

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

MATHEUS PINTOR BAPTISTA

Inibição da integrina $\alpha_v\beta_3$ em cultura celular 3D de células tumorais e endoteliais em ambiente hipóxico utilizando a desintegrina recombinante DisBa-01

São Carlos

2022

MATHEUS PINTOR BAPTISTA

Inibição da integrina $\alpha_v\beta_3$ em cultura celular 3D de células tumorais e endoteliais em ambiente hipóxico utilizando a desintegrina recombinante DisBa-01

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo

São Carlos

2022

MATHEUS PINTOR BAPTISTA

Inibição da integrina $\alpha_v\beta_3$ em cultura celular 3D de células tumorais e endoteliais em ambiente hipóxico utilizando a desintegrina recombinante DisBa-01

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Membros efetivos:

Prof^ª. Dr^ª. Maria Cristina da Silva Pranchevicius

Dr^ª. Kelli Cristina Micocci

Local: Sala 10 do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos (DGE/UFSCar)

Data: 11 de novembro de 2022

Horário: 09h00

São Carlos

2022

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ismar e Márcia, por todo o esforço e apoio incondicional na minha caminhada estudantil, além de todo o amor e inspiração a mim fornecidos durante toda a vida.

Aos meus irmãos, Gabriel e Felipe por toda a companhia e alegrias compartilhadas, vocês são extremamente importantes para tudo isso acontecer.

Aos meus avós, João, Vera, José e Jacira, por todo o cuidado, preocupação e afeto ao longo de todos os anos.

À toda a minha família, que são minha base.

Aos meus amigos, que me acolheram como uma família e que levarei para toda a vida, Adriele Serafim, Amanda Tejada, Beatriz Gusson, Bruna Santos, Bruno Ortega, Carlos Basali, Carlos Eduardo, Felipe Ribaldo, Heloisa Martin, Isabela Dolci, Izabella Bonatti, Letícia Poletti, Vitor Hugo, e toda a 018, além de tantas outras amizades que foram formadas ao longo dos anos.

À Professora Heloisa por me aceitar no LBBM, e à todas as pessoas que de alguma forma me auxiliaram dentro do laboratório, Aline, Aninha, Bianca, Grazi e especialmente à Bruna, por me ensinar as técnicas presentes nesse TCC.

Ao CNPq pelo fomento a esse projeto de pesquisa durante a graduação.

À coordenação do curso de Biotecnologia, ao secretário Rodrigo e a todos os professores, técnicos e pós graduandos que fizeram parte da minha formação como biotecnologista, minha eterna gratidão.

Por último, mas não menos importante, à Deus e à espiritualidade por olharem por mim e permitirem mais um passo nessa caminhada.

RESUMO

O câncer de mama apresenta alta incidência global, sendo o tipo de câncer mais fatal em 2020, ano no qual foram estimados 66.280 novos casos apenas no Brasil. As principais problemáticas associadas a tumores estão relacionadas ao seu comportamento metastático, ou seja, sua capacidade de migrar e invadir tecidos secundários. Esse processo se dá pela matriz extracelular no microambiente tumoral, e é sustentado pela angiogênese, contando com a mediação de ligantes celulares denominados integrinas. Simular o microambiente tumoral *in vitro* permite o entendimento dos processos de sinalização celular, o que pode ser feito pelo método de cultivo 3D. Dessa forma, é possível mimetizar as condições de interações celulares complexas, como é caso das interações tumorais, e, diferentemente do cultivo 2D, consegue-se atingir maior similaridade com os processos que ocorrem *in vivo*. Durante o cultivo, faz-se uso de um ambiente hipóxico para simular a depleção de oxigênio que ocorre no interior de massas tumorais, fator importante para desencadear diversas cascatas de sinalização celular. Assim, o presente projeto traz resultados sobre o uso da desintegrina DisBa-01 em cultura 3D de células tumorais (MDA-MB-231) e endoteliais (HUVEC) em ambientes de hipóxia e normóxia para análise de migração celular, composição da matriz extracelular e processo de angiogênese nas diferentes condições. A DisBa-01 foi expressa em sistema heterólogo e inoculada em concentrações de 10, 100 e 1000 nM nas culturas 3D de MDA-MB-231, com a adição da concentração de 2000 nM nas células endoteliais, fazendo com que houvesse inibição na migração das células tumorais em 10 e 1000 nM de desintegrina em ambas as oxigenações e inibição da migração de células endoteliais em todas as concentrações em normóxia e 1000 e 2000 nM de DisBa-01 em hipóxia. Os componentes da matriz extracelular foram analisados por imunofluorescência, demonstrando que a intensidade de integrina $\alpha_v\beta_3$ em normóxia aumentaram, e em hipóxia diminuíram, sem alterações na intensidade de colágeno tipo I em MDA-MB-231, e o efeito contrário em HUVEC, com uma diminuição na intensidade de integrina em normóxia e um aumento em hipóxia, com um aumento na intensidade de colágeno tipo I somente em normóxia, com a condição de hipóxia sem alterações. O processo de angiogênese *in vitro* foi realizado a partir de ensaios de brotamento de HUVEC em condições de normóxia, os quais demonstraram um bloqueio da angiogênese a partir do tratamento com a desintegrina DisBa-01, por meio da diminuição do número e do tamanho médio de brotos quando comparados ao grupo controle. Este trabalho, evidencia resultados promissores do uso de DisBa-01 em culturas 3D e reforça suas propriedades antimetastáticas e antiangiogênicas.

Palavras-chave: Integrina. Câncer de mama. Hipóxia. Metástase. Angiogênese. Cultura 3D.

ABSTRACT

Breast cancer has a high global incidence, it was the most fatal type of cancer in 2020, when 66,280 new cases were estimated just in Brazil. The main problems associated with tumors are related to their metastatic behavior, that is, their ability to migrate and get in secondary tissues. This process takes place through the extracellular matrix and is supported by angiogenesis, relying on the mediation of cell ligands called integrins. Simulating the tumor microenvironment *in vitro* allows the understanding of cell signaling processes, which can be done by 3D culture. Thus, it is possible to mimic the conditions of complex cell interactions, such as tumor interactions, and, unlike 2D culture, it is possible to achieve greater similarity with *in vivo* processes. During the cell culture, a hypoxic environment will be used to simulate the oxygen depletion that occurs inside tumor masses, an important factor in triggering several cell signaling cascades. The current work brings results about the use of disintegrin DisBa-01 in 3D culture of tumor (MDA-MB-231) and endothelial cells (HUVEC) in hypoxia and normoxia environments, in order to analyze the cell migration, extracellular matrix composition and angiogenesis process under those different conditions. DisBa-01 was expressed in a heterologous system and inoculated at concentrations of 10, 100, 1000 nM in 3D cultures of MDA-MB-231, with the addition of 2000 nM's concentration in endothelial cells, resulting in the inhibition of cell migration of tumoral cells with 100 and 1000 nM of disintegrin in both oxygen conditions, and inhibition of cell migration of endothelial cells in all concentrations in normoxia and 1000 and 2000 nM of DisBa-01 in hypoxia. The extracellular matrix components was analyzed by immunofluorescence, evidencing that the intensity of $\alpha_v\beta_3$ integrin in normoxia increased, and in hypoxia decreased, without differences in collagen type I intensity in MDA-MB-231, and the opposite effect in HUVEC, with a decrease in the integrin's intensity in normoxia and its increase in hypoxia, with the increase of collagen type I intensity just in normoxia, with no differences in hypoxia. The *in vitro* angiogenesis process was performed by a HUVEC sprouting assay in normoxic conditions, which demonstrated an angiogenic blockage with the DisBa-01 disintegrin treatment, by the decrease of number and mean size of sprouts beside the control group. This work evidences promising results of the use of DisBa-01 in 3D cultures, and reinforces its antimetastatics and antiangiogenic properties.

Keywords: Integrin. Breast Cancer. Hypoxia. Metastasis. Angiogenesis. 3D Culture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação das famílias de receptores de integrinas.....	14
Figura 2 - Aspecto geral do complexo de ligação da DisBa-01 (Azul) com as subunidades α_v (Cinza) e β_3 (Amarelo) da integrina $\alpha_v\beta_3$	19
Figura 3: Imagem representativa do molde de silicone (A), do molde de silicone preenchido com agarose (B), do desmolde da agarose micromoldada (C) e do micromolde de agarose (D).	26
Figura 4 - Padrão de bandas das amostras T ₀ , T ₃ , S ₁ e S ₂ após corrida em gel de SDS-Page....	30
Figura 5 - Géis SDS-Page com frações eluídas após cromatografia de afinidade a níquel.....	31
Figura 6 - Géis SDS-Page com frações eluídas após cromatografia de troca iônica.....	32
Figura 7 - Géis SDS-Page com frações eluídas após a segunda cromatografia de troca iônica.	34
Figura 8 - Gel SDS-Page contendo amostras coletadas em diferentes etapas do processo de produção para elucidar avanço na purificação proteica.....	34
Figura 9 - Migração em câmara de Boyden. (A) Imagens obtidas por microscopia de fluorescência demonstrando os núcleos corados das células que migraram através do inserto. Barra de escala de 50 μ m. (B) Análise estatística realizada por meio de teste ANOVA one-way para dados paramétricos utilizando teste de Welch no software GraphPad Prism, com $p < 0.05$..	36
Figura 10 - Ensaio de migração de MDA-MB-231 tratadas com as concentrações indicadas de DisBa-01 em condições de normóxia e hipóxia. Letras “a” acima das colunas indicam significância estatística em comparação ao controle.....	37
Figura 11 - Representação do ensaio de migração de MDA-MB-231 tratadas com as concentrações indicadas de DisBa-01 em condições de normóxia e hipóxia, demonstrando os núcleos celulares corados com DAPI.....	37
Figura 12 - Ensaio de migração de HUVEC tratadas com as concentrações indicadas de DisBa-01 em condições de normóxia e hipóxia. Letras “a” acima das colunas indicam significância estatística em comparação ao controle.....	38
Figura 13 - Representação do ensaio de migração de HUVEC tratadas com as concentrações indicadas de DisBa-01 em condições de normóxia e hipóxia, demonstrando os núcleos celulares corados com DAPI.....	38
Figura 14 - Ensaio de intensidade de integrina $\alpha_v\beta_3$ em ensaio de imunofluorescência de MDA-MB-231 tratadas com as concentrações indicadas de DisBa-01 em condições de normóxia e hipóxia. Letras “a” acima das colunas indicam significância estatística em comparação ao controle.....	39

- Figura 15** - Ensaio de intensidade de colágeno tipo I em ensaio de imunofluorescência de MDA-MB-231 tratadas com as concentrações indicadas de *DisBa-01* em condições de normóxia e hipóxia..... 40
- Figura 16** - Representação do ensaio de imunofluorescência de MDA-MB-231 tratadas com as concentrações indicadas de *DisBa-01* em condição hipóxia e normóxia, com a integrina $\alpha_v\beta_3$ representada em verde e o colágeno representado em vermelho. As setas indicam a integrina $\alpha_v\beta_3$ 40
- Figura 17** - Ensaio de intensidade de integrina $\alpha_v\beta_3$ em ensaio de imunofluorescência de HUVEC tratadas com as concentrações indicadas de *DisBa-01* em condições de normóxia e hipóxia. Letras “a” e “b” acima das colunas indicam significância estatística em comparação ao controle e significância estatística em comparação à condição de oxigenação contrária, respectivamente..... 41
- Figura 18** - Ensaio de intensidade de colágeno tipo I em ensaio de imunofluorescência de HUVEC tratadas com as concentrações indicadas de *DisBa-01* em condições de normóxia e hipóxia. Letras “a” acima das colunas indicam significância estatística em comparação ao controle..... 41
- Figura 19** - Representação do ensaio de imunofluorescência de HUVEC tratadas com as concentrações indicadas de *DisBa-01* em condição hipóxia e normóxia, com a integrina $\alpha_v\beta_3$ representada em verde e o colágeno representado em vermelho. As setas indicam a integrina $\alpha_v\beta_3$ 42
- Figura 20** - Ensaio de brotamento de HUVEC tratadas com as concentrações indicadas de *DisBa-01* em seus respectivos tempos também indicados em condições de normóxia e considerando o tamanho médio dos brotos por esferoide. Letras “a”, “b”, “c”, “d” e “e” acima das colunas indicam significância estatística em comparação ao controle em 24h (a); tratamento em 24h (b); controle em 48h (c); tratamento em 48h (d); controle em 72h (e)..... 43
- Figura 21** - Ensaio de brotamento de HUVEC tratadas com as concentrações indicadas de *DisBa-01* em seus respectivos tempos também indicados em condições de normóxia e considerando o número de brotos por esferoide. Letras “a”, “b”, “c”, “d” e “e” acima das colunas indicam significância estatística em comparação ao controle em 24h (a); tratamento em 24h (b); controle em 48h (c); tratamento em 48h (d); controle em 72h (e)..... 43
- Figura 22** - Representação do ensaio de brotamento de HUVEC tratadas com as concentrações indicadas de *DisBa-01* em condição de normóxia. As setas indicam os brotos..... 44

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Componentes do meio de cultivo 3D.....	26
--	----

LISTA DE CROMATOGRAMAS

Cromatograma 1 - Cromatograma obtido após cromatografia de troca iônica pelo equipamento AKTA PURE.....	32
Cromatograma 2 - Cromatograma obtido após a segunda cromatografia de troca iônica pelo equipamento AKTA PURE.....	33

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Câncer	13
1.2 Microambiente tumoral e integrinas	13
1.3 Angiogênese, hipóxia e brotamento	15
1.4 Cultivo tridimensional	17
1.5 Desintegrinas e DisBa-01	18
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Expressão e purificação da DisBa-01	20
3.1.1 Plaqueamento em estria de E. coli BL21(DE3)-pDisBa-01	20
3.1.2 Crescimento bacteriano, expressão DisBa-01 e lise celular.	20
3.1.2.1 Pré inóculo e crescimento bacteriano	20
3.1.2.2 Expressão da DisBa-01	21
3.1.2.3 Lise celular	21
3.1.3 Purificação por coluna de afinidade a níquel.	21
3.1.4 Diálise e concentração da amostra.	22
3.1.5 Cromatografia de troca aniônica	22
3.1.6 Diálise e concentração da amostra.	23
3.1.7 Cromatografia de troca aniônica	23
3.1.8 Diálise e concentração da amostra.	23
3.1.9 Quantificação por ácido bicinconínico (BCA)	23
3.1.10 Teste de atividade por migração em câmara de Boyden	23
3.2 Cultivo celular	24
3.2.1 Cultivo em Normóxia e Hipóxia	24
3.2.2 Cultivo tridimensional (3D)	24
3.2.2.1 Preparação do material	24
3.2.2.2 Micromolde de agarose	25
3.2.2.3 Equilíbrio do molde para o cultivo 3D	25
3.2.2.4 Cultivo de células para formação da cultura 3D no micromolde de agarose	26

	12
3.3 Ensaio de migração por câmara de Boyden	26
3.4 Imunofluorescência	27
3.5 Ensaio de brotamento (sprouting)	28
3.6 Análise estatística	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	28
4.1 Expressão e purificação da DisBa-01	28
4.1.1 Crescimento bacteriano, expressão da DisBa-01 e lise celular	28
4.1.2 Purificação por cromatografia de afinidade à níquel	29
4.1.3 Cromatografia de troca aniônica	30
4.1.4 Quantificação por ácido bicinconínico (BCA)	34
4.1.5 Teste de atividade por migração em câmara de Boyden	34
4.2 Ensaio de migração por câmara de Boyden	35
4.3 Imunofluorescência	38
4.4 Ensaio de brotamento (sprouting)	41
5. CONCLUSÃO	43
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Câncer é um termo designado ao crescimento desordenado de células que possuem uma rápida divisão, grande agressividade e difícil controle, e são responsáveis pela formação de tumores (INCA, 2020). O câncer de mama feminino possui uma alta incidência global, sendo a malignidade mais frequente em mulheres em todo o mundo, com mais de 2 milhões de casos e 650 mil mortes no ano de 2020, o que representa, respectivamente, 11,7% e 6,9% dentre todos os tipos de câncer (HARBECK *et al.*, 2019; SUNG *et al.*, 2021). Para cada ano do triênio 2020-2022, são estimados cerca de 66 mil casos de câncer de mama no país (INCA, 2020).

Os tumores mamários que possuem a expressão de receptores de estrógeno (ER) e/ou de progesterona (PR) são chamados positivos para receptores hormonais, por outro lado, os tumores que não expressam ER, PR ou o receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) são considerados triplo negativo, sendo a linhagem celular MDA-MB-231, um exemplo de câncer de mama triplo negativo de alta malignidade e agressividade (HARBECK *et al.*, 2019; HUANG; YU; TANG, 2020).

Um dos principais desafios clínicos com relação ao câncer de mama, é a prevenção e o tratamento de metastases, a principal causa de morte de pacientes diagnosticados com a doença (MEGO; MANI; CRISTOFANILLI, 2010; SCULLY *et al.*, 2012). Embora a malignidade e mortalidade do câncer de mama metastático seja amplamente conhecida, ainda não existe uma droga efetiva no mercado cujo alvo seja a metástase, e algumas poucas estão em desenvolvimento, apesar de todos os avanços alcançados nos últimos anos (CIPRIANO; MESQUITA, 2021).

1.2 Microambiente tumoral e integrinas

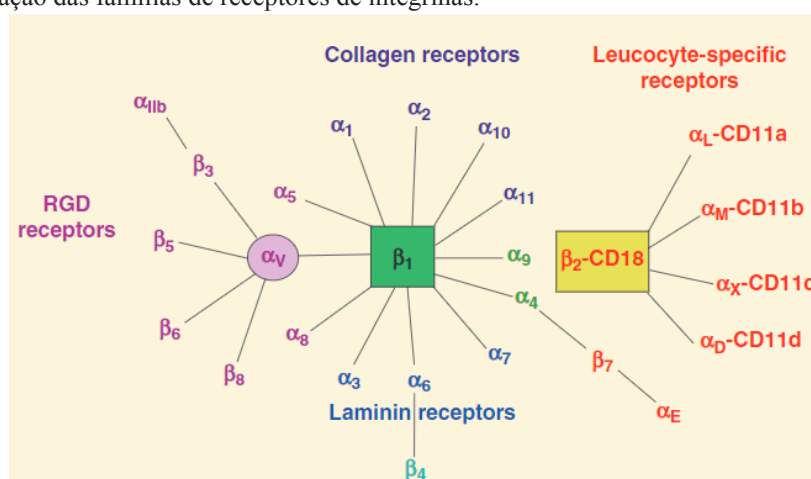
Os tumores possuem necessidades fisiológicas as quais, juntamente com interações entre as células saudáveis e tumorais, promovem a formação de um microambiente tumoral, o qual é composto por diversos elementos, como a matriz extracelular (MEC), fatores de crescimento, citocinas, fibroblastos, células imunológicas, além de células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos, levando assim os suprimentos necessários para o crescimento e desenvolvimento do tumor (NYBERG *et al.*, 2008; ARNETH, 2019; ANDERSON; SIMON, 2020). O crescimento tumoral induz ao aumento da formação de novos vasos (angiogênese tumoral), muitas vezes defeituosos, resultando em regiões hipóxicas dentro dos tumores sólidos, como o câncer de mama, favorecendo o desenvolvimento de metástase, uma vez que as células buscam superar o

ambiente de privação de nutrientes, para que seu crescimento desordenado possa se dar da melhor forma possível e o tumor possa crescer de forma saudável (VAUPEL *et al.*, 2004; VAUPEL; MAYER, 2005; SORG *et al.*, 2008; VAUPEL, 2009).

A MEC possui um papel importante na homeostase tecidual, visto que permite a comunicação entre diferentes tipos celulares, bem como a provisão de diversos sinais de diferenciação, proliferação e morte celular (JOYCE; POLLARD, 2009). A MEC apresenta diversos elementos como: colágeno, elastina, fibronectina, vitronectina, glicosaminoglicanos e outras glicoproteínas que podem variar de um tecido para outro (HYNES; NABA, 2012). Por ser constantemente renovada, as metaloproteases de matriz (MMP) exercem um importante papel na degradação, manutenção e remodelagem dos componentes da matriz, o que em ambientes tumorais, pode auxiliar na migração das células carcinogênicas, conseqüentemente promovendo a metástase (INSUA-RODRÍGUEZ; OSKARSSON, 2016; THEOCHARIS *et al.*, 2016).

Outro papel fundamental da MEC é o da transdução de sinais de fora para dentro da célula. Isso é possível graças à receptores de adesão celular chamados integrinas, as quais são glicoproteínas transmembranas heterodiméricas formadas pela combinação de 18 subunidades α e 8 subunidades β (YOUSEFI *et al.*, 2021). As integrinas são responsáveis pela ligação entre suas respectivas células aos componentes da MEC, e as integrinas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ se ligam especificamente a compostos que possuem o motivo RGD, de arginina, glicina e ácido aspártico, como a fibronectina e a vitronectina (MEZU-NDUBUISI; MAHESHWARI, 2021) (Fig. 1).

Figura 1: Classificação das famílias de receptores de integrinas.



Fonte: MEZU-NDUBUISI; MAHESHWARI, 2021.

A integrina $\alpha_v\beta_3$ apresenta uma maior expressão em células de câncer de mama do que em células saudáveis. Aliado a isso, as subunidades α_3 , α_5 , α_6 , α_v , β_1 e β_3 especificamente, são

amplamente expressas em células metastáticas, sendo consideradas marcadores de metástase (RATHINAM; ALAHARI, 2010).

Além das células tumorais, as integrinas também podem ser encontradas em células associadas aos tumores presentes no microambiente tumoral, como células do endotélio vascular, fibroblastos, plaquetas e células perivasculares, e a sinalização mediada por integrinas é de suma importância para regular a contribuição desses tipos celulares à progressão tumoral (DESGROSELLIER; CHERESH, 2010).

1.3 Angiogênese, hipóxia e brotamento

A formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) é um processo essencial para o desenvolvimento e manutenção de tumores, os quais possuem uma capacidade bem limitada de se desenvolver sem um suporte vascular, responsável por sustentar o influxo de nutrientes indispensáveis para o crescimento da massa tumoral (LONGATTO FILHO; LOPES; SCHMITT, 2010; MADU *et al.*, 2020). Os capilares presentes na rede vascular geralmente não se proliferam, devido à não multiplicação das células endoteliais presentes em sua superfície interna, o que gera uma condição de baixa oxigenação, chamada de hipóxia. Baixos níveis de oxigênio desencadeiam diversas respostas celulares a níveis transcricionais, por meio da transcrição dos fatores induzidos por hipóxia (HIFs), os quais são responsáveis pela regulação da expressão de inúmeros genes responsáveis pela estimulação de determinadas respostas fisiológicas, como a divisão celular, a ativação de vias metabólicas celulares e a própria angiogênese. A angiogênese local envolve a convergência de precursores de células endoteliais, que dão origem ao plexo capilar, e que posteriormente irão se tornar vasos sanguíneos (PUGH; RATCLIFFE, 2003; MADU *et al.*, 2020).

Tumores hipóxicos são significativamente mais resistentes à radio e quimioterapias, além de serem mais invasivos, geneticamente instáveis e possuem um maior potencial metastático, o que leva a um prognóstico ruim na maioria dos casos (BURROUGHS *et al.*, 2013). BROWN e WILSON, 2004, demonstraram que as razões para a resistência à drogas anticâncer são diversas, mas dentre elas pode-se destacar a distância entre as células hipóxicas e os vasos sanguíneos, o que leva a uma baixa exposição delas às drogas que circulam pela corrente sanguínea, esta distância também é um fator que causa uma diminuição da proliferação das células, pela falta de nutrição destas. A exposição prolongada a baixos níveis de oxigênio é um fator que comumente leva à apoptose (morte celular programada), entretanto, em situações tumorais, células com a proteína p53 mutante podem ser selecionadas, levando a uma resistência à apoptose, e confere

um fenótipo mais agressivo ao tumor, visto que o processo de morte celular será menos efetivo (BROWN; WILSON, 2004; BURROUGHS *et al.*, 2013). Diante disso, a submissão dos ensaios celulares ao ambiente hipóxico é de extrema importância para uma melhor representação do ambiente tumoral *in vivo*, e assim, poderemos compreender melhor as interações presentes no câncer.

O fator induzido por hipóxia (HIF) é composto por duas subunidades, uma alfa (α) e a outra beta (β). Sob condições normóxicas, a subunidade HIF-1 α é degradada, o que faz com que os HIFs não tenham função, entretanto, a falta de oxigênio não permite a degradação dessa subunidade, por conta da inatividade da enzima proil hidroxilase sob condições de baixo oxigênio, o que não permite a ubiquitinação da subunidade HIF-1 α , para posterior degradação no proteassomo, fazendo então, com que a produção dos fatores induzidos por hipóxia seja ativada (VAUPEL; MAYER, 2005; ZIELLO; JOVIN; HUANG, 2007; BURROUGHS, *et al.*, 2013). O complexo HIF-1 α em associação com o HIF-1 β , por serem fatores de transcrição, recrutam proteínas que se ligam a promotores de diversos genes, como FGF-2 (fator básico de crescimento de fibroblastos), TGF- α (fator de crescimento transformador alfa), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) e um dos promotores os quais o complexo HIF se liga é do gene VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), fazendo com que haja um aumento na sua transcrição, e conseqüentemente, um aumento no processo de angiogênese na massa tumoral para que a alimentação de oxigênio seja restabelecida (PUGH; RATCLIFFE, 2003; VAUPEL; MAYER, 2005; ARVELO; COTTE, 2009; CASALI *et al.*, 2022).

O processo angiogênico se inicia a partir do brotamento e do alongamento de novos vasos sanguíneos a partir de redes do plexo capilar preexistentes. As células endoteliais são estimuladas por fatores de crescimento, tais quais, o VEGF, para iniciar a formação de *tip cells*, as quais formam filopódios (projeções citoplasmáticas), remodelando a matriz extracelular ao seu redor, e migrando em direção ao estímulo angiogênico (HEISS *et al.*, 2015).

O desenvolvimento de modelos capazes de mimetizar a angiogênese *in vitro* e suas diversas nuances é de extrema importância para um melhor entendimento de seus mecanismos e aplicações. Os modelos de cultivo 2D de células endoteliais da veia do cordão umbilical humano (HUVECs) foram extensivamente utilizados, e contribuíram com um grande número de descobertas a respeito da biologia celular de tumores endoteliais, mas não foram suficientes para representar fidedignamente os processos que acontecem no organismo (BHAT *et al.*, 2021).

O tratamento de HUVECs com a desintegrina recombinante DisBa-01 já se mostrou inibitória de tubulogênese em condições de normóxia e hipóxia, bem como em migração celular nestas mesmas condições (CASALI *et al.*, 2022), entretanto, todos esses ensaios foram realizados com células em cultivo bidimensional, sendo que o estudo da angiogênese *in vitro* em células cujo cultivo aconteça de forma tridimensional com o tratamento por DisBa-01 ainda não foi realizado, por isso, o presente estudo se faz pertinente para o melhor entendimento dos processos angiogênicos e dos efeitos desta desintegrina em diferentes ações nas células.

1.4 Cultivo tridimensional

Para a realização de estudos celulares, há possibilidades da aplicação de diferentes técnicas ou modelos experimentais com o objetivo de recriar condições teciduais presentes nos organismos vivos, possibilitando a manipulação *in vitro* sob determinadas condições ideais para as células. A técnica 2D é o modelo experimental *in vitro* mais utilizado, mas as relações ditas como essenciais, como interações célula-MEC e arquiteturas tecido-específicas, são perdidas em inúmeros casos (BADEA *et al.*, 2019). Para isso, muitos estudos estão sendo desenvolvidos utilizando a cultura celular 3D, na qual o cultivo consegue mimetizar melhor o ambiente tumoral com maior grau de complexidade em comparação à cultura 2D (FROEHLICH *et al.*, 2016; LAMICHHANE *et al.*, 2016). Entre os modelos de cultivo 3D, os mais utilizados são os esferoides tumorais, ou agregados celulares, que apresentam atividades metabólicas regidas pela difusão tanto de nutrientes quanto de oxigênio, além do fato de a matriz extracelular utilizada para a formação dos esferoides não somente fornecer suporte, mas também influenciar nas interações célula-célula, promovendo alterações na expressão gênica, organização citoesquelética e fenótipo celular. Por consistir em um modelo que consegue mimetizar melhor um ambiente *in-vivo*, esse tipo de cultura é mais adequado para o desenvolvimento de drogas para o combate a tumores (ADER; TANAKA, 2014; SHOVAL *et al.*, 2017).

A linhagem celular de mama triplo negativa MDA-MB-231 leva à formação de um agregado celular em uma membrana basal de matrigel, assim apresentando uma compactação entre as células. Já uma linhagem celular de mama positiva para receptores de estrogênio e progesterona, como a MCF7, é capaz de formar esferoides, diferentemente do observado na MDA-MB-231 (FROEHLICH *et al.* 2016). Sendo assim, é possível compreender que as características intrínsecas celulares são fatores determinantes na automontagem de culturas 3D.

Diversas drogas anticâncer sem resultados clínicos expressivos em testes *in vivo*, foram classificadas como ativas em estudos pré-clínicos, isto porque estes estudos foram conduzidos

utilizando modelos celulares bidimensionais, os quais não representaram fidedignamente o microambiente tumoral, como demonstrado por OHMORI *et al.* (1998), em que esferoides de MDA-MB-231 apresentaram um IC₅₀ ao composto *cisplatinum* menor quando plaqueados em culturas de monocamada (2D), em comparação a cultura de esferoides suspensa (OHMORI *et al.*, 1998; IMAMURA *et al.*, 2015). O cultivo tridimensional possui diversas vantagens sobre o modelo bidimensional de cultura celular, dentre elas podemos citar a presença e suporte da matriz extracelular e as regiões avasculares nos tumores, características as quais são observadas em modelos *in vivo*. Além disso, os cultivos 3D possuem um maior suporte ao chamado co-cultivo, ou seja, o cultivo de mais de um tipo celular concomitante, permitindo o estudo das interações entre os diferentes tipos celulares presentes no desenvolvimento tumoral (KIM; STEIN; O'HARE, 2004; IMAMURA *et al.*, 2015).

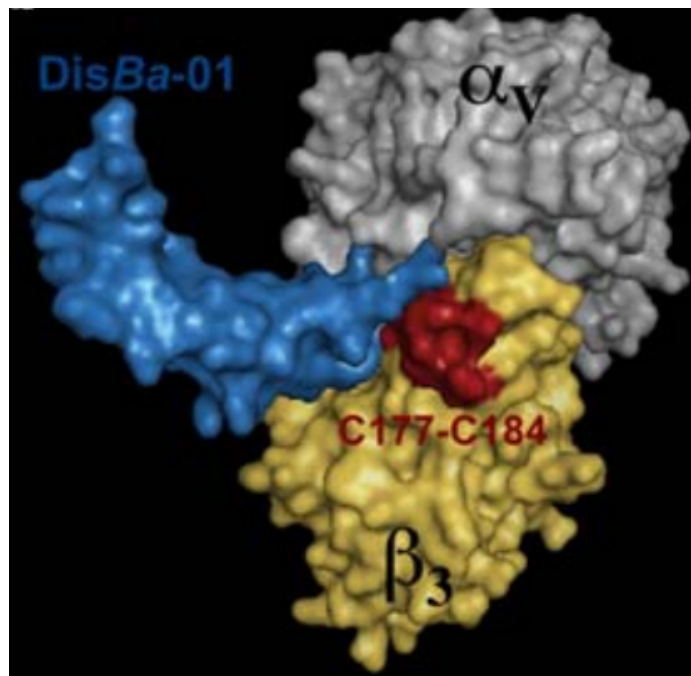
Como a utilização de modelos animais e estudos *in vivo* são procedimentos de alto custo e com necessidade de aprovação ética, a utilização de sistemas fisiológicos tridimensionais se tornam alternativas bastante viáveis e satisfatórias para a realização de estudos que visam compreender melhor as interações entre as células em diferentes organismos.

1.5 Desintegrinas e DisBa-01

As desintegrinas são moléculas antagonistas às integrinas, originadas de veneno de serpente e estão dentro da classificação das metaloproteinases de veneno de serpente (SVMs). Ademais, as desintegrinas podem ser classificadas quanto a sua seletividade à integrinas, e isso ocorre por conta do motivo tripeptídico presente nestas proteínas. O motivo RGD (Arg-Gly-Asp) é responsável pela ligação à integrina $\alpha_v\beta_3$ e os motivos KGD (Lys-Gly-Asp), WGD (Trp-Gly-Asp) e RGD responsáveis pela ligação à integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. Já o motivo MLD (Met-Leu-Asp) é o responsável pela ligação à integrina $\alpha_L\beta_2$ e os motivos KTS (Lys-Thr-Ser) e RTS (Arg-Thr-Ser) responsáveis pela ligação à integrina $\alpha_1\beta_1$ (CALVETE, 2013).

A DisBa-01 (*Disintegrin of Bothrops alternatus*) (Fig. 2) é uma desintegrina recombinante obtida do veneno da serpente *Bothrops alternatus*, antagonista à integrina $\alpha_v\beta_3$, e que possui preferência de ligação à subunidade β_3 das integrinas, além de um potencial de inibir a adesão celular, a metástase tumoral e a angiogênese em diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* (RAMOS *et al.*, 2008; MONTENEGRO *et al.*, 2012; RIBEIRO, 2014; DANILUCCI *et al.*, 2019). Trata-se de uma proteína rica em resíduos de cisteína e de baixo peso molecular, produzida de modo recombinante, com um domínio RGD e uma cauda de histidina (RAMOS *et al.*, 2008; MONTENEGRO *et al.*, 2017).

Figura 2: Aspecto geral do complexo de ligação da DisBa-01 (Azul) com as subunidades α_v (Cinza) e β_3 (Amarelo) da integrina $\alpha_v\beta_3$.



Fonte: RAMOS, *et al.*, 2008.

O mais recente trabalho publicado sobre a desintegrina DisBa-01 analisou o bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$ de células endoteliais de HUVEC e tumorais de MDA-MB-231 em cultura 2D, sob ambiente hipóxico, utilizando a DisBa-01, e demonstrou que esta proteína recombinante é capaz de inibir a migração de células tumorais tanto em condições de hipóxia quanto em normóxia (CASALI *et al.*, 2022). Assim sendo, os inibidores de integrinas, como as desintegrinas, podem ser responsáveis por impedir a progressão tumoral, por inibir processos de sinalização indispensáveis tanto no microambiente tumoral quanto nas próprias células tumorais (DESGROSELLIER; CHERESH, 2010). Porém, o papel da DisBa-01 em cultura 3D em células tumorais de MDA-MB-231 e não tumorais de HUVEC ainda não foi analisado.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar o papel da integrina $\alpha_v\beta_3$ endotelial e tumoral na migração e angiogênese em modelo de cultivo 3D de células tumorais e endoteliais em normóxia e hipóxia.

2.2 Objetivos específicos

- Expressar e purificar a desintegrina recombinante DisBa-01 conforme os protocolos pré-estabelecidos por RAMOS *et al.*, 2008;
- Desenvolver modelos de cultivo 3D para as células tumorais MDA-MB-231 e endoteliais HUVEC;
- Investigar a migração de células MDA-MB-231 e HUVECs em cultura 3D pelo método de câmara de Boyden em normóxia e hipóxia;
- Analisar a expressão da integrina $\alpha_v\beta_3$ e de colágeno tipo I nas culturas 3D após o tratamento com a DisBa-01 por imunofluorescência;
- Padronizar ensaios de brotamento com células 3D de HUVEC;
- Analisar a relação entre a cultura 3D, o processo de angiogênese e a ação da desintegrina recombinante DisBa-01 nesse processo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Expressão e purificação da DisBa-01

3.1.1 Plaqueamento em estria de *E. coli* BL21(DE3)-pDisBa-01

Foi utilizada a cepa da bactéria *Escherichia Coli* BL21(DE3)-pDisBa-01 já transformada com o gene recombinante da DisBa-01, realizada no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFSCar. A bactéria foi plaqueada por estria de esgotamento em placa de Petri (KASVI) contendo meio LB Ágar (Sigma) e 20 µL do antibiótico kanamicina (30 mg/mL) (Sigma-Aldrich) e deixada em estufa a 37 °C para crescimento *overnight*.

3.1.2 Crescimento bacteriano, expressão DisBa-01 e lise celular.

3.1.2.1 Pré inóculo e crescimento bacteriano

No dia seguinte ao plaqueamento, foi realizado o pré-inóculo em um tubo de 50 mL (KASVI) contendo 2,5 mL de meio Broth (Sigma) e 25 µL do antibiótico kanamicina (30 mg/mL) (Sigma-Aldrich). O pré inóculo se deu a partir de uma colônia isolada da placa de Petri e foi realizada uma raspagem desta com uma ponteira P200, a qual foi inoculada no meio de cultivo e permaneceu em agitação a 250 rpm por cerca de 16h-18h (*overnight*) a 37 °C.

Posteriormente ao pré inóculo, foi realizado o crescimento bacteriano, utilizando 2 L de meio Broth (Sigma), dividido em 4 erlenmeyers contendo 500 µL do antibiótico kanamicina (30 mg/mL) (Sigma-Aldrich) cada. Foi inserido 5 mL do pré inóculo em cada um dos erlenmeyers e estes foram submetidos à agitação à 250 rpm e 37 °C por 2 h para que o crescimento bacteriano pudesse ocorrer de forma satisfatória. A fim de determinar a fase *log* do crescimento celular, 1 mL de cultura foi submetida à análise por espectrofotômetro (Pharmacia Ultrospec 2000) no comprimento de onda de 660 nm, juntamente com 1 mL de água MilliQ para controle do branco, o qual é realizado para a normalização dos valores de absorbância da amostra.

3.1.2.2 Expressão da DisBa-01

Esperava-se uma densidade óptica entre 0,4 e 0,6, o que foi atingido, sendo assim, 10 mL de IPTG (100 mM) (Sigma-Aldrich) foram adicionados a cada erlenmeyer para indução da expressão da DisBa-01 e estes foram submetidos à agitação a 250 rpm e 37 °C por 3 h para expressão do produto de interesse. Após as 3h, o conteúdo foi centrifugado a 4200 g por 7 min na centrífuga Sorvall® RC5C plus (rotor SS-34; código 05).

3.1.2.3 Lise celular

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em 200 mL de solução *Binding Buffer* 1X, e submetido à lise por sonicação em gelo mediante aplicação

de 8 pulsos eletromagnéticos por 1 min cada, com intervalos de 30 segundos entre cada pulso. Posteriormente, o conteúdo foi lisado por centrifugado a 27500 g durante 15 min e o sobrenadante foi descartado novamente, sendo o *pellet* ressuspensionado em 100 mL de solução *Binding Buffer* 1X (40 mM Tris, 0,5 M NaCl, 6 M ureia e 5 mM imidazol; pH 7,9). A suspensão foi incubada em agitação por 1 h a 4 °C e após esse período, centrifugada a 27500 g durante 15 min a 4 °C, sendo o sobrenadante filtrado, utilizando papel filtro, para 2 tubos de 50 mL (KASVI) estéreis, sendo armazenados a -20 °C.

Para análise da presença da DisBa-01, foram coletadas amostras de 50 µL em diferentes estágios do processo de crescimento e lise celular, sendo elas T₀: a cultura logo após atingir a DO desejada, T₃: a cultura logo após o tempo de indução de 3 h com IPTG (Sigma-Aldrich); S₁: o sobrenadante após a sonicação e primeira centrifugação; S₂: o sobrenadante após a filtração final. Estas amostras foram aplicadas em gel de SDS-PAGE 15% e realizada a eletroforese para confirmação da presença da proteína de interesse.

3.1.3 Purificação por coluna de afinidade a níquel.

Para a purificação por afinidade, foi utilizada a coluna *Sigma-Aldrich*[®] *HIS-Select*[®] *Nickel Affinity Gel* (Catalog Number P6611) com um volume de 4 mL. Por conta da alta quantidade de sobrenadante resultante da lise celular, as etapas discurridas a seguir foram realizadas em dois momentos. Primeiramente foi realizada uma lavagem para a retirada do álcool 30%, que é o meio de estocagem da coluna, utilizando 2 CV (volumes de coluna, do inglês *column volumes*) de água MilliQ a um fluxo de 2 mL/min, após isso, 4 CV de *Binding buffer* foram passados para o equilíbrio da coluna a um fluxo também de 2 mL/min. Com a coluna equilibrada, a amostra de um dos tubos de 50 mL foi transferida para a coluna, a um fluxo de 1 mL/min e as amostras que passaram pela coluna foram descartadas. Após isso, 3 CV de *wash buffer* (50 mM NaH₂PO₄, 0,3 M NaCl, 10 mM imidazol, 6 M ureia; pH 7,4) foram incluídos na coluna de níquel a um fluxo de 1 mL/min, para que as proteínas ligadas de maneira fraca fossem soltas, e as amostras foram coletadas de forma manual, posteriormente, 3 CV de *elute buffer* (50 mM NaH₂PO₄, 0,3 M NaCl, 250 mM imidazol, 6 M ureia; pH 7,4) foram incluídos na coluna de níquel a um fluxo de 1 mL/min, para que as proteínas ligadas de maneira forte fossem soltas, e as amostras foram coletadas de forma manual. Após o processo de purificação, uma etapa de lavagem foi realizada, sendo utilizados 2 CV de água MilliQ a um fluxo de 2 mL/min e 5 CV de solução de guanidina 6M também a um fluxo de 2 mL/min. O processo de purificação foi então realizado para o segundo tubo de 50 mL, seguindo os mesmos procedimentos elucidados para o primeiro tubo, sendo o processo de lavagem finalizado com mais 3 CV de água MilliQ a um

fluxo de 2 mL/min e 3 CV do meio de estocagem, etanol 30%, a um fluxo também de 2 mL/min, sendo a coluna estocada a uma temperatura entre 2 e 8 °C.

Após a cromatografia por afinidade, a presença da DisBa-01 foi verificada por meio de eletroforese em gel de SDS-PAGE 15%.

3.1.4 Diálise e concentração da amostra.

Com o conhecimento acerca das amostras as quais continham a proteína de interesse, estas foram reunidas e submetidas à diálise em membrana de celulose regenerada (Spectra/Por[®] Membrane MW: 6-8,000). A amostra foi dialisada contra tampão Tris 20 mM (Sigma-Aldrich), contendo ureia 3M (Sigma-Aldrich), seguido de sucessivas trocas de solução por tampão Tris 20 mM, o que ocorreu *overnight*. Todo o processo de diálise ocorreu sob agitação em temperatura de 4 °C. Com o processo de diálise completo, a amostra foi colocada em um tubo de 50 mL estéril (KASVI), e o processo de concentração foi iniciado, utilizando o equipamento *concentrator plus* (Eppendorf) até a amostra atingir o volume de 1,5 mL.

3.1.5 Cromatografia de troca aniônica

Para a cromatografia de troca aniônica, foram utilizados 1 L de água ultrapura Milli Q, 1 L de etanol 20%, 1 L de tampão “A” contendo 20 mM de Tris-HCl (Sigma-Aldrich), pH 8,6 e 1 L de tampão “B” contendo 20 mM de Tris + NaCl 1 M (Sigma-Aldrich), pH 8,6, sendo todos eles passados pelo processo de desaeração utilizando a bomba à vácuo I22 - BCP (Primatec) e filtração utilizando papel filtro. Após a preparação dos reagentes, foi feita a cromatografia utilizando o equipamento AKTA Pure 25 L (GE Healthcare), sendo utilizada a coluna *Mono QTM 5/50 GL MonoBeadsTM Column* (Cód: 17-5166-01; Lote: 10244496) para a corrida cromatográfica, por meio do método de corrida linear para a purificação da DisBa-01.

Posteriormente à cromatografia, as amostras foram aplicadas em Gel de SDS-PAGE 15% e realizada a eletroforese para verificação da presença da DisBa-01 purificada.

3.1.6 Diálise e concentração da amostra.

Após a verificação da presença de contaminantes no gel de SDS-PAGE, uma nova diálise seguindo os mesmos procedimentos indicados no tópico 3.1.4 foi realizada.

3.1.7 Cromatografia de troca aniônica

Após a segunda diálise, uma nova cromatografia de troca aniônica foi realizada, seguindo os mesmos procedimentos indicados no tópico 3.1.5 para a retirada dos contaminantes presentes na amostra.

Posteriormente à cromatografia, as amostras foram corridas em Gel de SDS-PAGE 15% para verificação da presença da DisBa-01 purificada.

3.1.8 Diálise e concentração da amostra.

Após a verificação da presença da proteína de interesse purificada no gel de SDS-PAGE, uma nova diálise foi realizada em membrana de celulose regenerada (Spectra/Por® Membrane MW: 6-8,000), utilizando 1 L de água MilliQ. A amostra foi submetida à diálise por 4 h, sob agitação em temperaturas de 4 °C, e após esse processo, a amostra foi colocada em tubo de 50 mL e concentrada utilizando o equipamento *concentrator plus* (Eppendorf) até a amostra atingir o volume de 1 mL.

3.1.9 Quantificação por ácido bicinconínico (BCA)

A quantificação proteica foi realizada utilizando o *kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (BioRad) e o equipamento *SpectraMax i3* (*Molecular Devices*). A amostra foi aplicada em sua forma pura e nas diluições 1:1 e 1:5 para determinação da concentração de proteínas.

3.1.10 Teste de atividade por migração em câmara de Boyden

Para a confirmação da atividade da proteína recombinante DisBa-01 purificada, foi realizado um ensaio de migração em câmara de Boyden, no qual as células 4T1BM2 (tumor de mama murino triplo negativo) parentais (*wild type*), 4T1BM2 transduzidas (silenciadas para o gene β_3 por membros do laboratório) e 4T1BM2 parentais tratadas com DisBa-01 (1000 nM) foram plaqueadas na concentração 1×10^5 células, inicialmente em 250 μ L de meio de cultivo α -MEM sem SFB e aplicadas acima das câmaras de Boyden com poros de 8 μ m (Greiner). Imediatamente após o plaqueamento, a câmara foi inserida em placa de 24 poços (KASVI), os quais continham 750 μ L de meio α -MEM contendo 10% de SFB, o qual serve como quimioatraente para estimular a migração celular, com exceção para o controle negativo, no qual se utilizou meio α -MEM sem SFB para medir a migração basal. A placa foi mantida em incubação por 3h à 37°C e 5% CO₂. As células que migraram através do inserto foram fixadas com paraformaldeído (4%) por 10 min e, findada a fixação, as câmaras foram lavadas com PBS por três vezes consecutivas seguidas pela marcação com DAPI por 10 min para coloração dos

núcleos celulares. Posteriormente, as câmaras foram lavadas com PBS e as membranas presentes nas câmaras foram destacadas do sistema para a montagem das lâminas. A migração foi avaliada e registrada por meio do microscópio invertido Zeiss LSM880 Airyscan (Carl Zeiss AG, Germany) e a quantificação das células presentes na parte inferior das membranas foi quantificada utilizando o software Fiji-ImageJ.

3.2 Cultivo celular

3.2.1 Cultivo em Normóxia e Hipóxia

Foram usadas as linhagens celulares de adenocarcinoma triplo negativo de mama (MDA-MB-231) e de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) provenientes de doação da Dr^a Kelli Cristina Micocci, cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Nutricell), pH 7.0, contendo soro fetal bovino (FBS) (Vitrocell) a 10%, L-glutamina, antibióticos (penicilina/estreptomicina) (Vitrocell) e antifúngico (anfotericina B) (Vitrocell). As células em tratamento foram mantidas em hipóxia e normóxia, em incubadoras com atmosferas contendo 1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂ a 37°C, e 20% O₂, 5%, CO₂, 75% N₂, respectivamente, conforme descrito por JU *et al.*, 2017.

3.2.2 Cultivo tridimensional (3D)

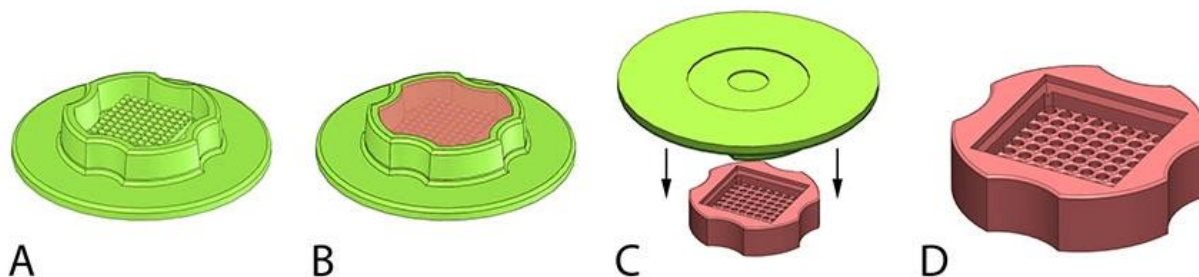
3.2.2.1 Preparação do material

Foi utilizado um molde de silicone *MicroTissue 3D Petri Dish micro-mold spheroids* (Fig. 3A) (Sigma) e este foi lavado com extran 0,01% e água, também foi utilizada agarose ultrapura (Invitrogen) e solução salina 0,9% de NaCl diluída em água MilliQ. Em seguida, todos os materiais foram autoclavados e 1g de agarose foi diluída em 50 mL da solução salina, formando uma solução de agarose salina, a qual foi aquecida em micro-ondas até homogeneização para a formação do micromolde.

3.2.2.2 Micromolde de agarose

Os moldes foram obtidos a partir da adição de 600 µL de agarose salina na parte central do molde de silicone, de modo que essa se espalhasse uniformemente pelo molde (Fig 3B-D). Após a solidificação do gel, o molde de agarose foi retirado do silicone e colocado em uma placa de 12 poços (KASVI), seguido da adição de 700 µL de agarose salina em torno do molde para a fixação deste, no poço da placa.

Figura 3: Imagem representativa do molde de silicone (A), do molde de silicone preenchido com agarose (B), do desmolde da agarose micromoldada (C) e do micromolde de agarose (D).



Fonte: Retirada de <https://www.microtissues.com/protocols>.

3.2.2.3 Equilíbrio do molde para o cultivo 3D

Foi adicionado 1 mL de PBS 1x em cada molde de agarose, e a placa foi incubada por 15 min na estufa de 5% de CO₂, e após o tempo, o PBS foi retirado, procedimento repetido por 3 vezes. Em seguida, o meio base para cultivo de esferoides (Quadro 1) foi colocado pelo mesmo tempo.

Quadro 1: Componentes do meio de cultivo 3D.

Componente	[] Estoque	[] Final	5 mL
Ácido L ascórbico (Sigma)	10 mg/mL	50 µg/mL	25 µL
Albumina Humana	2,5 mg/mL	1,25 µg/mL	2,5 µL
PS (Penicilina/ Estreptomicina)	100x	1x	50 µL
ITS (Insulina, transferrina e selênio, LONZA)	100x	1x	50 µL
Matrigel Reduced	100%	7%	350 µL

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

3.2.2.4 Cultivo de células para formação da cultura 3D no micromolde de agarose

Ao atingir a confluência de cerca de 80%, as células tumorais e endoteliais, foram submetidas ao processo de tripsinização, ressuspensão em meio de cultura comum e contagem de células por *trypan blue* (Sigma-Aldrich), as células tumorais foram adicionadas a um tubo de 15 mL a uma concentração de 5×10^5 células MDA-MB-231/molde de agarose utilizado no experimento, enquanto que as células endoteliais foram adicionadas a um tubo de 15 mL a uma

concentração de 1×10^6 células HUVEC/molde de agarose utilizado no experimento. As células adicionadas aos tubos de 15 mL foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 min para a retirada do meio de cultura, e o pellet foi ressuspendido com 10 mL de PBS e centrifugado a 1200 rpm por 5 min. Em cada molde de agarose, foi adicionada a referida quantidade de células em 120 μ L de meio base por 15 min. Para ambas as linhagens celulares, foi adicionado o meio base contendo matrigel reduced 7% (Corning) completando assim 200 μ L de meio base de cultivo. Foram adicionados 80 μ L de meio base a cada 2 dias, por 7 dias.

3.3 Ensaio de migração por câmara de Boyden

As culturas 3D foram cultivadas de acordo com os protocolos estabelecidos pelo laboratório. Após os 7 dias de cultivo, os esferoides foram retirados dos moldes com jatos de PBS 1x e centrifugados a 1200 rpm por 5 min em temperatura ambiente. Para a retirada do meio de cultivo e PBS, foi adicionado meio DMEM (Nutricell) às culturas 3D e estas foram centrifugadas sob as mesmas condições citadas acima. Em seguida, os esferoides, tanto de HUVEC quanto de MDA-MB-231, foram incubados em temperatura ambiente por 30 min com 0, 10, 100, 1000 e 2000 nM (esta última concentração apenas para HUVEC) da desintegrina recombinante DisBa-01. Após o tratamento, foi realizado o ensaio de migração em câmara de Boyden, utilizando insertos de 8 μ m (Greiner) e placas de 24 poços (KASVI). As culturas 3D (esferoides) foram adicionadas ao compartimento superior dos insertos e estes foram colocados na placa de 24 poços (KASVI) contendo DMEM (Nutricell) e 10% SFB (Vitrocell) no compartimento inferior do inserto, por 24 h em normóxia e hipóxia. Após esse tempo, a cultura 3D foi retirada da face superior com jatos de PBS para imunofluorescência posteriormente e os insertos foram limpos com ajuda de hastes flexíveis com algodão. As células que se desprenderam dos esferoides de ambas as linhagens celulares e migraram através da membrana do inserto até a face inferior deste, foram fixadas com paraformaldeído 4% por 10 min, lavadas com PBS, incubadas com DAPI (1:10000, Sigma-Aldrich) por 15 min e lavadas novamente com PBS. As membranas foram retiradas dos insertos para a montagem de lâminas utilizando bisturi, e as lâminas foram montadas utilizando óleo vegetal de amêndoas e seladas com base cosmética. As imagens foram adquiridas e analisadas no microscópio de alta resolução ImageXpress (Molecular Devices), em um aumento de 10x e quantificadas pelo software MetaXpress pelo módulo 6 de Análise Multiwavelength Cell Scoring: Total Cell. O experimento foi feito em duplicata em 3 eventos independentes.

3.4 Imunofluorescência

Primeiramente, os esferoides foram coletados da parte superior dos insertos com jatos de PBS e foram centrifugados a 1200 rpm por 5 min em temperatura ambiente, ressuspensos em albumina sérica bovina (BSA - Sigma) 3% em PBS 1x e colocados nas lâminas, sendo secas na estufa por 3 h. Os esferoides nas lâminas foram fixados em 4% paraformaldeído em PBS 1x por 10 min, as células foram permeabilizadas com 0,3% Triton X-100 por 5 min e submetidas à três lavagens de 5 min em PBS 1x. Os aldeídos livres formados no processo de fixação foram bloqueados com 100 mM de glicina por 5 min, em seguida as células foram lavadas três vezes por 5 min com PBS 1x. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com BSA 3% em PBS 1x por 1 h à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram incubadas overnight com os anticorpos primários para $\alpha_v\beta_3$ *anti-mouse* (1:250, ABCAM – ab78289) e colágeno tipo I *anti-rabbit* (1:500, ABCAM – ab34710), diluído em BSA 2% em PBS 1x. A cultura 3D foi então novamente submetida a 3 lavagens por 5 min com PBS 1x e, em seguida, incubada com os anticorpos secundários *anti-mouse* (1:1000, ABCAM ab6785 – FITC) e *anti-rabbit* (1:750, ABCAM ab130805 – APC) por 1 h. As células foram lavadas 3 vezes por 5 min com PBS e marcadas com DAPI (1:10000, Sigma-Aldrich) por 20 min, seguido de lavagens com PBS 1x. Por fim, a montagem das lâminas foi feita com a solução de montagem *ProlongTM Diamond Antifade Mount* (Invitrogen), além da selagem com esmalte cosmético. As imagens foram capturadas e documentadas utilizando o microscópio confocal *Axo Observer* (Zeiss, Jena, Germany), Sistema LSM 780, *software ZEN BLACK*, com as mesmas intensidades e ganho do *laser* para as diferentes fluorescências em um aumento de 63X e zoom de 2X. As imagens foram analisadas no programa FijiJ ImageJ utilizando o *plugin 3D Object Counter*, o qual realiza a contagem dos núcleos marcados com DAPI em diferentes planos. Após retirada do *background* das imagens dos canais contendo colágeno tipo I e integrina $\alpha_v\beta_3$, ambos os canais foram transformados em *3D Project*, para que todos os planos fossem abrangidos. Em seguida foi feita uma padronização para a utilização do *threshold*, e foram utilizados o *threshold-Intermodes* para o colágeno e *threshold-Max Entropy* para a integrina, sendo o *threshold* utilizado para a medida da intensidade. Após a medição da intensidade dos canais, os valores foram normalizados de acordo com o número de núcleos contados previamente.

3.5 Ensaio de brotamento (*sprouting*)

As culturas 3D foram cultivadas de acordo com os protocolos estabelecidos pelo laboratório. Após os 7 dias de cultivo, os esferoides foram retirados dos moldes com jatos de PBS 1x e centrifugados a 1200 RPM por 5 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi

retirado e as células foram ressuspensas em 100 μ L de meio de cultivo acrescido de 1,2 mg/mL de colágeno tipo I (BD biosciences) e submetidas ao tratamento com 1000 nM da desintegrina recombinante DisBa-01. Estas células foram adicionadas a uma placa de 96 poços (KASVI) e incubadas por 30 min na estufa, para que o colágeno pudesse se polimerizar. Após a polimerização, os esferoides foram estimulados com 100 μ L de meio base de cultura 3D e incubados por 24, 48 e 72h em condições de normóxia. As imagens foram capturadas e documentadas utilizando o microscópio confocal *Axo Observer* (Zeiss, Jena, Germany), Sistema LSM 780, *software ZEN BLACK* utilizando a lente de 10x e o número de brotos, bem como o comprimento destes foi calculado utilizando o *software FijiJ ImageJ*.

3.6 Análise estatística

Foram utilizados o programas SigmaPlot 12.0 e GraphPad Prism 9 para a realização das análises estatísticas necessárias. Foi realizada uma análise de variância *ANOVA-two-way factor*, seguida de comparações múltiplas pelo Teste Tukey, considerando 5% como nível de significância α para os ensaios de migração e imunofluorescência e uma análise de variância *ANOVA-one-way factor*, seguida de comparações múltiplas pelo Teste Tukey, considerando 5% como nível de significância α para os ensaios de brotamento. Os gráficos foram construídos utilizando o programa GraphPad Prism 9.

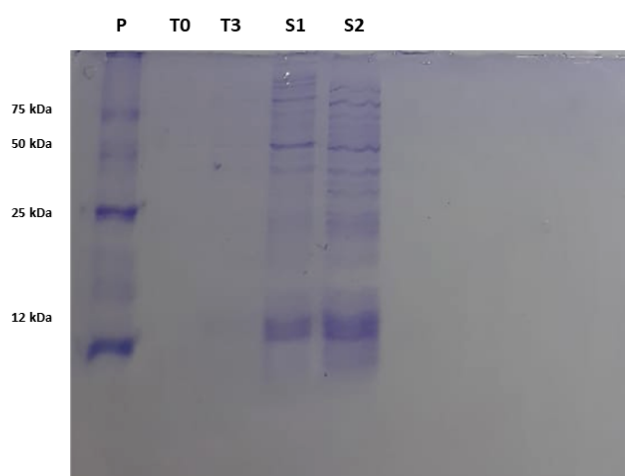
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Expressão e purificação da DisBa-01

4.1.1 Crescimento bacteriano, expressão da DisBa-01 e lise celular

Para confirmação da presença da DisBa-01 durante os procedimentos iniciais, foram coletadas alíquotas de 50 μ L durante processo de crescimento, expressão e lise celular, sendo essas alíquotas denominadas T₀, T₃, S₁ e S₂. A primeira amostra, denominada T₀, foi coletada do erlenmeyer logo após o cultivo bacteriano atingir a densidade óptica (DO) desejada. A amostra T₃, por sua vez, foi coletada após o tempo de indução de expressão com o isopropil- β -d-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG). A S₁ foi coletada a partir do sobrenadante obtido após a sonicação para rompimento da membrana celular seguida da primeira centrifugação e por fim, a amostra S₂ foi obtida a partir do sobrenadante após a filtração final. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de SDS-PAGE 15% (Fig. 4) e foi confirmada a presença da proteína de interesse na amostra S₂, como era esperado.

Figura 4: Padrão de bandas das amostras T₀, T₃, S₁ e S₂ após corrida em gel de SDS-Page.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

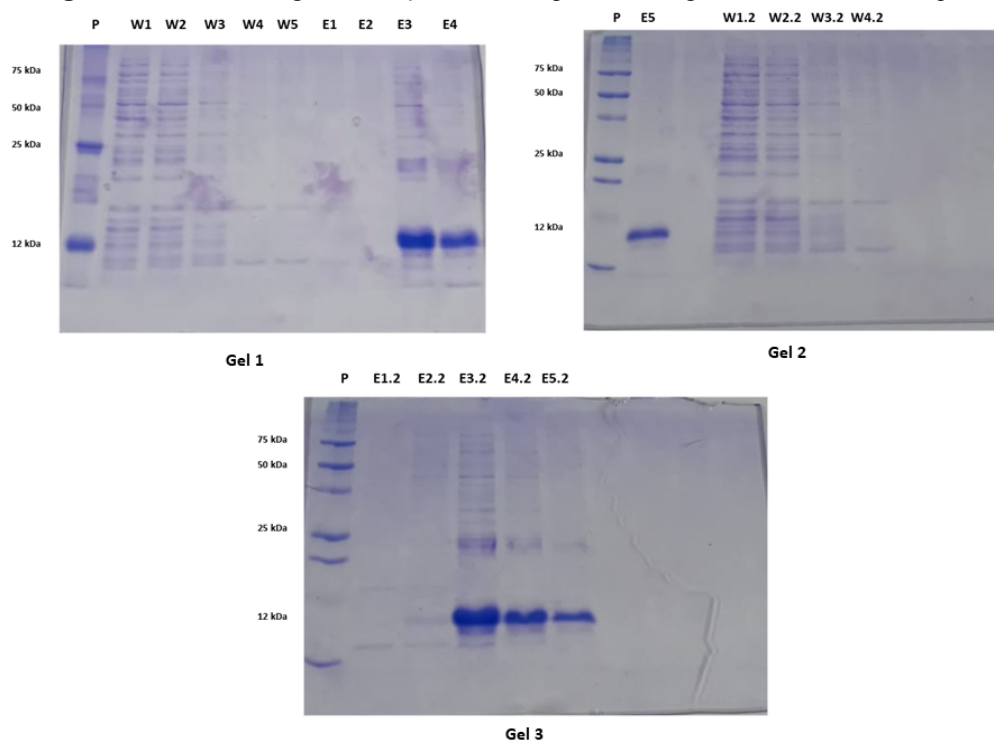
4.1.2 Purificação por cromatografia de afinidade à níquel

A purificação por coluna de afinidade a Níquel ocorreu em duas etapas com passagem da totalidade de 100 mL de solução contendo DisBa-01, sendo aplicados 50 mL de solução contendo a proteína de interesse em cada etapa. Foram coletadas 19 frações contendo um volume de 2,2 mL a 2,8 mL cada, após a passagem do *Washing Buffer* e *Elute Buffer* pela coluna. Após a passagem do *Washing Buffer*, foram coletadas cinco frações na primeira etapa (denominadas W1, W2, W3, W4 e W5) e quatro frações na segunda etapa (denominadas W1.2, W2.2, W3.2 e W4.2). Quanto à passagem do *Elute Buffer* pela coluna, foram coletadas quatro frações (E1, E2,

E3, E4 e E5) e no decorrer da segunda etapa foram coletadas também quatro frações (E1.2, E2.2, E3.2, E4.2 e E5.2).

A presença da DisBa-01 foi analisada utilizando eletroforese em gel de SDS-PAGE 15% (Fig. 5) e houve a confirmação da presença da proteína em algumas das frações recolhidas após a aplicação de *Elute Buffer* na coluna. Esse tampão possui uma maior concentração de Imidazol e assim, tendo mais afinidade com a coluna de Níquel, fez com que a proteína eluísse. A presença de DisBa-01 foi verificada nas amostras E3, E4 e E5, obtidas após a primeira etapa e nas amostras E3.2, E4.2 e E5.2, obtidas após a segunda etapa de purificação. Essas frações foram reunidas para serem submetidas à diálise em Ureia 3 M e Tris 20 mM posteriormente.

Figura 5: Géis SDS-Page com frações eluídas após cromatografia de afinidade a níquel.

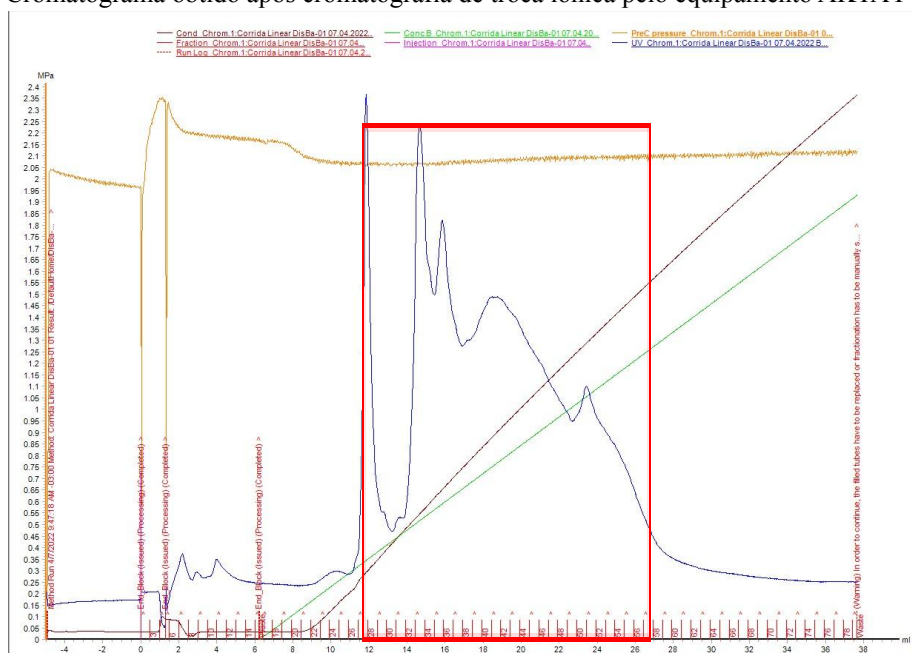


Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

4.1.3 Cromatografia de troca aniônica

A primeira cromatografia de troca aniônica realizada resultou no Gráfico 1, em que o pico destacado em vermelho indica a presença de DisBa-01. Assim, baseando-se no gráfico e nas frações indicadas perpendicularmente ao eixo x em vermelho, coletou-se frações para confirmação da presença da proteína.

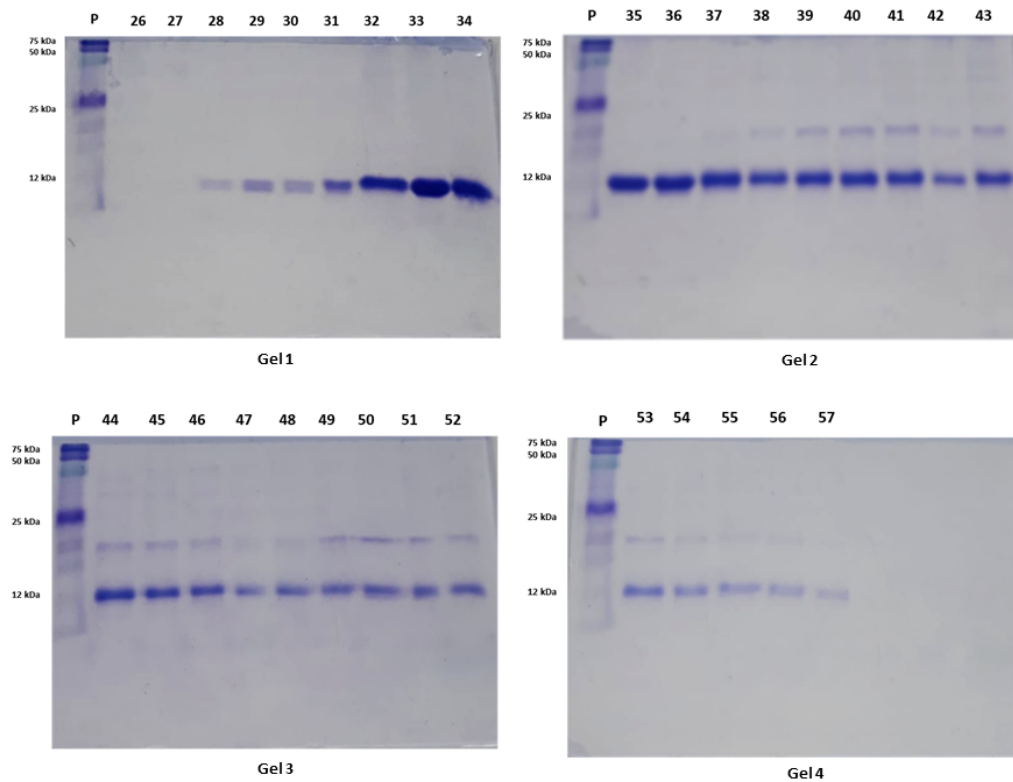
Cromatograma 1: Cromatograma obtido após cromatografia de troca iônica pelo equipamento AKTA PURE.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

As frações eluídas foram submetidas à eletroforese em Gel de SDS-PAGE 15% para verificação da presença da DisBa-01 purificada, como pode ser verificado na Figura 6.

Figura 6: Géis SDS-Page com frações eluídas após cromatografia de troca iônica.



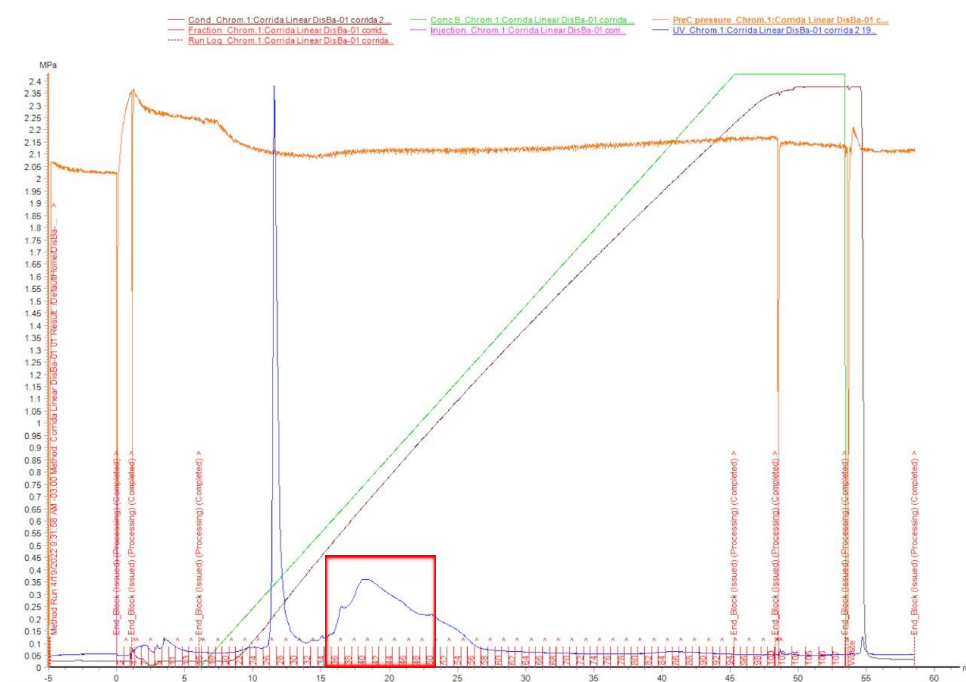
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Verificou-se que no gel 1 a proteína de interesse estava purificada, por apresentar apenas a banda corresponde a 12 kDa. As amostras presentes nesse gel (26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 e

34) e algumas presentes no segundo gel (35 e 36) foram armazenadas. As demais amostras presentes nos géis 2, 3 e 4 acusaram a presença de DisBa-01, mas por não haver apenas sua banda correspondente, depreendeu-se que haviam contaminantes nas frações. Portanto, as frações contaminadas foram reunidas e submetidas à diálise em água ultrapura *overnight* e no dia seguinte, em Tris 20 mM por 2h.

As frações contaminadas, após a nova diálise, foram submetidas à nova cromatografia de troca iônica usando o equipamento *AKTA PURE* (GE Healthcare) com a coluna *Mono QTM 5/50 GL MonoBeadsTM Column*. Obteve-se o segundo cromatograma (Gráfico 2) em que o pico destacado indica a presença de DisBa-01. Assim, baseando-se no gráfico e nas frações indicadas perpendicularmente ao eixo x em vermelho, coletou-se novamente as frações para confirmação da presença da proteína purificada.

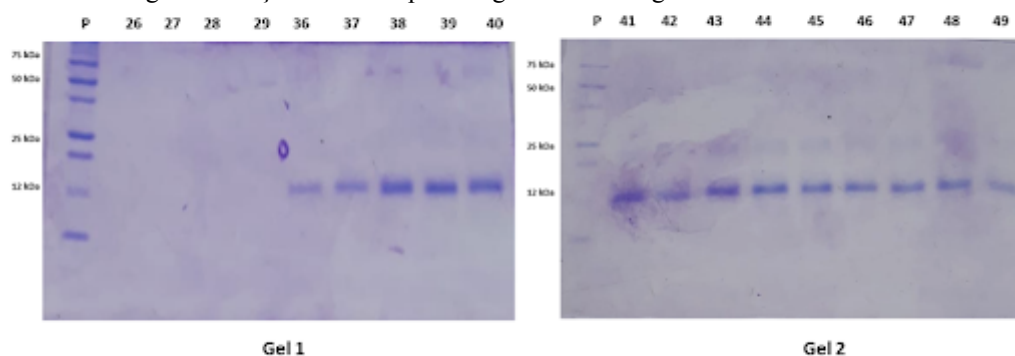
Cromatograma 2: Cromatograma obtido após a segunda cromatografia de troca iônica pelo equipamento AKTA PURE.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

As frações eluídas após a segunda cromatografia foram submetidas à corrida em Gel de SDS-PAGE 15% para verificação da presença da DisBa-01 purificada, como pode ser verificado na Figura 7.

Figura 7: Géis SDS-Page com frações eluídas após a segunda cromatografia de troca iônica.

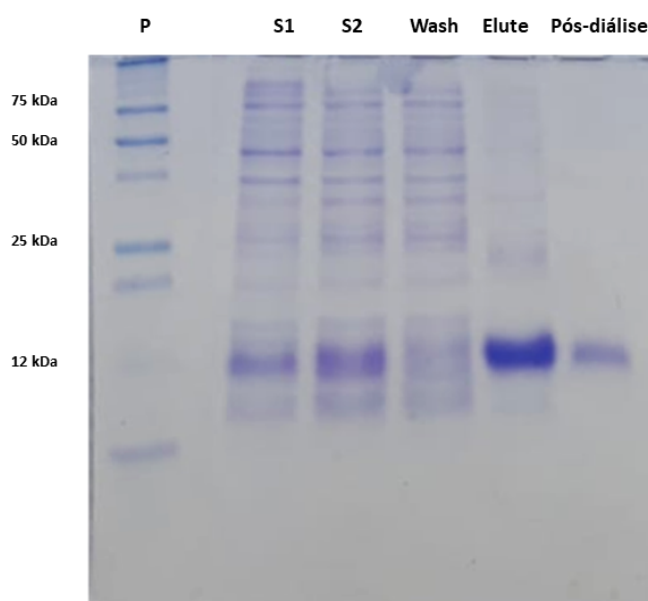


Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

As frações 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 e 49 foram reunidas com as frações purificadas resultantes da primeira cromatografia para a realização da diálise em água ultrapura *overnight*. No dia seguinte, a amostra final, que consistiu na união de todas as frações contendo a proteína recombinante pura, foi concentrada para um volume de 1,0 mL.

Assim, ao final do processo de purificação da proteína recombinante, pode-se verificar o aperfeiçoamento da retirada de contaminantes presentes na amostra, como demonstrado na Figura 8, contendo as amostras S1, S2, fração coletada após lavagem do sistema de cromatografia em coluna de afinidade ao Níquel (*Wash*), fração coletada após aplicação de tampão rico em Imidazol no sistema de cromatografia em coluna de afinidade ao Níquel (*Elute*) e amostra coletada após a diálise em água ultrapura, que sucedeu às duas cromatografias de troca iônica.

Figura 8: Gel SDS-Page contendo amostras coletadas em diferentes etapas do processo de produção para elucidar avanço na purificação proteica.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

4.1.4 Quantificação por ácido bicinconínico (BCA)

A quantificação proteica foi realizada utilizando o kit *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (Catalog Number 23225, BIORAD) e o equipamento *SpectraMax i3* (Molecular Devices). A amostra foi aplicada em sua forma pura (10 µL de DisBa-01) e nas diluições 1:1 (5 µL de DisBa-01 e 5 µL de água ultrapura) e 1:5 (2 µL de DisBa-01 e 8 µL de água ultrapura) para determinação da concentração de proteínas. Após leitura no equipamento *SpectraMax i3* (Molecular Devices), obteve-se uma curva padrão com coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,991. Foi verificada uma concentração total de 2 mg/mL de DisBa-01, equivalente a 87.222 nM de proteína, a partir da aplicação da Equação 1:

Equação 1: Cálculo utilizado para determinação da concentração proteica de DisBa-01, em que C representa a concentração proteica em mM, m representa a massa da amostra em mg/mL, obtida após a leitura no equipamento, PM o peso molecular da proteína recombinante em Da e V o volume da solução em L.

$$C = \frac{m}{PM \times V}$$

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

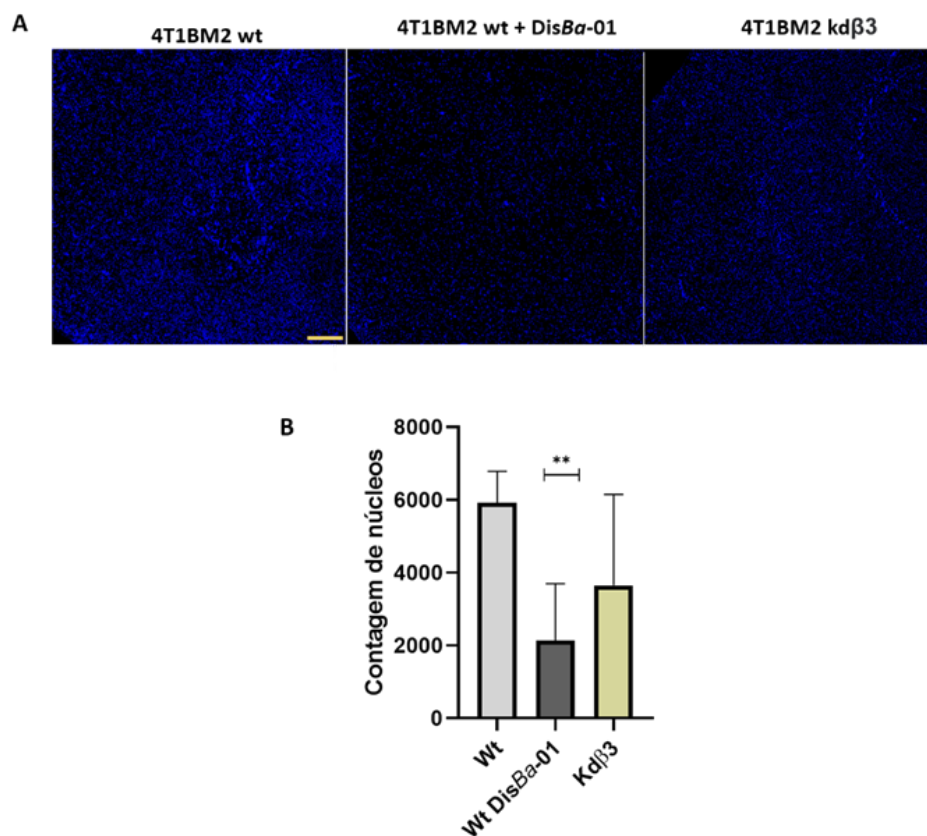
Sendo assim, ao aplicar os valores obtidos na Equação 1, temos que

$$C = \frac{1,57}{12000 \times 0,001} = 0,087222 \text{ mM} = 87.222 \text{ nM}.$$

4.1.5 Teste de atividade por migração em câmara de Boyden

A migração das células parentais quando comparada com as células transduzidas, resultou em quantidades de núcleos bem variadas em cada réplica (Fig. 9). Ademais, a desintegrina DisBa-01 se mostrou eficiente inibindo a migração celular em direção ao SFB, usado como quimioatraente, mostrando que sua ação inibitória é superior à das células silenciadas. Essa molécula possui alta afinidade pela integrina $\alpha_v\beta_3$, bloqueando sua ação e ocasionando a diminuição da migração celular e demais alterações relacionadas à adesão e angiogênese. Sendo assim, a atividade da desintegrina recombinante foi comprovada, sendo o processo de expressão e purificação feito de forma satisfatória.

Figura 9: Migração em câmara de Boyden. (A) Imagens obtidas por microscopia de fluorescência demonstrando os núcleos corados das células que migraram através do inserto. Barra de escala de 50 μm . (B) Análise estatística realizada por meio de teste ANOVA one-way para dados paramétricos utilizando teste de Welch no software GraphPad Prism, com $p < 0.05$.

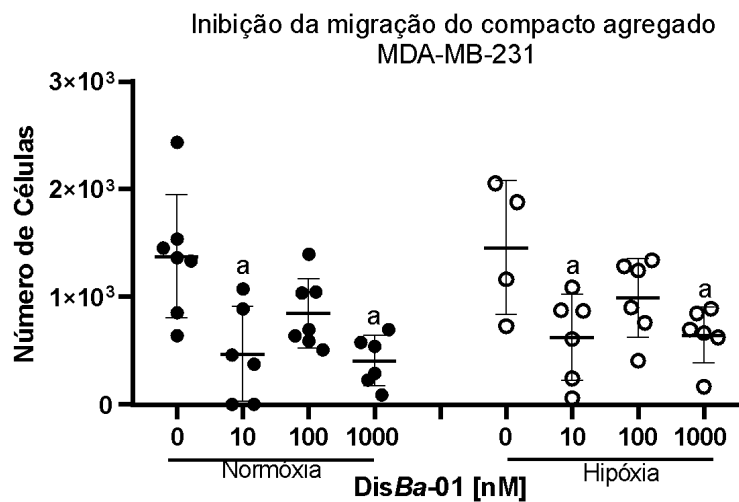


Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

4.2 Ensaio de migração por câmara de Boyden

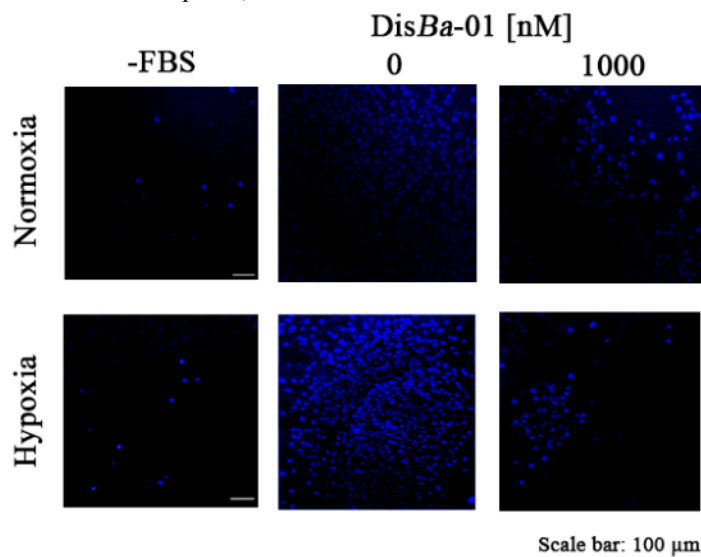
Pode-se observar que o compacto agregado de MDA-MB-231 (Fig. 11) apresentou uma inibição significativa da migração celular com os tratamentos de 10 e 1000 nM da desintegrina recombinante DisBa-01 em ambas as condições de oxigenação em relação ao grupo controle sem tratamento (Fig. 10). Já nos esferoides de HUVEC (Fig. 13), é possível observar uma inibição significativa da migração com todos os tratamentos em condição de normóxia, e 1000 e 2000 nM de DisBa-01 em hipóxia, quando comparados ao grupo controle (Fig. 12).

Figura 10: Ensaio de migração de MDA-MB-231 tratadas com as concentrações indicadas de *DisBa-01* em condições de normóxia e hipóxia. Letras “a” acima das colunas indicam significância estatística em comparação ao controle.



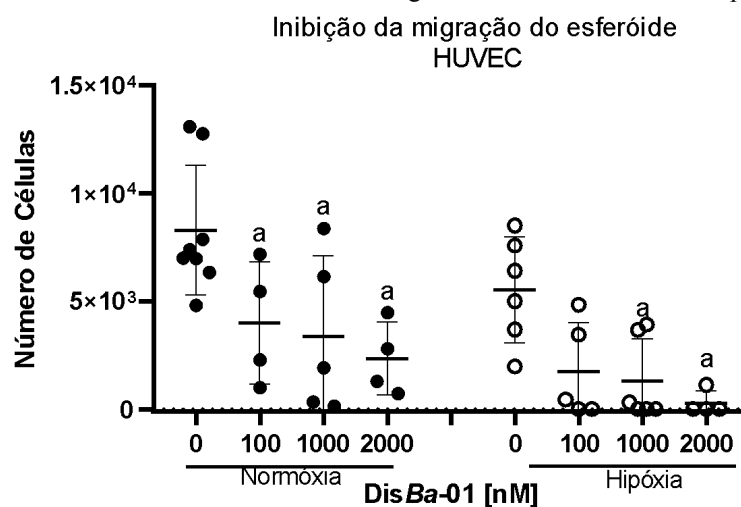
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Figura 11: Representação do ensaio de migração de MDA-MB-231 tratadas com as concentrações indicadas de *DisBa-01* em condições de normóxia e hipóxia, demonstrando os núcleos celulares corados com DAPI.



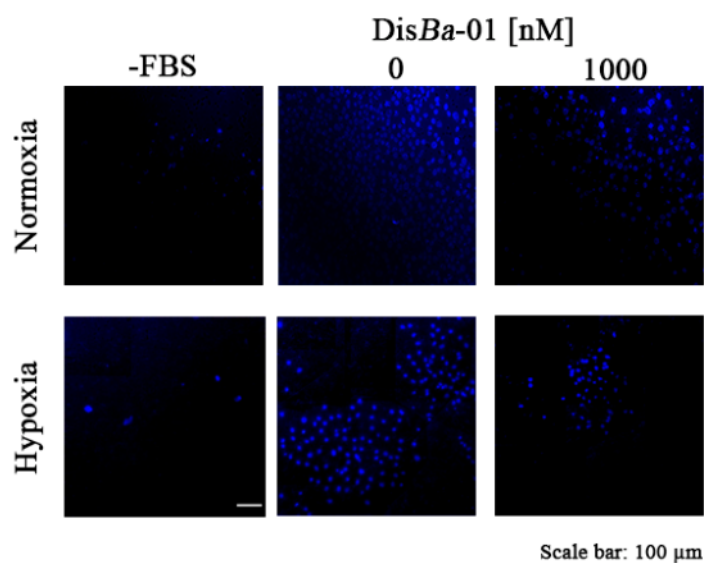
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Figura 12: Ensaio de migração de HUVEC tratadas com as concentrações indicadas de DisBa-01 em condições de normóxia e hipóxia. Letras “a” acima das colunas indicam significância estatística em comparação ao controle.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Figura 13: Representação do ensaio de migração de HUVEC tratadas com as concentrações indicadas de DisBa-01 em condições de normóxia e hipóxia, demonstrando os núcleos celulares corados com DAPI.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

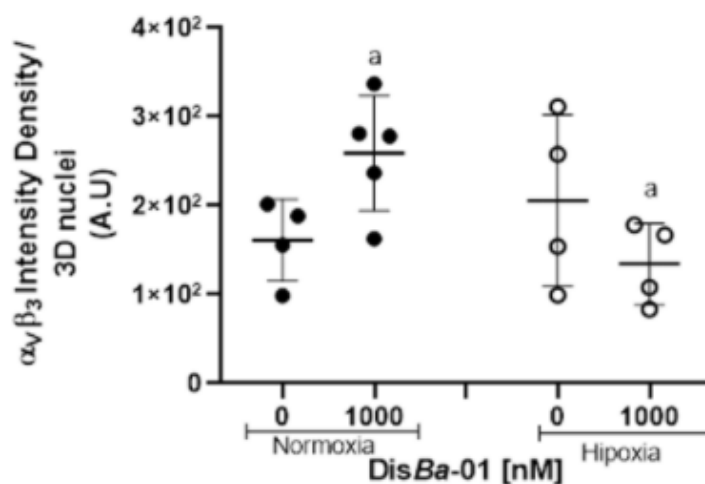
A câmara de Boyden é um método bastante utilizado para analisar a migração ou invasão tumoral, e foi adaptada para migração da cultura 3D. Esse tipo de sistema foi utilizado recentemente como novos modelos de investigação de EMT (transição epitélio mesenquimal, epithelial-mesenchymal transition) para co-cultura 3D de tumor de pâncreas (PANC-1 com PSC-pancreatic stellate cells) (NATH; DEVI, 2017). Também já foi analisado a invasão de diferentes células tumorais de cultura 3D, como linhagem de melanoma humano (A375), célula pancreática (BxPC3), HER positivo de paciente de tumor de mama (BR-58) e célula de linfonodo derivado de paciente (M21) (SHOVAL *et al.*, 2017), portanto, a verificação de migração celular utilizando modelos 3D em câmara de Boyden já é bem estabelecida e pode ser

utilizada para validar os dados presentes neste trabalho. Até o momento é a primeira vez que se utiliza esse sistema de migração da cultura 3D no tratamento de uma desintegrina.

4.3 Imunofluorescência

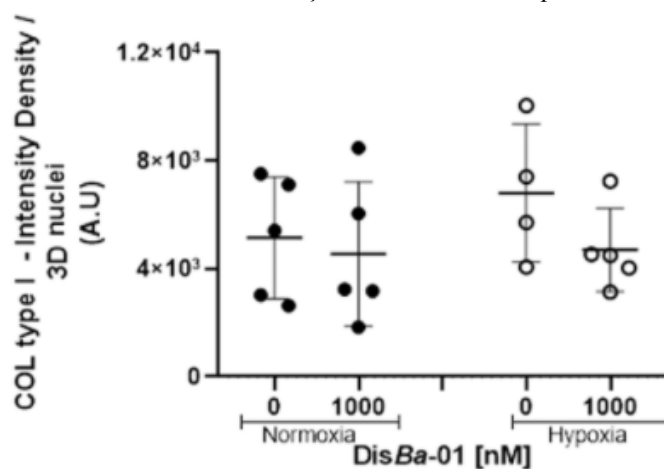
No compacto agregado de MDA-MB-231 (Fig. 16), foi observado um aumento na intensidade da integrina $\alpha_v\beta_3$ em condição de normóxia com o advento do tratamento com DisBa-01, e um decréscimo na intensidade da integrina em condição de hipóxia, sendo os dois tratamentos significativamente diferentes entre seus respectivos controles (Fig. 14). Já em relação à intensidade do colágeno tipo I, não houve diferenças estatísticas entre as condições de oxigenação e tratamento com a desintegrina recombinante (Fig. 15). Em relação aos esferoides de HUVEC (Fig. 19), foi observado uma diminuição na intensidade da integrina $\alpha_v\beta_3$ em condição de normóxia com o advento do tratamento com DisBa-01, e um aumento na intensidade da integrina em condição de hipóxia, sendo os dois tratamentos significativamente diferentes entre seus respectivos controles e também diferentes entre as duas condições de oxigenação (Fig. 17). Além disso, a intensidade do colágeno tipo I sofreu um aumento significativo com o tratamento em normóxia, entretanto, em hipóxia, não houve diferenças estatísticas entre os grupos (Fig. 18).

Figura 14: Ensaio de intensidade de integrina $\alpha_v\beta_3$ em ensaio de imunofluorescência de MDA-MB-231 tratadas com as concentrações indicadas de DisBa-01 em condições de normóxia e hipóxia. Letras “a” acima das colunas indicam significância estatística em comparação ao controle.



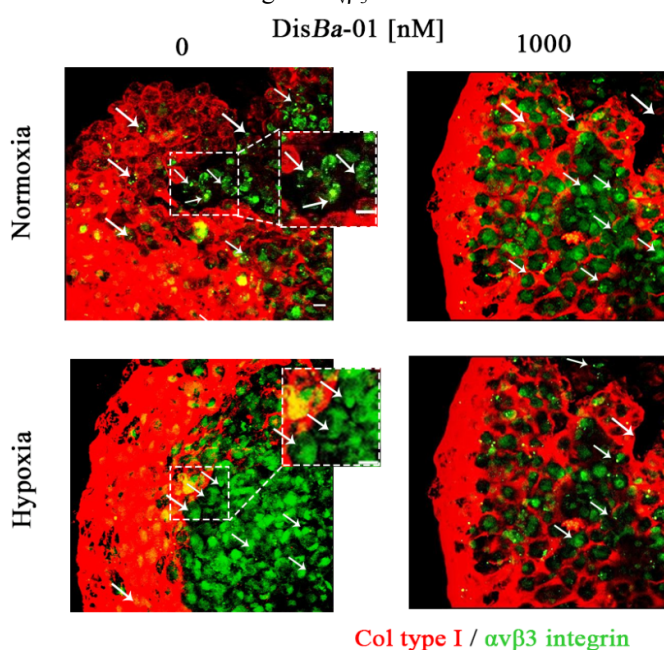
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Figura 15: Ensaio de intensidade de colágeno tipo I em ensaio de imunofluorescência de MDA-MB-231 tratadas com as concentrações indicadas de DisBa-01 em condições de normóxia e hipóxia.



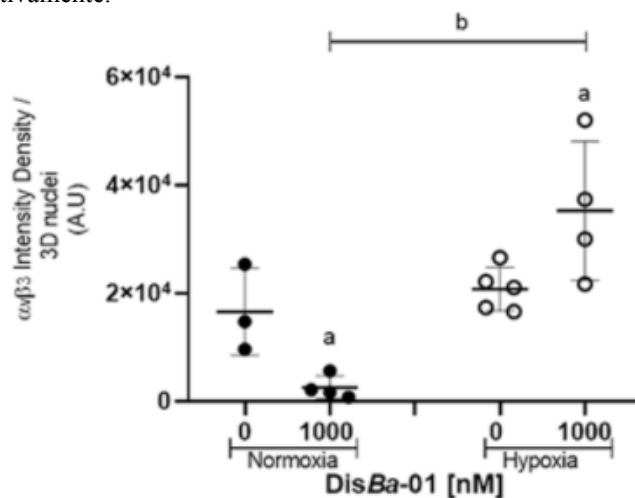
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Figura 16: Representação do ensaio de imunofluorescência de MDA-MB-231 tratadas com as concentrações indicadas de DisBa-01 em condição hipóxia e normóxia, com a integrina $\alpha_v\beta_3$ representada em verde e o colágeno representado em vermelho. As setas indicam a integrina $\alpha_v\beta_3$.



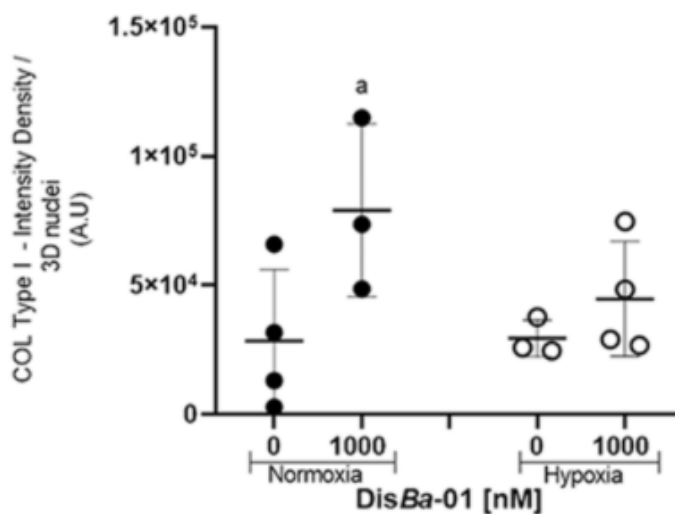
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Figura 17: Ensaio de intensidade de integrina $\alpha_v\beta_3$ em ensaio de imunofluorescência de HUVEC tratadas com as concentrações indicadas de DisBa-01 em condições de normóxia e hipóxia. Letras “a” e “b” acima das colunas indicam significância estatística em comparação ao controle e significância estatística em comparação à condição de oxigenação contrária, respectivamente.



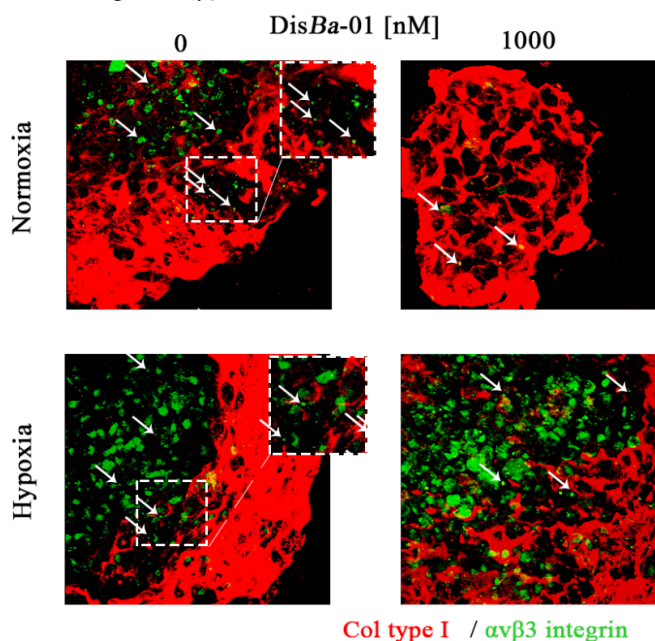
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Figura 18: Ensaio de intensidade de colágeno tipo I em ensaio de imunofluorescência de HUVEC tratadas com as concentrações indicadas de DisBa-01 em condições de normóxia e hipóxia. Letras “a” acima das colunas indicam significância estatística em comparação ao controle.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Figura 19: Representação do ensaio de imunofluorescência de HUVEC tratadas com as concentrações indicadas de DisBa-01 em condição hipóxica e normóxia, com a integrina $\alpha_v\beta_3$ representada em verde e o colágeno representado em vermelho. As setas indicam a integrina $\alpha_v\beta_3$.

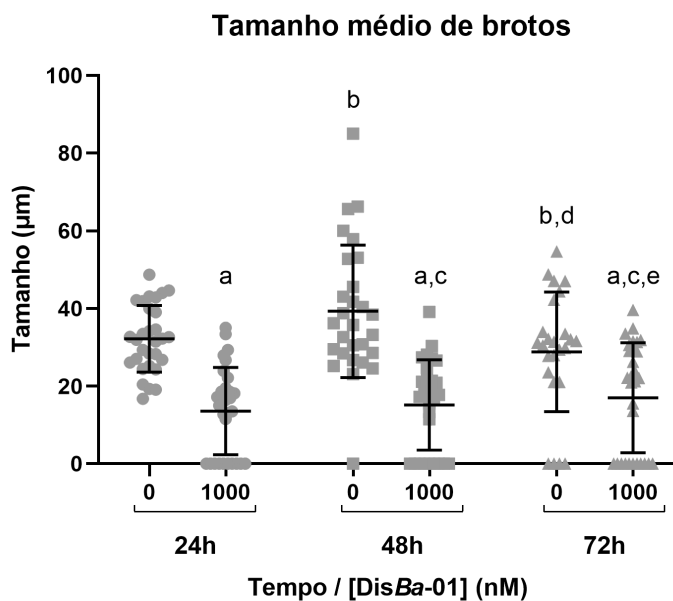


Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

4.4 Ensaio de brotamento (*sprouting*)

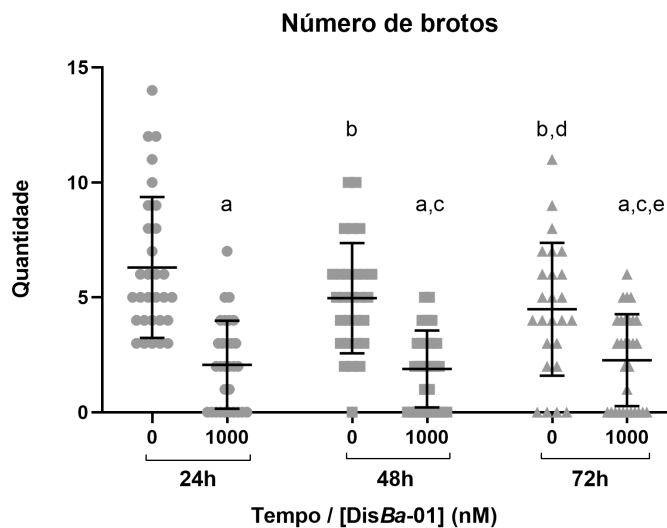
Foram analisados dois principais parâmetros, sendo eles o número de brotos por esferoide, e o tamanho médio dos brotos por esferoide, em três condições de tempo diferentes, sendo elas 24, 48 e 72h, sendo todas considerando controles negativos (não tratadas) e controles positivo (tratadas). As células de HUVEC (Fig. 22), apresentaram diversos resultados estatisticamente significativos considerando ambos os parâmetros analisados. Foi observado em 24h, uma diminuição tanto no tamanho médio quanto na quantidade de brotos por esferoide no grupo tratado em comparação ao controle. Já em 48h, foi observado um aumento tanto no tamanho médio quanto na quantidade de brotos por esferoide no grupo controle em comparação ao grupo tratado de 24h, mas uma diminuição tanto no tamanho médio quanto na quantidade de brotos por esferoide no grupo tratado em comparação aos controles de 24 e 48h. Em 72h foi observado um aumento tanto no tamanho médio quanto na quantidade de brotos por esferoide no grupo controle em comparação aos grupos tratados de 24 e 72h, mas uma diminuição tanto no tamanho médio quanto na quantidade de brotos por esferoide no grupo tratado em comparação aos controles de 24, 48 e 72h. Não houve diferença estatística no tamanho médio e número de brotos por esferoide entre os grupos tratados quando comparados entre si nos diferentes tempo apresentados, e suas médias nos dois parâmetros analisados se mantêm praticamente as mesmas, o que indica uma manutenção do efeito da desintegrina DisBa-01 independente do tempo analisado, demonstrando uma grande estabilidade desta proteína (Fig. 20 e 21).

Figura 20: Ensaio de brotamento de HUVEC tratadas com as concentrações indicadas de DisBa-01 em seus respectivos tempos também indicados em condições de normóxia e considerando o tamanho médio dos brotos por esferoide. Letras “a”, “b”, “c”, “d” e “e” acima das colunas indicam significância estatística em comparação ao controle em 24h (a); tratamento em 24h (b); controle em 48h (c); tratamento em 48h (d); controle em 72h (e).



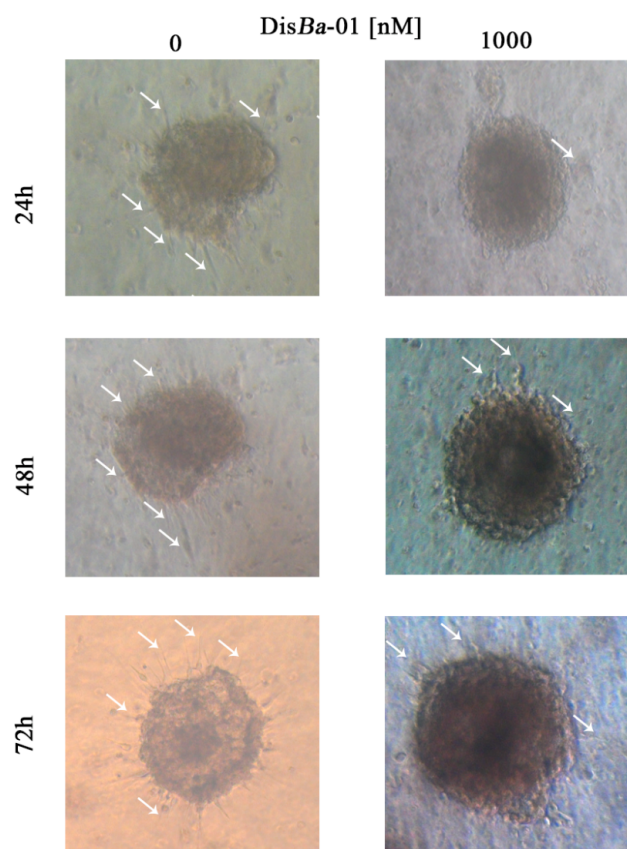
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Figura 21: Ensaio de brotamento de HUVEC tratadas com as concentrações indicadas de DisBa-01 em seus respectivos tempos também indicados em condições de normóxia e considerando o número de brotos por esferoide. Letras “a”, “b”, “c”, “d” e “e” acima das colunas indicam significância estatística em comparação ao controle em 24h (a); tratamento em 24h (b); controle em 48h (c); tratamento em 48h (d); controle em 72h (e).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Figura 22: Representação do ensaio de brotamento de HUVEC tratadas com as concentrações indicadas de *DisBa-01* em condição de normóxia. As setas indicam os brotos.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

5. CONCLUSÃO

De modo geral, este trabalho auxiliou na compreensão da atuação da desintegrina recombinante DisBa-01 em modelos celulares tridimensionais de câncer de mama e endoteliais, demonstrando as propriedades antiangiogênicas, antimetastáticas e de bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$ em diferentes condições de oxigenação, o que demonstra a necessidade de utilização de modelos de estudo que simulem melhor um ambiente *in vivo*.

A migração em câmara de Boyden foi utilizada para análise de migração dos modelos 3D de MDA-MB-231 e HUVEC. Assim, observamos a inibição da migração para ambas as culturas 3D com o bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$ em hipóxia e normóxia na presença da desintegrina recombinante DisBa-01. Os resultados entre a inibição da migração das células MDA-MB-231 e HUVEC são semelhantes, exceto para 100 nM da cultura 3D da MDA-MB-231 tanto em hipóxia quanto em normóxia.

A partir disso, pode-se concluir que a DisBa-01 é um bom inibidor para migração celular, independente do aumento ou diminuição da quantidade de colágeno ou de integrina $\alpha_v\beta_3$ em normóxia e hipóxia para culturas 3D de MDA-MB-231 e HUVEC, como mostraram os ensaios de imunofluorescência, nos quais, para a célula tumoral, a integrina $\alpha_v\beta_3$ apresentou um aumento em condições de normóxia, mas diminuição em hipóxia com o tratamento da DisBa-01. Não houve alterações na quantidade de colágeno da cultura 3D de MDA-MB-231. Em contrapartida, a quantidade de integrina $\alpha_v\beta_3$ da célula endotelial apresentou um aumento em hipóxia com a DisBa-01, e uma diminuição em normóxia. Já as quantidades de colágeno aumentaram em normóxia na presença da DisBa-01. Com isso, pode-se inferir que a reciclagem da integrina $\alpha_v\beta_3$ após seu bloqueio em baixa oxigenação, assim como as alterações do colágeno tipo I, são diferentes entre a célula tumoral de mama e a célula endotelial.

Além disso, a DisBa-01 mostra-se um excelente inibidor de angiogênese *in vitro*, como demonstrado nos ensaios de brotamento, em que o tratamento com a desintegrina inibiu o crescimento de brotos em células endoteliais em diferentes tempos, entretanto, mais estudos de brotamento utilizando modelos tridimensionais e a DisBa-01, utilizando fatores de crescimento, outras linhagens celulares e outras condições de oxigenação, visto que condições de hipóxia são amplamente encontradas em tumores sólidos, podem auxiliar na compreensão do processo de angiogênese no corpo humano.

Sendo assim, conclui-se que o presente estudo foi capaz de auxiliar no entendimento do microambiente tumoral e nos efeitos do tratamento de modelos tridimensionais de células de câncer de mama e endoteliais com a desintegrina recombinante DisBa-01.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADER, Marius; TANAKA, Elly M. Modeling human development in 3D culture. **Current opinion in cell biology**, v. 31, p. 23-28, 2014.

ANDERSON, Nicole M.; SIMON, M. Celeste. The tumor microenvironment. **Current Biology**, v. 30, n. 16, p. R921-R925, 2020.

ARNETH, Borros. Tumor microenvironment. **Medicina**, v. 56, n. 1, p. 15, 2019.

ARVELO, Francisco; COTTE, Carlos. Hipoxia en la malignidad del cáncer: Revisión. **Investigación clínica**, v. 50, n. 4, p. 529-546, 2009.

BADEA, Madalina Andreea et al. Influence of Matrigel on single-and multiple-spheroid cultures in breast cancer research. **SLAS DISCOVERY: Advancing Life Sciences R&D**, v. 24, n. 5, p. 563-578, 2019.

BHAT, Sharath M. et al. 3D tumor angiogenesis models: recent advances and challenges. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 147, n. 12, p. 3477-3494, 2021.

BROWN, J. Martin; WILSON, William R. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 6, p. 437-447, 2004.

BURROUGHS, Sarah K. et al. Hypoxia inducible factor pathway inhibitors as anticancer therapeutics. **Future medicinal chemistry**, v. 5, n. 5, p. 553-572, 2013.

CASALI, Bruna C. et al. The Effects of $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ Integrin Blockage in Breast Tumor and Endothelial Cells under Hypoxia In Vitro. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1745, 2022.

CALVETE, Juan J. The continuing saga of snake venom disintegrins. **Toxicon**, v. 62, p. 40-49, 2013.

CIPRIANO, Élia; MESQUITA, Alexandra. Emerging therapeutic drugs in metastatic triple-negative breast cancer. **Breast cancer: basic and clinical research**, v. 15, p. 11782234211002491, 2021.

DANILUCCI, Taís M. et al. Recombinant RGD-disintegrin Dis Ba-01 blocks integrin $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ and impairs VEGF signaling in endothelial cells. **Cell Communication and Signaling**, v. 17, n. 1, p. 1-15, 2019.

DESGROSELLIER, Jay S.; CHERESH, David A. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 1, p. 9-22, 2010.

FROEHLICH, Karolin et al. Generation of multicellular breast cancer tumor spheroids: comparison of different protocols. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 21, n. 3, p. 89-98, 2016.

HARBECK, Nadia et al. Breast cancer. **Nature reviews Disease primers**, v. 5, n. 1, p. 1-31, 2019.

HEISS, Maximilian et al. Endothelial cell spheroids as a versatile tool to study angiogenesis in vitro. **The FASEB Journal**, v. 29, n. 7, p. 3076-3084, 2015.

HUANG, Zhaoming; YU, Panpan; TANG, Jianhui. Characterization of triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cell spheroid model. **OncoTargets and therapy**, v. 13, p. 5395, 2020.

HYNES, Richard O.; NABA, Alexandra. Overview of the matrisome—an inventory of extracellular matrix constituents and functions. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 4, n. 1, p. a004903, 2012.

IMAMURA, Yoshinori et al. Comparison of 2D-and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. **Oncology reports**, v. 33, n. 4, p. 1837-1843, 2015.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ DE ALENCAR GOMES DA SILVA. **Brasil terá 625 mil novos casos de câncer a cada ano do triênio 2020-2022**, 7 de fevereiro de 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/noticias/brasil-tera-625-mil-novos-casos-de-cancer-cada-ano-do-trienio-2020-2022>. Acesso em: 30 mar. 2020.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ DE ALENCAR GOMES DA SILVA. **O que é câncer?**, 30 de novembro de 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>. Acesso em: 30 mar. 2022.

INSUA-RODRÍGUEZ, Jacob; OSKARSSON, Thordur. The extracellular matrix in breast cancer. **Advanced drug delivery reviews**, v. 97, p. 41-55, 2016.

JOYCE, Johanna A.; POLLARD, Jeffrey W. Microenvironmental regulation of metastasis. **Nature reviews cancer**, v. 9, n. 4, p. 239-252, 2009.

JU, Julia A. et al. Hypoxia selectively enhances integrin $\alpha 5\beta 1$ receptor expression in breast cancer to promote metastasis. **Molecular Cancer Research**, v. 15, n. 6, p. 723-734, 2017.

KIM, Jong Bin; STEIN, Robert; O'HARE, Mike J. Three-dimensional in vitro tissue culture models of breast cancer—a review. **Breast cancer research and treatment**, v. 85, n. 3, p. 281-291, 2004.

LAMICHHANE, Surya P. et al. Recapitulating epithelial tumor microenvironment in vitro using three dimensional tri-culture of human epithelial, endothelial, and mesenchymal cells. **BMC cancer**, v. 16, n. 1, p. 1-12, 2016.

LONGATTO FILHO, Adhemar; LOPES, José Manuel; SCHMITT, Fernando C. Angiogenesis and breast cancer. **Journal of oncology**, v. 2010, 2010.

MADU, Chikezie O. et al. Angiogenesis in breast cancer progression, diagnosis, and treatment. **Journal of Cancer**, v. 11, n. 15, p. 4474, 2020.

MEGO, Michal; MANI, Sendurai A.; CRISTOFANILLI, Massimo. Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer—clinical applications. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 7, n. 12, p. 693-701, 2010.

MEZU-NDUBUISI, Olachi J.; MAHESHWARI, Akhil. The role of integrins in inflammation and angiogenesis. **Pediatric research**, v. 89, n. 7, p. 1619-1626, 2021.

MONTENEGRO, Cyntia F. et al. Blocking $\alpha v \beta 3$ integrin by a recombinant RGD disintegrin impairs VEGF signaling in endothelial cells. **Biochimie**, v. 94, n. 8, p. 1812-1820, 2012.

MONTENEGRO, Cyntia F. et al. Inhibition of $\alpha v \beta 3$ integrin induces loss of cell directionality of oral squamous carcinoma cells (OSCC). **PLoS One**, v. 12, n. 4, p. e0176226, 2017.

NATH, Sritama; DEVI, Gayathri R. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. **Pharmacology & therapeutics**, v. 163, p. 94-108, 2016.

NYBERG, Pia et al. Tumor microenvironment and angiogenesis. **Front Biosci**, v. 13, n. 7, p.6537-6553, 2008.

OHMORI, Tohru et al. Blockade of tumor cell transforming growth factor- β s enhances cell cycle progression and sensitizes human breast carcinoma cells to cytotoxic chemotherapy. **Experimental cell research**, v. 245, n. 2, p. 350-359, 1998.

PUGH, Christopher W.; RATCLIFFE, Peter J. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. **Nature medicine**, v. 9, n. 6, p. 677-684, 2003.

RAMOS, Oscar HP et al. A novel $\alpha v \beta 3$ -blocking disintegrin containing the RGD motive, DisBa-01, inhibits bFGF-induced angiogenesis and melanoma metastasis. **Clinical & experimental metastasis**, v. 25, n. 1, p. 53-64, 2008.

RATHINAM, R.; ALAHARI, Suresh K. Important role of integrins in the cancer biology. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 29, n. 1, p. 223-237, 2010.

RIBEIRO, Livia CA et al. Recombinant disintegrin targets $\alpha (v) \beta (3)$ integrin and leads to mediator production. **Cell adhesion & migration**, v. 8, n. 1, p. 60-65, 2014.

SCULLY, Olivia Jane et al. Breast cancer metastasis. **Cancer genomics & proteomics**, v. 9, n. 5, p. 311-320, 2012.

SHOVAL, Hila et al. Tumor cells and their crosstalk with endothelial cells in 3D spheroids. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2017.

SORG, Brian S. et al. Spectral imaging facilitates visualization and measurements of unstable and abnormal microvascular oxygen transport in tumors. **Journal of biomedical optics**, v. 13, n. 1, p. 014026, 2008.

SUNG et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.

THEOCHARIS, Achilleas D. et al. Extracellular matrix structure. **Advanced drug delivery reviews**, v. 97, p. 4-27, 2016.

VAUPEL, Peter; MAYER, Arnulf. Hypoxia and anemia: effects on tumor biology and treatment resistance. **Transfusion clinique et biologique**, v. 12, n. 1, p. 5-10, 2005.

VAUPEL, Peter; MAYER, Arnulf; HÖCKEL, Michael. Tumor hypoxia and malignant progression. **Methods in enzymology**, v. 381, p. 335-354, 2004.

VAUPEL, Peter. Prognostic potential of the pretherapeutic tumor oxygenation status. In: **Oxygen Transport to Tissue XXX**. Springer, Boston, MA, 2009. p. 241-246.

YOUSEFI, Hassan et al. Understanding the role of integrins in breast cancer invasion, metastasis, angiogenesis, and drug resistance. **Oncogene**, p. 1-21, 2021.

ZIELLO, Jennifer E.; JOVIN, Ion S.; HUANG, Yan. Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 80, n. 2, p. 51, 2007.