - Proteína relacionada a Ras Rab-5A - é um importante biomarcador no câncer de mama. Essa proteína, que pertence a uma família composta por outras três isoformas, RAB5A, RAB5B e RAB5C, encontra-se presente em diferentes cânceres, como câncer de mama, de pulmão e de ovário. No câncer de mama triplo-negativo, RAB5A atua na polarização de macrófagos e na maturação dos endossomos, influenciando na progressão da doença (Qiao *et al.*, 2024).

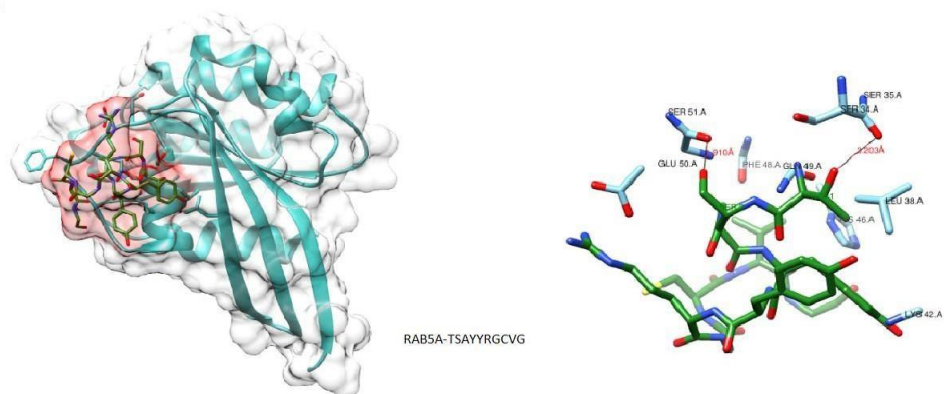
No trabalho anterior, o *docking* entre a proteína RAB5A e o peptídeo TSAYYRGAVG não foi incluído entre os melhores resultados por apresentar energia global abaixo de – 20. No entanto, o *docking* realizado com as sequências aprimoradas demonstrou ligações aparentando um bom encaixe no complexo. Os três peptídeos tiveram suas ligações na proteína em regiões similares entre si (Figura 10).

Figura 10 - Ligação dos peptídeos selecionados TCAYYRGAVG (A), TSAYYRGCVG (B), CSAYYRGAVG (C), à proteína alvo RAB5A. À esquerda o complexo inteiro com as superfícies moleculares com a estrutura da proteína em azul e do peptídeo em verde, e à direita uma aproximação da região de interação com destaque para as cadeias laterais mais próximas entre as moléculas.

A-



B-



C-

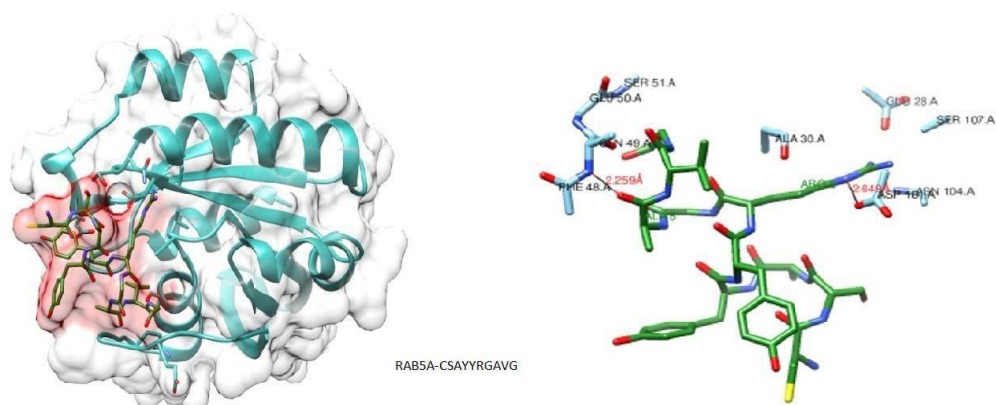


Tabela 12 - Distâncias entre os aminoácidos da proteína alvo RAB5A e peptídeos que se apresentaram menores que 4 Å.

Proteína Central	Peptídeo	Aminoácidos Proteína Central	Aminoácidos Peptídeo	Distância da Ligação em Å
RAB5A	TCAYYRGAVG	LYS134.A NZ	CYS 2 CA	2548Å
		LYS 134.A CD	CYS 2 SG	2.313Å
		PHE 48.A C	TYR 4 OH	2.489Å
		PHE 48.A CA	TYR 4 CZ	2.626Å
		GLU 47.A O	TYR 4 CDZ	2.991Å
		GLN 49.A O	TYR 4 CE2	2.528Å
		ALA 30.A O	TYR 5 CD2	2.637Å
		ALA 30.A CB	TYR 5 CB	2.702Å
		ALA 30.A CA	TYR 5 CG	3.570Å
		GLN 79.A NE2	VAL 9 CG1	2.872Å
		GLN 79.A CD	VAL 9 CG1	2.613Å
		SER 29.A OG	VAL 9 CG2	2.588Å
	TSAYYRGCVG	LEU 38.A CG	THR 1 CG2	2.948Å
		GLN 49.A NE2	THR 1 N	2.464Å
		GLU 50.A N	ALA 3 CB	2.725Å
		LYS 42.A NZ	TYR 4 CE2	2.264Å
		GLN 44.A OE1	TYR 4 CZ	2.709Å
		HIS 46.A CE1	TYR 4 CD1	2.625Å
		LEU 58.A CD1	TYR 5 OH	2.924Å
		GLU 50.A CD	ARG 6 NH1	2.851Å
		GLU 50.A OE1	ARG 6 NH1	2.439Å
		HIS 46.A CD2	VAL 9 CG1	3.585Å
		PHE 48.A O	VAL 9 CG2	2.371Å
		HIS 46.A NE2	GLY 10 O	2.460Å
	CSAYYRGAVG	LYS 140.A NZ	SER 2 N	2.460Å
		THR 103.A OG1	SER 2 CB	3.640Å

LEU 137.A CD1	TYR 5 CD2	2.636Å
LYS 140.A CE	TYR 5 CE2	3.532Å
LEU 137.A CD2	TYR 5 CE2	3.060Å
ASN 104.A ND2	ARG 6 NH1	2.011Å
ASN 103.A CG	ARG 6 CZ	3.237Å
ASP101.A CB	ARG 6 NH2	2.668Å
SER 107.A OG	ARG 6 NH2	2.542Å
ALA 30.A CB	ARG 6 CB	2.736Å
ALA 30.A O	ARG 6 CG	2.817Å
LYS 134.A NZ	ARG 6 N	3.078Å
GLU 47.A O	ALA 8 O	2.563Å
PHE 48.A CA	ALA 8 O	2.816Å
GLU 47.A OE2	ALA 8 CB	3.496Å
GLN 49.A O	VAL 9 C	2.504Å
GLN 49.A CB	VAL 9 O	2.411Å
SER 51.A N	GLY 10 CA	3.305Å

Tabela 13 - Ligações de hidrogênio observadas entre aminoácidos da proteína RAB5A e os peptídeos TCAYYRGAVG, TSAYYRGCVG e CSAYYRGAVG com seus respectivos comprimentos.

Proteína	Peptídeo	Aminoácidos da proteína	Aminoácidos do peptídeo	Comprimento da Ligação de H (Å)
RAB5A	TCAYYRGAVG	GLU 47.A OE2	THR 1 N	2.302Å
		ASP 101.A OD1	CYS 2 SG	3.587Å
		SER 35.A OG	TYR 5 OH	2.520Å
	TSAYYRGCVG	SER 34.A O	THR 1 OG1	3.203Å
		ASP 75.A OD2	THR 1 OG1	2.955Å
		GLU 50.A O	SER 2 OG	1.910Å
		GLN 44.A NE2	TYR 4 OH	2.894Å
	CSAYYRGAVG	ASP 101.A OD1	ARG 6 NE	2.649Å
		GLN 49.A N	ALA 8 O	2.259Å

Embora o peptídeo CSAYYRGAVG tenha apresentado o menor número de ligações de hidrogênio em comparação aos demais peptídeos avaliados para a mesma proteína (Tabela 13), é possível observar na Tabela 12 que este peptídeo obteve o maior número de aproximações inferiores a 4 Å, sugerindo a presença de múltiplas interações intermoleculares que podem favorecer a estabilidade da interação peptídeo-proteína.

Além da avaliação estrutural, foi realizada também a avaliação da energia global e interações físicas para a seleção das sequências que seriam utilizadas para etapas posteriores. Assim, foram verificados: energia de contato atômico (ACE), energias de Van der Waals atrativas e repulsivas (aVdW e rVdW) e energia proveniente de ligações de hidrogênio (HB). Os valores se encontram na Tabela 14. Em negrito são mostrados os peptídeos originais e em texto normal as sequências modificadas.

Tabela 14 - Resultados de energia relacionados à estabilização dos complexos proteína alvo - peptídeo originais (em negrito) e modificados (texto normal) fornecidos pelo *software* Firedock.

Proteína central	Peptídeo	glob	ACE	aVdW	rVdW	HB
MCF-7						
ANXA5	CLIINNKNF	-23.6	-4.36	-13.85	7.1	-0.5
	CLWINNKNF	-7.10	-3.54	-18.15	12.82	-0.65
	CLIWNNKNF	-9.02	0.49	-21.78	6.19	-3.11
	CLIIWNKNF	-13.59	-3.98	-18.36	5.76	-0.72
AXL	MEPWRQCAQW	-38.55	-5.91	-26.38	14.94	-1.97
	MFPWRQCAQW	-22.67	-1.48	-27.61	10.24	0.00
	MEPWRQYAQW	-18.05	-7.36	-19.73	12.45	-1.20
	YEPWRQCAQW	-21.06	-5.72	-27.60	18.72	-3.81
	MEPWRQCFQW	-6.88	-6.77	-28.88	26.88	-4.47
	MEPWRQCYQW	-10.38	0.70	-23.71	6.86	-3.61
MDA-MB-231						
RAB5A	TSAYYRGAVG	-16.39	0.54	-21.04	15.85	-1.68
	TCAYYRGAVG	-3.98	-5.79	-23.54	12.46	-2.83
	TSAYYRGCVG	-11.53	-2.21	-20.25	9.71	-6.63
	CSAYYRGAVG	-8.03	-3.08	-17.54	4.63	-2.57
IGF1R	RVCGDRGFFF	-50.95	-1.47	-24.22	8.80	-4.51
	RVCGDRGFCF	-21.76	0.73	-34.36	12.70	-4.30
	RVCGDRGFFC	-16.33	2.53	-20.97	1.64	-0.92
	CVCGDRGFFF	-26.17	0.63	-29.20	6.52	-2.65

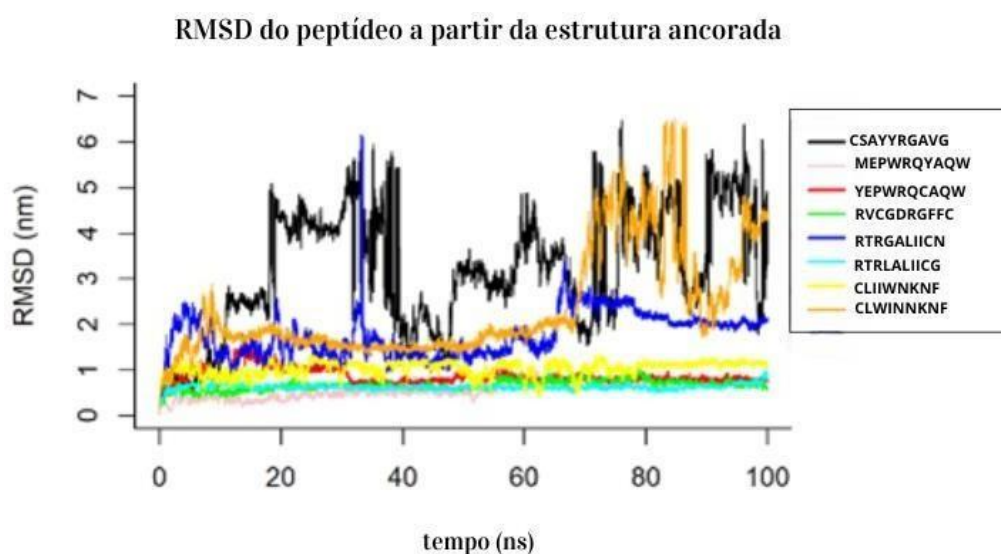
GSDMD	RTRLALIICN	-46.74	-8.20	-20.70	5.16	-0.99
	RTRLALIICG	-9.56	0.03	-21.62	5.31	-0.99
	RTRGALIICN	-11.51	-2.58	-17.47	4.17	-3.89
	RTRHALIICN	-18.99	-7.21	-19.95	6.91	-1.32
	RTRWALIICN	-14.82	-8.54	-19.31	7.35	-2.08

A partir dos resultados da análise estrutural e de energia obtidos com o *docking* molecular, foram selecionadas as melhores sequências para seguir para a dinâmica molecular. Tal análise foi realizada com base em três critérios: *score* Anticp, *score* Vaxijen e energia global. Assim, para a linhagem MCF-7, foram selecionados quatro peptídeos: CLWNNKNF e o CLIIWNKNF capazes de se ligar à proteína ANXA5; YEPWRQCAQW e MEPWRQYAQW capazes de se ligar à proteína AXL. Em relação à linhagem MDA-MB-231 também foram selecionados quatro peptídeos: CSAYYRGAVG capaz de se ligar à proteína RAB5A; RVCGDRGFFC capaz de se ligar à proteína IGF1R; e RTRLALIICG e RTRGALIICN capazes de se ligar à proteína GSDMD. Observa-se que, apesar de apresentarem valores de energia global maiores em relação aos complexos realizados com os peptídeos originais (portanto, menor estabilidade) tais modificações indicam maior potencial antitumoral e menor potencial imunogênico tornando tais modificações interessantes do ponto de vista terapêutico.

5.3. Dinâmica molecular

Os experimentos de dinâmica molecular foram realizados a fim de se validar os resultados obtidos a partir do experimento com *docking* molecular e para que se confirmassem as moléculas que seguiram para os experimentos de bancada a seguir. Os resultados obtidos permitiram eliminar quatro das oito sequências selecionadas no tópico anterior. Para a dinâmica, são utilizadas as estruturas tridimensionais do complexo formado entre o peptídeo e a proteína obtidas no *docking*. A partir disso, há a montagem do sistema, quanto ao solvente e íons, mimetizando um ambiente fisiológico. Durante a simulação, os átomos interagem entre si devido aos potenciais de energia atribuídos levando em consideração as ligações de Van der Waals, ligação de hidrogênio, interações hidrofóbicas e interações eletrostáticas. Assim, é possível obter trajetórias resultantes do processo, o que resulta na avaliação da conformação e estabilidade do complexo peptídeo-proteína (Figura 11).

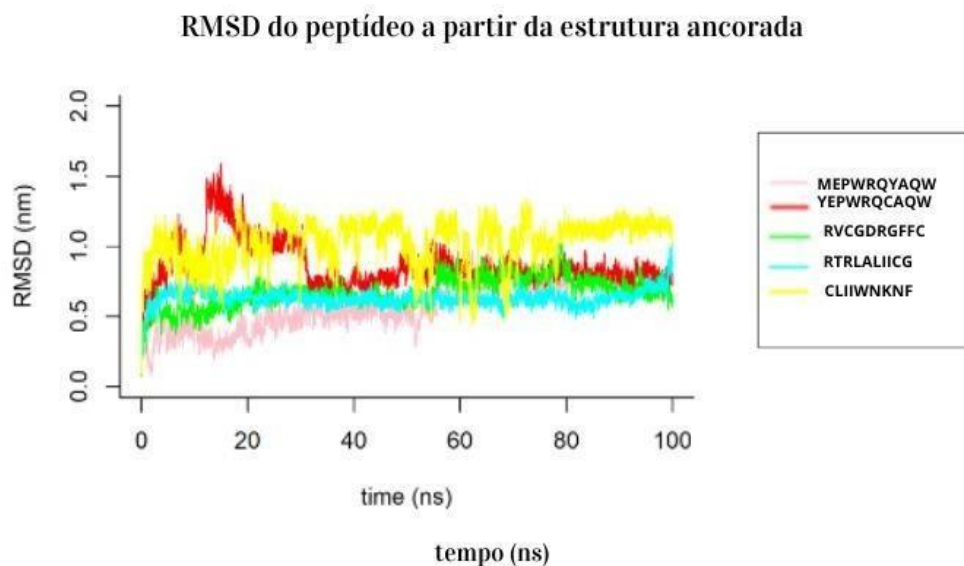
Figura 11 - RMSD dos peptídeos ancorados às suas respectivas proteínas alvo.



Pelo RMSD dos peptídeos, CSAYYRGAVG e CLWINNKNF (Figura 11) exibiram um comportamento altamente dinâmico e instável. O peptídeo CSAYYRGAVG demonstrou uma grande e abrupta oscilação a partir de aproximadamente 10 ns, sugerindo uma rápida dissociação do sítio de ligação. Similarmente, CLWINNKNF mostrou uma oscilação significativa em torno de 70 ns, indicando que não foi capaz de manter sua conformação e interação com a proteína-alvo por todo o período da simulação. A incapacidade de ambos os peptídeos em permanecerem ancorados no sítio por um período superior a 100 ns justificou sua exclusão. O peptídeo RTRGALIICN embora tenha demonstrado períodos de relativa estabilidade, também apresentou grandes variações de RMSD ao longo da simulação. A estabilidade intermitente pode indicar que ele se move para outros resíduos, mas não se mantém de forma consistente no sítio de ligação primário, resultando em sua eliminação da análise. Os demais peptídeos apresentaram maior estabilidade. Para que tenha uma visualização mais detalhada de determinadas trajetórias do RMSD, foi elaborada a Figura 12. Como pode ser observado nela, o peptídeo CLIIWNKNF demonstra oscilações frequentes durante todo o período da simulação sendo eliminado das análises subsequentes. Os peptídeos RTRLALIICG e MEPWRQYAQW apresentaram trajetórias mais estáveis, mantendo-se no sítio de ligação ao longo da simulação de 100 ns, dessa forma sendo selecionados. O peptídeo YEPWRQCAQW tem sua trajetória variada até 30 ns, porém, depois atinge um platô de estabilidade que se manteve até o final da simulação. Essa estabilização tardia, mas duradoura, justifica sua seleção para as próximas etapas. Por fim, o complexo RVCGRGFFC também apresenta

trajetória estável. Dessa forma, foram selecionados quatro peptídeos para a execução da síntese orgânica.

Figura 12 - RMSD dos complexos proteína alvo - peptídeo.



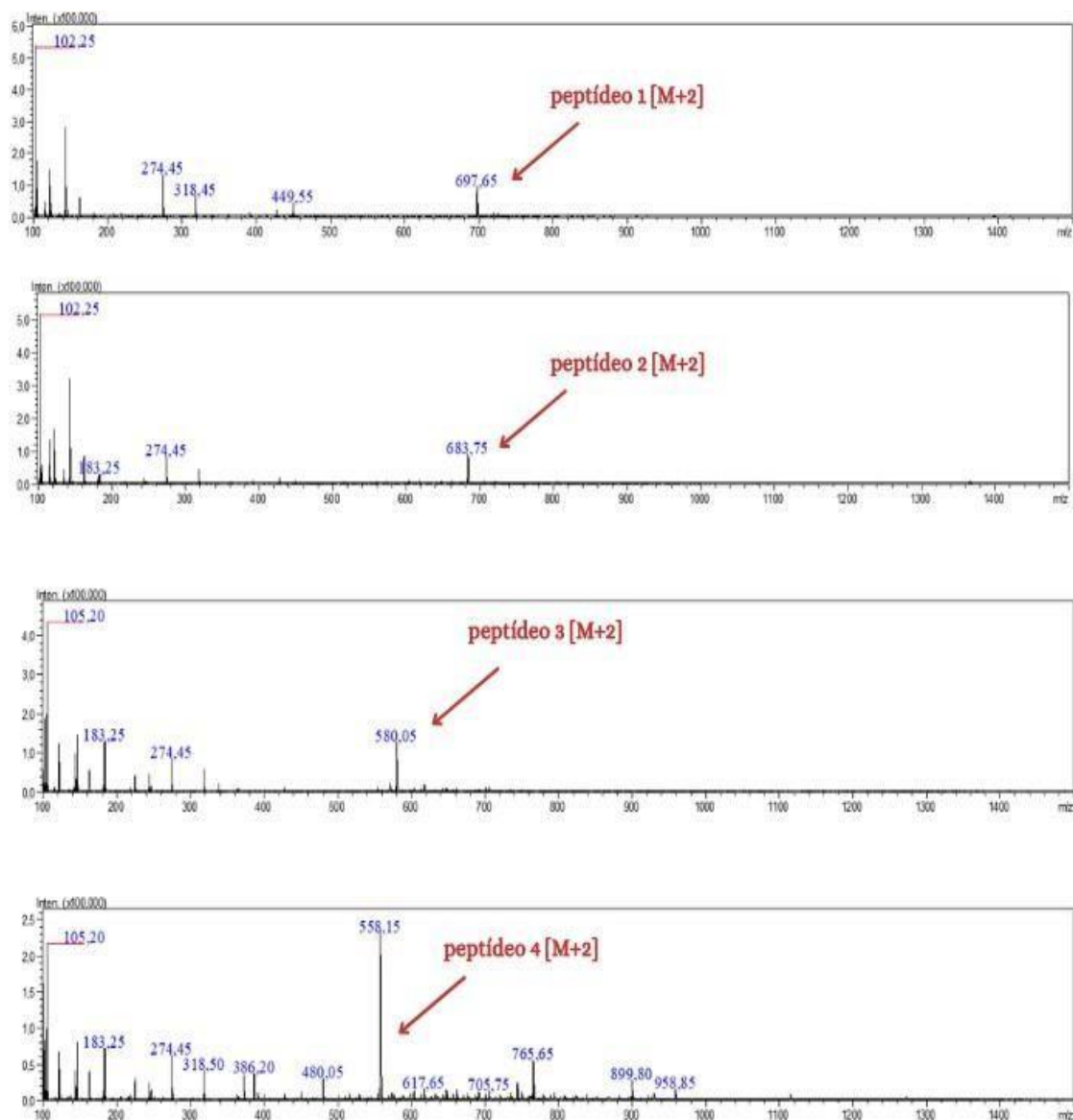
5.4. Síntese e caracterização de peptídeos

Com base nos resultados da análise *in silico*, os peptídeos MEPWRQYAQW, YEPWRQCAQW da linguagem MCF-7 e RVCGDRGFFC, RTRLALIICG da linhagem MDA-MB-231 foram selecionados para a etapa de síntese. Feita a síntese, os peptídeos foram encaminhados para análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa para confirmação de sua identidade (Figura 13) e grau de pureza. Para o preparo, 2 mg das amostras foram solubilizadas em diferentes solventes conforme a tabela abaixo (Tabela 15).

Tabela 15 - Preparo e solubilização das sequências peptídicas para posterior caracterização.

Sequência peptídica		Solvente utilizado
MEPWRQYAQW		Água MilliQ
YEPWRQCAQW		Água MilliQ
RVCGDRGFFC	Solução de acetonitrila e água MilliQ 83,3: 16,7 % (v/v)	
RTRLALIICG	Solução de acetonitrila e água MilliQ: 80: 19 % (v/v) e 1% B-mercaptoetanol	

Figura 13 - Espectro de massas dos peptídeos analisados no LC-MS-MS, destacando os picos correspondentes às massas de cada peptídeo sintetizado. O peptídeo 1 corresponde ao MEPWRQYAQW, o peptídeo 2 ao YEPWRQCAQW, o peptídeo 3 ao RVCGRGFFC, e o peptídeo 4 ao RTRLALIICG.



Realizada a análise por espectrometria de massas, procedeu-se com o cálculo da pureza, conforme a equação abaixo.

$$\text{Pureza (\%)} = \frac{\text{Soma da intensidade dos íons do peptídeo} \times 100}{\text{Soma da intensidade dos íons totais}}$$

A tabela 16 demonstra as sequências peptídicas e as purezas resultantes.

Tabela 16 - Sequências peptídicas e suas respectivas purezas.

Sequência peptídica	Pureza obtida na SPFS com <i>rink amide resin LL (%)</i>
MEPWRQYAQW	100%
YEPWRQCAQW	67%
RVCGDRGFFC	51%
RTRLALIICG	100%

Proteínas podem se organizar em diferentes estruturas secundárias, sendo as estruturas em alfa-hélice e folha beta as mais observadas. A formação das estruturas está relacionada ao tipo de aminoácido presente na sequência, de forma que alguns aminoácidos podem favorecer uma estrutura em detrimento de outra, como por exemplo a presença de histidina, metionina, leucina, ácido glutâmico e alanina que favorecem a formação da alfa-hélice. Em contrapartida, outros aminoácidos são mais prováveis de serem encontrados em estruturas de folha-beta, como glicina, prolina e serina (Banerjee *et al.*, 2018).

Observando as estruturas dos peptídeos originais e dos peptídeos derivados da linhagem MCF-7, é possível verificar que não houve alteração na estrutura secundária inicial dos peptídeos em comparação às estruturas aprimoradas após a alteração dos resíduos, de forma que os peptídeos continuam se comportando em estruturas em alfa-hélice (Tabela 17). O mesmo acontece para os peptídeos originais e os peptídeos derivados da linhagem MDA-MB-231, não sendo observadas mudanças quanto à organização da estrutura secundária inicial (Tabela 18 e 19).

Tabela 17 - Representação da estrutura linear e estrutura secundária 3D do peptídeo original e dos peptídeos derivados da linhagem MCF-7, obtida pelos *softwares* ferramentas Pepdraw e PEP-FOLD4, respectivamente. Em cinza destacado o aminoácido alterado em comparação ao do peptídeo original.

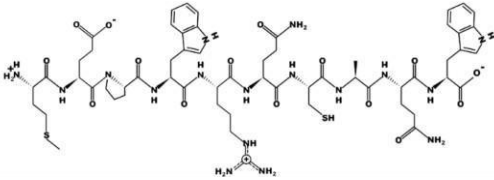
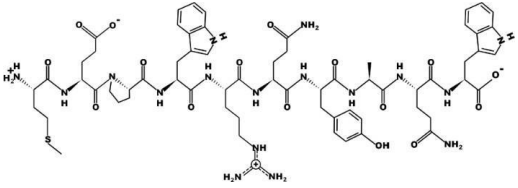
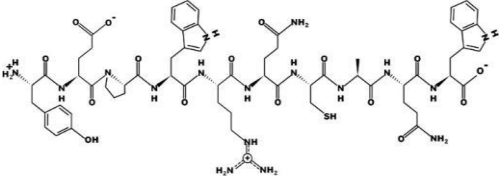
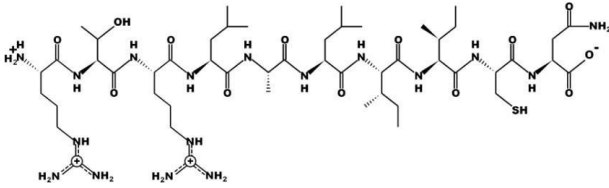
Peptídeo	Estrutura Linear	Estrutura Secundária
<u>Peptídeo original</u>		
MEPWRQCAQW		
<u>Peptídeos derivados</u>		
MEPWRQ Y AQW		
Y EPWRQCAQW		

Tabela 18 - Representação da estrutura linear e estrutura secundária 3D dos peptídeos originais e dos peptídeos derivados da linhagem MDA-MB-231, obtida pelos *softwares* ferramentas Pepdraw e PEP-FOLD4, respectivamente. Em cinza destacado o aminoácido alterado em comparação ao do peptídeo original.

Peptídeo	Estrutura Linear	Estrutura Secundária
<u>Peptídeo original</u>		
RTRLALIICN		
<u>Peptídeo derivado</u>		

RTRLALIIC**G**

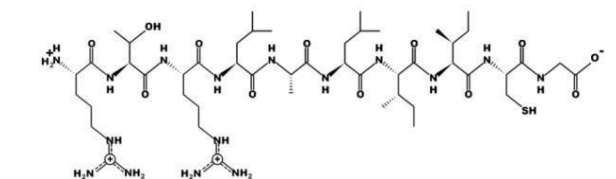


Tabela 19 - Representação da estrutura linear e estrutura secundária 3D dos peptídeos originais dos peptídeos derivados da linhagem MDA-MB-231, obtida pelos softwares ferramentas Pepdraw e PEP-FOLD4, respectivamente. Em cinza destacado o aminoácido alterado em comparação ao do peptídeo original.

Peptídeo	Estrutura Linear	Estrutura Secundária
<u>Peptídeo original</u>		
RVCGDRGFFF		
<u>Peptídeo derivado</u>		
RVCGDRGFFF C		

Em comparação às estruturas secundárias em cada linhagem, compreende-se que, na linhagem MCF-7, todos os peptídeos se comportam em estruturas alfa-hélice, o que pode ser explicado pela presença de resíduos de metionina, ácido glutâmico e alanina, que demonstraram serem mais frequentes nesse tipo de estrutura. Adicionalmente, na linhagem MDA-MB-231, as sequências que se apresentaram em alfa-hélice são aquelas compostas por dois resíduos de leucina e 1 resíduo de alanina próximos na sequência, demonstrados anteriormente como favoráveis à formação da hélice. As sequências peptídicas que se apresentam em folha beta nesta linhagem mantêm em sua estrutura dois resíduos de glicina, que apresentam baixa propensão a formação da hélice, e grupos volumosos alocados próximos (dois resíduos de fenilalanina), que podem causar impedimento estérico e favorecer a formação da estrutura em folhas-beta em detrimento a alfa-hélice (Haimov; Srebnik, 2016).

No presente trabalho, foram propostas modificações em sequências peptídicas com potencial atividade antitumoral, gerando versões melhoradas que foram comparadas com suas sequências originais. A avaliação foi realizada a partir de certos parâmetros

cruciais para a produção de um possível fármaco antitumoral com probabilidade de atividade anticâncer (AntiCP), antigenicidade (VaxiJen) e energia global de interação obtida por meio do FireDock. Os resultados demonstraram que as quatro sequências peptídicas selecionadas apresentaram aumento na pontuação AntiCP e redução dos valores de VaxiJen, o que indica maior potencial antitumoral e menor risco de indução de resposta imunogênica indesejada. Por outro lado, a análise de energia global revelou que os peptídeos originais exibiram valores mais negativos, sugerindo interações intermoleculares energeticamente mais favoráveis em condições estáticas de docking.

Esse contraste entre métricas merece atenção. O AntiCP e o VaxiJen fornecem informações sobre propensões biológicas dos peptídeos, relacionadas à eficácia e segurança como potenciais fármacos. Já a energia global avaliada pelo FireDock reflete uma estimativa da afinidade inicial em um modelo estático e simplificado, que não contempla de forma integral a flexibilidade conformacional e o ambiente dinâmico do sistema biológico (Pantsar; Poso, 2018). Há estudos onde relatam que métodos de *docking*, são úteis para triagem inicial, mas apresentam limitações significativas quando utilizados isoladamente, devendo ser complementados por abordagens mais robustas, como simulações de DM (Li *et al.*, 2019). Em nosso estudo, as análises de dinâmica mostraram que, apesar das energias menos favoráveis em *docking*, os peptídeos melhorados foram capazes de manter interações estáveis e relevantes com as proteínas-alvo ao longo do tempo, demonstrando sua relevância como candidatos.

Quando comparamos os resíduos dos peptídeos originais e os melhorados, conseguimos ver substituições de aminoácidos que valem a discussão. Quanto aos do alvo AXL, o *MEPWRQCAQW* - *MEPWRQYAQW*: houve uma substituição do Cys7 pelo Tyr7. A introdução de um resíduo aromático com grupo hidroxila no lugar da cisteína potencializou interações de hidrogênio e empilhamento π , ampliando a superfície de contato e melhorando a estabilidade potencial da ligação (Shiroishi *et al.*, 2007). Em relação ao par *MEPWRQCAQW* - *YEPWRQCAQW*: substituição Met1 pelo Tyr1, Podemos perceber que a adição de um resíduo aromático na extremidade N-terminal favoreceu interações hidrofóbicas e π - π , o que pode contribuir para ancoragem mais eficiente ao sítio alvo (Shiroishi *et al.*, 2007).

Já para o par *RVCGDRGFFF* - *RVCGDRGFFC* (proteína-alvo IGF1R) houve substituição do Phe10 pelo Cys10. A troca de um resíduo aromático por uma cisteína reduziu a contribuição hidrofóbica terminal, mas abriu a possibilidade de novas interações via grupo tiol (Mazmanian *et al.*, 2016).

Para o alvo GSDMD, no par *RTRLALIICN* - *RTRLALIICG* a substituição foi feita entre Asn10 e Gly10. A presença da glicina na posição terminal pode ter aumentado

a flexibilidade conformacional, permitindo melhor adaptação ao sítio de interação. Essa característica pode justificar o desempenho favorável em AntiCP e VaxiJen, mesmo diante de uma energia global menos favorável (Baddam; Bowler, 2006).

VI. CONCLUSÃO

Este estudo representa um esforço metódico para selecionar e aprimorar peptídeos com potencial para combater o câncer de mama. Focando em proteínas-chave associadas a essa doença, como ANXA5, AXL, GSDMD, IGF1R e RAB5A, realizamos uma análise abrangente que combinou técnicas computacionais e experimentais.

Os resultados obtidos mostraram que os peptídeos otimizados demonstraram interações mais eficazes com as proteínas-alvo em comparação com seus equivalentes originais. Esses achados ressaltam o potencial terapêutico desses peptídeos na luta contra o câncer de mama.

Além disso, ao examinar as estruturas secundárias dos peptídeos, observamos padrões consistentes que podem ser cruciais para sua atividade e especificidade.

Ao integrar abordagens computacionais e experimentais, este estudo contribui significativamente para a compreensão e o desenvolvimento de terapias direcionadas ao câncer de mama. Esses peptídeos aprimorados representam promissoras opções terapêuticas que poderiam ser consideradas para estudos clínicos futuros, potencialmente oferecendo novas perspectivas no tratamento personalizado do câncer de mama e, possivelmente, de outros tipos de câncer.

VII. PERSPECTIVAS

Continuar o projeto através da síntese e análise do potencial citotóxico das estruturas mais promissoras a fim de se comparar com o resultado obtido para as moléculas precursoras.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, M. J.; MURTOLA, T.; SCHULZ, R.; PÁLL, S. *et al.* GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1-2, p. 19-25, 2015.

ADAM-ARTIGUES, A.; ARENAS, E. J.; MARTINEZ-SABADELL, A.; BRASO-MARISTANY, F. *et al.* Targeting HER2-AXL heterodimerization to overcome resistance to HER2 blockade in breast cancer. **Sci Adv**, v. 8, n. 20, p. eabk2746, 2022. 10.1126/sciadv.abk2746.

ALALUF, E.; SHALAMOV, M. M.; SONNENBLICK, A. Update on current and new potential immunotherapies in breast cancer, from bench to bedside. **Front Immunol**, v. 15, p. 1287824, 2024. 10.3389/fimmu.2024.1287824.

BADDAM, S.; BOWLER, B. E. Mutation of asparagine 52 to glycine promotes the alkaline form of iso-1-cytochrome c and causes loss of cooperativity in acid unfolding. **Biochemistry**, v. 45, n. 14, p. 4611-4619, 2006. 10.1021/bi0524971.

BANERJEE, J.; RADVAR, E.; AZEVEDO, H. S. 10 - Self-assembling peptides and their application in tissue engineering and regenerative medicine. *In*: BARBOSA, M. A. e MARTINS, M. C. L. (Ed.). **Peptides and Proteins as Biomaterials for Tissue Regeneration and Repair**: Woodhead Publishing, 2018. p. 245-281.

BEST, A.; GREENHALGH, T.; LEWIS, S.; SAUL, J. E. *et al.* Large-system transformation in health care: a realist review. **Milbank Q**, v. 90, n. 3, p. 421-456, 2012.

BILSKI, M.; KONAT-BASKA, K.; ZERELLA, M. A.; CORRADINI, S. *et al.* Advances in breast cancer treatment: a systematic review of preoperative stereotactic body radiotherapy (SBRT) for breast cancer. **Radiat Oncol**, v. 19, n. 1, p. 103, 2024. 10.1186/s13014-024-02497-4.

BRASIL, I. N. d. C. I.-. **Relatório Anual 2023: Dados e Números sobre Câncer de Mama**.

https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/relatorio_dados-e-numeros-ca-mama-2023.pdf, 2023. Acesso em: 07 janeiro de 2025.

BRASIL, M. S.-. **Radioterapia**. <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tratamento/radioterapia>, 2023. Acesso em: 14 de outubro de 2025.

CHANDRAN, S.; HARMEY, J. H.; TOOMEY, S. Inhibition of IGF signalling pathway in MDA-MB-231 triple negative breast cancer cells. **BMC Proceedings**, v. 6, Suppl. 4, 72

O14, 2012. 10.1186/1753-6561-6-S4-O14.

CHAUBE, B.; MALVI, P. Editorial: Cancer metabolism: molecular insights, metabolic crosstalk in the tumor microenvironment, and implications for therapy. v. Volume 13 - 2023, 2023. 10.3389/fonc.2023.1289397.

CHEN, C.; YE, Q.; WANG, L. A.-O.; ZHOU, J. *et al.* Targeting pyroptosis in breast cancer: biological functions and therapeutic potentials on It. v. n. 2058-7716 (Print),

CHENG, H.-F.; TSAI, Y.-F.; LIU, C.-Y.; HSU, C.-Y. *et al.* Prevalence of BRCA1, BRCA2, and PALB2 genomic alterations among 924 Taiwanese breast cancer assays with tumor-only targeted sequencing: extended data analysis from the VGH-TAYLOR study. **Breast Cancer Research**, v. 25, n. 1, p. 152, 2023. 10.1186/s13058-023-01751-z.

COVELER, A. L.; BATES, N. E.; DISIS, M. L. Progress in the development of a therapeutic vaccine for breast cancer. **Breast Cancer (Dove Med Press)**, v. 2, p. 25-36, 2010. 10.2147/bctt.s6956.

DERAKHSHAN, F.; REIS-FILHO, J. S. Pathogenesis of Triple-Negative Breast Cancer. **Annu Rev Pathol**, v. 17, p. 181-204, 2022. 10.1146/annurev-pathol-042420-093238.

DOYTCHINOVA, I. A.; FLOWER, D. R. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. **BMC Bioinformatics**, v. 8, n. 1, p. 4, 2007. 10.1186/1471-2105-8-4.

FALCONE, I.; CONCIATORI, F.; BAZZICHETTO, C.; BRIA, E. *et al.* AXL Receptor in Breast Cancer: Molecular Involvement and Therapeutic Limitations. **Int J Mol Sci**, v. 21, n. 22, 2020. 10.3390/ijms21228419.

FERNÁNDEZ-TORTOLERO, Á.; REIGOSA-YÁNIZ, A. Subtypes of luminal breast carcinoma according to the Saint Gallen Consensus in a group of Venezuelan patients. v. n. 2590-7379 (Electronic), 2021.

FIRUZPOUR, F.; BARANCHESHMEH, M.; ZIARANI, F. F.; KARAMI, L. *et al.* The HER2 target for designing novel multi-peptide vaccine against breast cancer using immunoinformatics and molecular dynamic simulation. **Biochem Biophys Rep**, v. 43, p. 102135, 2025. 10.1016/j.bbrep.2025.102135.

GARCIA, F. A. O.; DE ANDRADE, E. S.; PALMERO, E. I. Insights on variant analysis in silico tools for pathogenicity prediction. **Front Genet**, v. 13, p. 1010327, 2022. 10.3389/fgene.2022.1010327.

GHASEMI, M.; REIAZI, N.; BEHZAD-BEHBAHANI, A.; TAKHSHID, M. A.

Annexin-A5 Overexpression Increases Sensitivity of MCF-7 and MCF-7/ADR Cells to Epirubicin. **Avicenna J Med Biotechnol**, v. 16, n. 2008-2835 (Print), p. 5, 2024. 10.18502/ajmb.v16i1.14169.

GUEX, N.; PEITSCH, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, v. 18, n. 15, p. 2714-2723, 1997.

GUO, L.; KONG, D.; LIU, J.; ZHAN, L. *et al.* Breast cancer heterogeneity and its implication in personalized precision therapy. **Exp Hematol Oncol**, v. 12, n. 1, p. 3, 2023. 10.1186/s40164-022-00363-1.

HAIMOV, B.; SREBNIK, S. A closer look into the α -helix basin. **Sci Rep**, v. 5, n. 2045-2322 (Electronic), 2016. 10.1038/srep38341.

HAZARIKA, R. R.; SOSTARIC, N.; SUN, Y.; VAN NOORT, V. Large-scale docking predicts that sORF-encoded peptides may function through protein-peptide interactions in *Arabidopsis thaliana*. **PLoS ONE**, v. 13, n. 10, e0205179, 2018. 10.1371/journal.pone.0205179.

HUANG, Y.; ZENG, A.; SONG, L. Facts and prospects of peptide in targeted therapy and immune regulation against triple-negative breast cancer. **Front Immunol**, v. 14, p. 1255820, 2023. 10.3389/fimmu.2023.1255820.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: visual molecular dynamics. **J Mol Graph**, v. 14, n. 1, p. 33-38, 1996.

JOU, J.; HARRINGTON, K. J.; ZOCCA, M. B.; EHRNROOTH, E. *et al.* The Changing Landscape of Therapeutic Cancer Vaccines-Novel Platforms and Neoantigen Identification. **Clin Cancer Res**, v. 27, n. 3, p. 689-703, 2021. 10.1158/1078-0432.CCR-20-0245.

KAMEO, S.; AMORIM, B.; LIMA, R.; COSTA, J. *et al.* Gastrointestinal toxicities in women during breast cancer chemotherapy treatment. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 67, 2021. 10.32635/2176-9745.RBC.2021v67n3.1170.

KAMEO, S. Y.; AMORIM, B. F.; BARBOSA-LIMA, R.; COSTA, J. d. S. *et al.* Toxicidades Gastrointestinais em Mulheres durante Tratamento Quimioterápico do Câncer de Mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 67, n. 3, p. e-151170, 2021. 10.32635/2176-9745.RBC.2021v67n3.1170.

KAYA, A. O.; COSKUN U FAU - BUYUKBERBER, S.; BUYUKBERBER S FAU - BENEKLI, M.; BENEKLI M FAU - TEKIN, E. *et al.* Efficacy and toxicity of

preoperative chemotherapy with docetaxel and epirubicin in locally advanced invasive breast cancer. **J Buon**, v. 15, n. 1107-0625 (Print), p. 254, 2010.

LI, J.; FU, A.; ZHANG, L. An Overview of Scoring Functions Used for Protein-Ligand Interactions in Molecular Docking. **Interdiscip Sci**, v. 11, n. 2, p. 320-328, 2019. 10.1007/s12539-019-00327-w.

LIU, W.; TANG, H.; LI, L.; WANG, X. *et al.* Peptide-based therapeutic cancer vaccine: Current trends in clinical application. **Cell Prolif**, v. 54, n. 5, p. e13025, 2021. 10.1111/cpr.13025.

LONNING, P. E.; NIKOLAIENKO, O.; PAN, K.; KURIAN, A. W. *et al.* Constitutional BRCA1 Methylation and Risk of Incident Triple-Negative Breast Cancer and High-grade Serous Ovarian Cancer. **JAMA Oncol**, v. 8, n. 11, p. 1579-1587, 2022. 10.1001/jamaoncol.2022.3846.

MADUSHANKA, A.; MOURA, R. T., Jr.; VERMA, N.; KRAKA, E. Quantum Mechanical Assessment of Protein-Ligand Hydrogen Bond Strength Patterns: Insights from Semiempirical Tight-Binding and Local Vibrational Mode Theory. **Int J Mol Sci**, v. 24, n. 7, 2023. 10.3390/ijms24076311.

MAREI, H. E.; ALTHANI, A.; AFIFI, N.; HASAN, A. *et al.* p53 signaling in cancer progression and therapy. **Cancer Cell Int**, v. 21, n. 1, p. 703, 2021. 10.1186/s12935-021-02396-8.

MATTER, M. L.; GKRETSI, V. Editorial: Molecular regulation of tumor cells migration and metastatic growth. v. Volume 13 - 2023, 2023. 10.3389/fonc.2023.1329053.

MAZMANIAN, K.; SARGSYAN, K.; GRAUFFEL, C.; DUDEV, T. *et al.* Preferred Hydrogen-Bonding Partners of Cysteine: Implications for Regulating Cys Functions. **J Phys Chem B**, v. 120, n. 39, p. 10288-10296, 2016. 10.1021/acs.jpcc.6b08109.

O'SHEA, A. E.; CLIFTON, G. T.; QIAO, N.; HECKMAN-STODDARD, B. M. *et al.* Phase II Trial of Neli pepimut-S Peptide Vaccine in Women with Ductal Carcinoma In Situ. **Cancer Prev Res (Phila)**, v. 16, n. 6, p. 333-341, 2023. 10.1158/1940-6207.CAPR-22-0388.

OBR, A. E.; KUMAR, S.; CHANG, Y. J.; BULATOWICZ, J. J. *et al.* Insulin-like growth factor receptor signaling in breast tumor epithelium protects cells from endoplasmic reticulum stress and regulates the tumor microenvironment. **Breast Cancer Research**, v. 20, n. 1465-542X (Electronic), p. 9, 2018.

LEMKUL, J. A. From Proteins to Perturbed Hamiltonians: A Suite of Tutorials for the GROMACS-2018 Molecular Simulation Package [Article v1.0]. **Living Journal of Computational Molecular Science**, v. 1, n. 1, p. 5068, 2018. 10.33011/livecoms.1.1.5068.

PANTSAR, T.; POSO, A. Binding Affinity via Docking: Fact and Fiction. **Molecules**, v. 23, n. 8, 2018. 10.3390/molecules23081899.

PIERONI, M.; MADEDDU, F.; DI MARTINO, J.; ARCIERI, M. *et al.* MD-Ligand-Receptor: A High-Performance Computing Tool for Characterizing Ligand-Receptor Binding Interactions in Molecular Dynamics Trajectories. **Int J Mol Sci**, v. 24, n. 14, 2023. 10.3390/ijms241411671.

PIMENTEL, M. S. S. M.; MACÊDO, A. B. P. C. d.; COSTA, S. C.; ÁVILA, J. M. N. *et al.* EFEITOS ADVERSOS DA QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 10, n. 8, p. 1002-1011, 2024. 10.51891/rease.v10i8.15205.

PRINCE, G.; ASSI, A.; AOUDÉ, M.; KOURIE, H. R. *et al.* Melittin, A Potential Game-changer in the Fight Against Breast Cancer: A Systematic Review. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 25, n. 15, p. 1077-1084, 2025. 10.2174/0118715206347581250217045306.

QIAO, L.; DONG, C.; JIA, W.; SUN, G. A.-O. RAB5A in triple-negative breast cancer: a critical role in macrophage reshaping in an exosomal miR-21-dependent manner. LID - 10.1530/ERC-23-0257 [doi] LID - e230257. **Endocr Relat Cancer**, v. 31, n. 1479-6821 (Electronic), 2024.

RADEMAKER, L. M.; GAL, R.; MAY, A. M.; BATENBURG, M. C. T. *et al.* Side-effects in women treated with adjuvant endocrine therapy for breast cancer. **Breast**, v. 80, p. 104416, 2025. 10.1016/j.breast.2025.104416.

SALMASO, V.; MORO, S. Bridging Molecular Docking to Molecular Dynamics in Exploring Ligand-Protein Recognition Process: An Overview. **Front Pharmacol**, v. 9, p. 923, 2018. 10.3389/fphar.2018.00923.

SHI, M. Q.; XU, Y.; FU, X.; PAN, D. S. *et al.* Advances in targeting histone deacetylase for treatment of solid tumors. **J Hematol Oncol**, v. 17, n. 1, p. 37, 2024. 10.1186/s13045-024-01551-8.

SHIROISHI, M.; TSUMOTO, K.; TANAKA, Y.; YOKOTA, A. *et al.* Structural consequences of mutations in interfacial Tyr residues of a protein antigen-antibody complex. The case of HyHEL-10-HEL. **J Biol Chem**, v. 282, n. 9, p. 6783-6791, 2007. 10.1074/jbc.M605197200.

SWAIN, S. M.; SHASTRY, M.; HAMILTON, E. Targeting HER2-positive breast cancer: advances and future directions. **Nat Rev Drug Discov**, v. 22, n. 2, p. 101-126, 2023. 10.1038/s41573-022-00579-0.

TAN, K. P.; SINGH, K.; HAZRA, A.; MADHUSUDHAN, M. S. Peptide bond planarity constrains hydrogen bond geometry and influences secondary structure conformations. **Curr Res Struct Biol**, v. 3, p. 1-8, 2021. 10.1016/j.crstbi.2020.11.002.

TOBIAS, J.; GARNER-SPITZER, E.; DRINIC, M.; WIEDERMANN, U. Vaccination against Her-2/neu, with focus on peptide-based vaccines. **ESMO Open**, v. 7, n. 1, p. 100361, 2022. 10.1016/j.esmoop.2021.100361.

TORRAS, I.; CEBRECOS, I.; CASTILLO, H.; MENSION, E. Evolution of breast conserving surgery-current implementation of oncoplastic techniques in breast conserving surgery: a literature review. **Gland Surg**, v. 13, n. 3, p. 412-425, 2024. 10.21037/gs-23-454.

UNIPROT, C. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. **Nucleic Acids Res**, v. 47, n. D1, p. D506-D515, 2019. 10.1093/nar/gky1049.

VELOSO, G. C.; MAROTA, C. V. M.; NUNES, G. B. M. C.; RIBEIRO, I. G. *et al.* Fatores ambientais e comportamentais relacionados à ocorrência do câncer de mama. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 7, n. 2, p. e68609, 2024. 10.34119/bjhrv7n2-268.

WAKS, A. G.; WINER, E. P. Breast Cancer Treatment: A Review. **JAMA**, v. 321, n. 3, p. 288-300, 2019. 10.1001/jama.2018.19323.

WANG, B.; PEI, J.; XU, S.; LIU, J. *et al.* Recent advances in mRNA cancer vaccines: meeting challenges and embracing opportunities. **Front Immunol**, v. 14, p. 1246682, 2023. 10.3389/fimmu.2023.1246682.

WANG, L.; WANG, N.; ZHANG, W.; CHENG, X. *et al.* Therapeutic peptides: current applications and future directions. **Signal Transduct Target Ther**, v. 7, n. 1, p. 48, 2022. 10.1038/s41392-022-00904-4.

WEBB, B.; SALI, A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER.

Current Protocols in Bioinformatics, v. 54, n. 1, p. 5.6.1-5.6.37, 2016. 10.1002/cpbi.3.

WILCOX, N.; DUMONT, M.; GONZÁLEZ-NEIRA, A.; CARVALHO, S. *et al.* Exome sequencing identifies breast cancer susceptibility genes and defines the contribution of coding variants to breast cancer risk. v. n. 1546-1718 (Electronic), 2023.

XIONG, N.; WU, H.; YU, Z. Advancements and challenges in triple-negative breast cancer: a comprehensive review of therapeutic and diagnostic strategies. v. Volume 14 - 2024, 2024. 10.3389/fonc.2024.1405491.

YANG, X.; TANG, Z. Role of gasdermin family proteins in cancers (Review). **Int J Oncol**, v. 63, n. 3, 2023. 10.3892/ijo.2023.5548.

ZHANG, H.; ZHANG, Z.; GUO, T.; CHEN, G. *et al.* Annexin A protein family: Focusing on the occurrence, progression and treatment of cancer. **Front Cell Dev Biol**, v. 11, p. 1141331, 2023. 10.3389/fcell.2023.1141331.