

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

PAULO CESA DE ALMEIDA JUNIOR

**ESTUDOS IN VIVO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE UMA
DESINTEGRINA INIBIDORA DA INTEGRINA $\alpha_v\beta_3$**

SÃO CARLOS -SP
2026

PAULO CESA DE ALMEIDA JUNIOR

**ESTUDOS IN VIVO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE UMA
DESINTEGRINA INIBIDORA DA INTEGRINA $\alpha v \beta 3$**

Monografia apresentada ao
Departamento de
Enfermagem da Universidade
Federal de São Carlos para
obtenção do título de Bacharel
em Enfermagem.

Orientador: Prof^a Dr^a Heloísa
Sobreiro Selistre de Araújo

São Carlos -SP
2026

Júnior, Paulo Cesa de Almeida

ESTUDOS IN VIVO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE
UMA DESINTEGRINA INIBIDORA DA INTEGRINA $\alpha v \beta 3$
/ Paulo Cesa de Almeida Júnior -- 2026.
77f.

TCC (Graduação) - Universidade Federal de São Carlos,
campus São Carlos, São Carlos
Orientador (a): Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo
Banca Examinadora: Kelli Cristina Micocci, Ana Carolina
Baptista Moreno Martin
Bibliografia

1. Inibição de integrinas. 2. Biologia celular. 3.
Progressão tumoral. I. Júnior, Paulo Cesa de Almeida. II.
Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Arildo Martins - CRB/8 7180

ERRATA

JUNIOR, Paulo Cesa de Almeida. **Estudo *in vivo* da atividade antitumoral de uma desintegrina inibidora da integrina $\alpha\text{v}\beta 3$** , 2026. 71 páginas. Monografia - Departamento de Enfermagem, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2026.

Folha	Linha	Onde se lê	Leia-se
Indicar o n°	Indicar o n°	Indicar o erro	Indicar a correção

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas

Bacharelado em Enfermagem

Folha de aprovação

Assinatura dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de Monografia do candidato Paulo Cesa de Almeida Junior, realizada em 16/07/2026.

Profª Drª Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo

Universidade Federal de São Carlos

Profª Drª Kelli Cristina Micocci

Universidade Federal de São Carlos

Profª Drª Ana Carolina Baptista Moreno Martin

Hospital do Câncer de Barretos

CENTRO DE PESQUISA EM ONCOLOGIA MOLECULAR - BIOTÉRIO

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a Deus, à minha noiva, Priscila, e aos meus pais, Paulo e Rozenei.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ser minha Força diária e Aquele que me sustentou até aqui: Ebenézer. Agradeço à minha noiva, Priscila, pelo apoio nas decisões e por caminhar sempre ao meu lado. Agradeço aos meus pais, Paulo e Rozenei, pela ajuda, parceria e o amor que me dão todo dia, junto com meus irmãos, Gabriel e Josué e suas famílias, e ao meu sogro e minha sogra, Lindomar e Adriana: sem o apoio de todos vocês, com certeza teria sido mais difícil. Agradeço à minha orientadora, Prof^a Dr^a Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo, do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar, pelos ensinamentos e pela paciência comigo em diversas situações, auxiliando na construção da minha carreira acadêmica de forma tão presente e fundamental. Agradeço ao meu co-orientador Prof. Dr. Rafael Luís Bressani Lino, do LMBBM, da UFSCar, pelo auxílio na parte não cirúrgica do presente estudo. Agradeço à Heloísa Máximo Ribeiro, Médica Veterinária, atual Doutoranda do LABEN da UFSCar, pela realização de todos os procedimentos cirúrgicos do presente estudo. Agradeço à Prof^a Dr^a Cynthia Aparecida de Castro, ao Dr. Paulo Henrique Marques de Andrade e à Dr^a Marcela Sene-Fiorese, ambos do Departamento de Morfologia e Patologia da UFSCar, por todo auxílio em todos os procedimentos de histologia do presente estudo. Agradeço à Prof^a Dr^a Lucimar Retto da Silva de Avó, Histopatologista do Departamento de Medicina da UFSCar, pela avaliação de todas as lâminas histológicas do presente estudo. Agradeço à Prof^a Dr^a Dulce Helena Ferreira de Souza, do Departamento de Química da UFSCar pela generosa doação dos reveladores para realização do ensaio de *Western Blotting*. Agradeço à Dr^a Sabrina Peviani, pesquisadora do LABEN, pelo auxílio nos ensaio de qPCR *real time*. Agradeço também aos demais mentores: Dr^a Grazielle F. Deriggi Pisani, Dr^a Kelli Cristina Micocci, Dr^a Mônica Rosas da Costa Iemma e Dr^a Angelina Maria Fuzer, as quais me ajudaram nessa jornada com um aperfeiçoamento tão necessário e fundamental. Agradeço aos meus amigos, Raul, Michaeli, Ana Horta, Ana Woord, Aline, Júlia, Khayyam e demais colegas do laboratório pelas risadas, aprendizados em conjunto e por tudo que nossa vivência nos proporcionou. Agradeço às colaboradoras do Departamento, Bete e Jana, que de forma sempre amável nos permitiram, diariamente, um local limpo e agradável para nossas realizações acadêmicas. Agradeço aos meus amigos de curso, Eduardo, Kevin, Letícia, Giovana, Ariel, Rebeca e Yasmin, pelos momentos juntos

de estresse e descontração durante toda nossa graduação. Agradeço também à FAPESP e à CNPq pelos 3 anos de incentivo financeiro para realização do estudo. E, por fim, agradeço aos meus irmãos de Fé, a Família Elohim, que sempre estão ao meu lado de forma invisível, mas presentes, me apresentando em suas orações: amo a todos!

“A Enfermagem é uma arte; e para realizá-la como arte, requer uma devoção tão exclusiva, um preparo tão rigoroso, quanto a obra de qualquer pintor ou escultor; pois o que é tratar da tela morta ou do frio mármore comparado ao tratar do corpo vivo, o templo do Espírito de Deus? É uma das artes; poder-se-ia dizer, a mais bela das artes!”

Florence Nightingale

RESUMO

O câncer representa um ecossistema complexo que compreende células tumorais e um conjunto de células não cancerosas, incorporadas em uma matriz extracelular alterada. O microambiente tumoral (MT) inclui diversos tipos de células imunes, fibroblastos associados ao câncer, células endoteliais, pericitos e vários tipos adicionais de células residentes em tecidos. Estas células hospedeiras já foram consideradas espectadoras da tumorigênese, mas agora são conhecidas por desempenharem papéis críticos na patogênese do câncer. Durante o remodelamento vascular e a angiogênese, por exemplo, as células endoteliais aumentam a expressão de vários constituintes de superfície que potencializam a invasão e a proliferação celular, incluindo a integrina $\alpha\beta3$. A integrina $\alpha\beta3$ é um receptor de vitronectina que reconhece o motivo adesivo RGD, sendo essencial para a direcionalidade da migração celular. Nosso grupo estudou previamente essa integrina utilizando a desintegrina recombinante DisBa-01, derivada do veneno de *Bothrops alternatus*, produzida com um peptídeo His-tag por meio de expressão heteróloga e purificação. O objetivo do presente estudo é avaliar os possíveis efeitos da inibição farmacológica da integrina $\alpha\beta3$ na angiogênese e na progressão tumoral em um modelo experimental singênico de câncer de mama triplo negativo. Avaliou-se o efeito da inibição local e sistêmica da integrina $\alpha\beta3$ no desenvolvimento tumoral primário em camundongos fêmeas Balb-C utilizando células 4T1Br4-*mCherry*. Após a formação tumoral, os animais foram divididos em dois experimentos (Experimento de Metástase Espontânea Não Cirúrgico e com Cirurgia), compostos por três grupos (Grupo Controle 1, Grupo DisBa-01 e Grupo Controle 2) e tratados por um período específico. Após a eutanásia, foram coletadas amostras dos órgãos dos animais para posterior análise por qPCR *real time* e histologia, além da imunofluorescência. O estudo foi submetido à CEUA-UFSCar e aprovado sob o protocolo CEUA nº 9550180823. Os resultados demonstraram que a inibição farmacológica da integrina $\alpha\beta3$ pela DisBa-01 modulou o microambiente tumoral com efeitos pró e antitumorais em ambos os experimentos. Observou-se aumento da deposição de colágeno nos tumores no experimento 1 e maior potencial de recidiva tumoral no grupo tratado com a desintegrina no experimento 2, além de redução da metástase pulmonar, confirmada por qPCR em ambos os experimentos. Comparativamente, os animais não submetidos à cirurgia apresentaram melhor resposta ao tratamento, enquanto o experimento com cirurgia evidenciou maior disseminação metastática e menor sobrevida. Assim, a inibição isolada da integrina $\alpha\beta3$ não foi suficiente para conter a progressão tumoral *in vivo*, destacando a necessidade de estudos adicionais sobre sua relação com o microambiente tumoral.

Palavras-chave: desintegrina; antitumoral; $\alpha\beta3$; metástase; DisBa-01.

ABSTRACT

Cancer represents a complex ecosystem composed of tumor cells and a diverse population of non-malignant cells embedded within an altered extracellular matrix. The tumor microenvironment (TME) comprises various immune cell types, cancer-associated fibroblasts, endothelial cells, pericytes, and several additional tissue-resident cell populations. These host cells were once regarded as mere bystanders in tumorigenesis but are now recognized as playing critical roles in cancer pathogenesis. During vascular remodeling and angiogenesis, for example, endothelial cells upregulate the expression of several cell-surface molecules that promote tumor cell invasion and proliferation, including integrin $\alpha\beta3$. Integrin $\alpha\beta3$ is a vitronectin receptor that recognizes the adhesive motif RGD and plays an essential role in directing cell migration. Our group has previously investigated this integrin using the recombinant disintegrin DisBa-01, derived from *Bothrops alternatus* venom and produced as a His-tag recombinant protein through heterologous expression and purification. The aim of the present study was to evaluate the potential effects of the pharmacological inhibition of integrin $\alpha\beta3$ on angiogenesis and tumor progression in a syngeneic experimental model of triple-negative breast cancer. The effects of local and systemic inhibition of integrin $\alpha\beta3$ on primary tumor development were evaluated in female BALB/c mice inoculated with 4T1Br4-mCherry cells. Following tumor establishment, the animals were allocated into two experimental models (Non-surgical Spontaneous Metastasis and Surgical Spontaneous Metastasis), each comprising three groups (Control Group 1, DisBa-01 Group, and Control Group 2), and were treated for a defined period. After euthanasia, tissue samples from multiple organs were collected for subsequent real-time quantitative PCR, histological, and immunofluorescence analyses. The study was approved by the Animal Ethics Committee of the Federal University of São Carlos under protocol number 9550180823. The results demonstrated that pharmacological inhibition of integrin $\alpha\beta3$ by DisBa-01 modulated the tumor microenvironment, producing both pro-tumorigenic and antitumor effects in both experimental models. Increased collagen deposition was observed in tumors from Experiment 1, whereas a greater potential for tumor recurrence was detected in the DisBa-01-treated group in Experiment 2. In addition, reduced pulmonary metastasis was confirmed by qPCR in both experiments. Comparatively, animals that did not undergo surgery exhibited a better therapeutic response, whereas the surgical model showed greater metastatic dissemination and reduced survival. Collectively, these findings indicate that inhibition of integrin $\alpha\beta3$ alone was insufficient to restrain tumor progression *in vivo*, highlighting the need for further studies to elucidate its relationship with the tumor microenvironment.

Keywords: disintegrin; antitumoral; $\alpha\beta3$; metastasis; DisBa-01.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fig. 1 - “A Cascata Metastática”	21
Fig. 2 - “Aspecto geral da cadeia $\alpha\beta3$ e DisBa-01”	24
Fig. 3 - “Esquema representativo do modelo experimental não cirúrgico”	31
Fig. 4 - “Representação das amostras biológicas coletadas na eutanásia”	31
Fig. 5 - “Esquema representativo do modelo experimental cirúrgico”	33
Fig. 6 - “Esquema do processo de produção da desintegrina DisBa-01”	41
Fig. 7 - “Análise da expressão proteica de DisBa-01 por <i>E. coli</i> BL21(DE) após indução por IPTG em gel de SDS-PAGE”	42
Fig. 8 - “Análise por SDS-PAGE das frações extraídas da purificação da coluna de níquel”	42
Fig. 9 - “Perfil cromatográfico da amostra impura de DisBa-01 em coluna SUPERDEX 75”	43
Fig. 10 - “Análise da expressão proteica de DisBa-01 com as amostras extraídas do AKTA PURE© resultante da purificação em coluna de SUPERDEX 75”	43
Fig. 11 - “Análise da expressão proteica de DisBa-01 com as amostras extraídas do AKTA PURE© resultante da purificação em coluna MONO Q”	44
Fig. 12 - “Quantificação por BCA da amostra purificada”	44
Fig. 13 - “Ensaio de inibição de migração de células endoteliais em câmara de Boyden”	45
Fig. 14 - “ <i>Western blotting</i> para detecção de amostras de DisBa-01 por anticorpo <i>anti-Histag</i> ”	46
Fig. 15 - “Gráfico de Kaplan-Meier experimento 1”	47
Fig. 16 - “Evolução do peso corporal dos animais do experimento de metástase espontânea não cirúrgico durante as 7 semanas de experimento”	48
Fig. 17 - “Análise comparativa do peso dos órgãos dos grupos tratados e não tratados do experimento de metástase espontânea não cirúrgico”	49
Fig. 18 - “Tecidos acometidos por metástase no experimento de metástase espontânea não cirúrgico”	50
Fig. 19 - “Parte distal dos tumores do experimento de metástase espontânea não cirúrgico”	51
Fig. 20 - “Parte central dos tumores do experimento de metástase espontânea não cirúrgico”	52

Fig. 21 - “Representação da região mamária dos animais do experimento de metástase espontânea não cirúrgico”	53
Fig. 22 - “Gráfico em <i>dot plot</i> com o RTB dos pulmões dos experimento de metástase espontânea não cirúrgico”	55
Fig. 23 - “Imunodeteção da integrina $\alpha\beta 3$ experimento de metástase espontânea não cirúrgico”	56
Fig. 24 - “Representação da porcentagem da área dos tumores do experimento de metástase espontânea não cirúrgico em que há fluorescência”	57
Fig. 25 - “Gráfico de Kaplan-Meier experimento de metástase espontânea com cirurgia”	58
Fig. 26 - “Desenvolvimento do peso corporal dos grupos tratados com tratamento sistêmico ao longo do tempo de experimento”	58
Fig. 27 - “Pesos relativos de cada órgão coletado dos animais após a realização da eutanásia no experimento de metástase espontânea com cirurgia”	59
Fig. 28 - “Prancha representativa dos tecidos afetados nos animais do experimento de metástase espontânea com cirurgia”	60
Fig. 29 - “Prancha dos demais tecidos saudáveis dos animais do experimento de metástase espontânea com cirurgia”	61
Fig. 30 - “Quantificação da expressão dos genes de interesse e do gene de referência”	62
Fig. 31 - “Imunodeteção da integrina $\alpha\beta 3$ no experimento de metástase espontânea com cirurgia”	63
Fig. 32 - Representação da porcentagem da área do tumor com fluorescência	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - “Representação da alocação dos órgãos após a eutanásia”	32
Tabela 2 - “Molde para as contas de aliquotação da <i>working solution</i> ”	38
Tabela 3 - “Representação dos valores de Média e Desvio Padrão relativos aos comprimentos e peso dos tumores e peso dos baços coletados entre os diferentes grupos do experimento de metástase espontânea não cirúrgico”	47
Tabela 4 - “Representação do número de metástases por sítio de cada animal do experimento de metástase espontânea não cirúrgico”	53
Tabela 5 - “Representação do número de metástases por sítio de cada animal do experimento de metástase espontânea com cirurgia”	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAFs - *Cancer associated fibroblasts* - Fibroblastos Associados ao Câncer

BMP - *Bone Morphogenetic Protein* - Proteína Morfogenética Óssea

EGF - *Epidermal Growth Factor* - Fator de Crescimento Epidérmico

ERK - *Extracellular Signal-Regulated Kinase* - Quinase Regulada por Sinais Extracelulares

EVs - *Extracellular vesicles* - Vesículas Extracelulares

Exp. 1 - Experimento 1 - Experimento de Metástase Espontânea Não Cirúrgico

Exp. 2 - Experimento 2 - Experimento de Metástase Espontânea com Cirurgia

FGF - *Fibroblast Growth Factor* - Fator de Crescimento de Fibroblastos

HGF - *Hepatocyte Growth Factor* - Fator de Crescimento de Hepatócitos

HER-2 - *Human Epidermal Receptor 2* - Receptor 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano

HUVEC - *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* - Células Endoteliais de Veia Umbilical Humana

IL32 - Interleucina 32

MDR - *Multidrug resistance* - Resistência a Múltiplas Drogas

MEC - Matriz Extracelular

MT - Microambiente Tumoral

NSCLC - *Non-Small Cell Lung Cancer* - Câncer de Pulmão de Células não Pequenas

OPN - Osteopontina

PDGF - *Platelet-Derived Growth Factor* - Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

qPCR - *Real Time Quantitative PCR* - Cadeia da Polimerase Reversa Quantitativa em Tempo Real

RTB - *Relative Tumor Burden* - Carga Tumoral Total

RTKis - *Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors* - Inibidores de Receptores Tirosina Quinase

SF 0,9% - Soro Fisiológico 0,9% - solução salina

TEM - Transição Epitélio-Mesenquimal

TGF β - *Transforming Growth Factor Beta* - Fator de Crescimento Transformador Beta

TNBC - *Triple Negative Breast Cancer* - Câncer de Mama Triplo Negativo

VEGF - *Vascular Endothelial Growth Factor* - Fator de Crescimento Endotelial Vascular

VEGFR2 - *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2* - Receptor 2 do Fator de Crescimento Endotelial Vascular

Wnt - *Wingless/Integrated*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS	26
2.1 Objetivos Gerais	26
2.2 Objetivos Específicos	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Produção Recombinante de DisBa-01	27
3.2 Cultivo Celular	29
3.3 Modelo Murino Experimental	30
3.3.1 Delineamento Experimental - Experimento 1	30
3.3.2 Delineamento Experimental - Experimento 2	32
3.3.3 Tumorectomia	33
3.4 Análise Histológica	34
3.5 Montagem das Lâminas	34
3.6 Coloração das Lâminas	35
3.7 Leitura das Lâminas	36
3.8 Detecção do Gene <i>mCherry</i> por qPCR	36
3.9 Relative Tumor Burden (RTB)	39
3.10 Detecção da Integrina $\alpha\beta 3$ por Imunofluorescência	39
3.11 Análises Estatísticas	40
4. RESULTADOS	41
4.1 Produção da DisBa-01	41
4.1.1 Crescimento bacteriano, Expressão da DisBa-01 e Lise Celular	42
4.1.2 Purificação, Diálise e Concentração da Proteína	42
4.1.3 Cromatografia nas Colunas MONOQ e SUPERDEX 75	43
4.1.4 Quantificação da Proteína	44
4.1.5 Teste de Atividade em Cultura Celular	45
4.1.6 Confirmação da Identificação da DisBa-01 por Western Blotting	45
4.2 Modelo Murino Experimental	46
4.2.1 Experimento de Metástase Espontânea Não Cirúrgico	46
4.2.1.1 Análise Histológica	49
4.2.1.2 Detecção do Gene <i>mCherry</i> por qPCR	54
4.2.1.3 Detecção da Integrina $\alpha\beta 3$ por Imunofluorescência	56

4.2.2 Experimento de Metástase Espontânea com Cirurgia	57
4.2.2.1 Análise Histológica	59
4.2.2.2 Detecção do Gene mCherry por qPCR	61
4.2.2.3 Detecção da Integrina $\alpha\beta 3$ por Imunofluorescência	63
4.3 Comparação Entre os Experimentos	64
5. DISCUSSÃO	64
5.1 Experimento de Metástase Espontânea Não Cirúrgico	65
5.2 Experimento de Metástase Espontânea com Cirurgia	66
6. FATORES LIMITANTES	68
7. CONCLUSÕES	68
8. REFERÊNCIAS	70
ANEXO I	76

1. INTRODUÇÃO

A compreensão da ciência sobre o câncer evoluiu fundamentalmente ao longo das últimas décadas. Atualmente, considera-se que o câncer não se trata simplesmente de uma doença genética ou epigenética, mas sim um ecossistema complexo, que envolve uma ampla gama de células não cancerosas e suas inúmeras interações dentro do tumor. O microambiente tumoral é um ecossistema altamente estruturado contendo células cancerígenas cercadas por diversos tipos de células não malignas, coletivamente incorporados em uma matriz extracelular alterada e vascularizada. Entende-se que as células cancerígenas orquestram um ambiente de suporte ao tumor, recrutando e reprogramando células hospedeiras não cancerosas e remodelando a vasculatura e a matriz extracelular (MEC). Esse processo dinâmico depende de interações heterotípicas entre células cancerígenas e células residentes não cancerosas recrutadas do MT (JOYCE, 2023).

De acordo com o Ministério da Saúde, o câncer de mama é uma doença resultante da multiplicação de células anormais da mama, que formam um tumor com potencial de invadir outros órgãos (INCA, 2023). No Brasil, em 2023 houve mais de 20 mil mortes relacionadas à doença, e em 2025 houve 73.610 novos casos estimados, tornando-o o tipo mais comum de câncer, depois do câncer de pele, e também o que causa mais mortes por câncer em mulheres (INCA, 2025). A história natural do câncer de mama indica que o curso clínico da doença e a sobrevida variam de paciente para paciente (SOUZA *et al.*, 2008). Esta variação é determinada por uma série complexa de fatores, tais como a diferença na velocidade de duplicação tumoral, o potencial de metastatização do tumor e outros mecanismos, ainda não completamente compreendidos, relacionados com a condição imunológica, hormonal e nutricional do paciente (SOUZA *et al.*, 2008).

No câncer de mama o maior desafio clínico ainda é a prevenção e o tratamento de metástases, a principal causa de morte de pacientes com a doença. Infelizmente, para esta condição, existem poucas opções terapêuticas. Inicialmente, acreditava-se que a metástase se desenvolvia a partir de tumores avançados; no entanto, estudos recentes mostraram que as células tumorais podem se disseminar na corrente sanguínea mesmo antes dos tumores serem detectáveis pelos métodos diagnósticos atuais (DASGUPTA *et al.*, 2017; GRZELAK e GHAJAR, 2017, HOSSEINI *et al.*, 2016). Desta forma, compreender os mecanismos moleculares

que envolvem todas as fases da cascata metastática poderá contribuir de forma importante para o desenvolvimento de terapias mais eficientes.

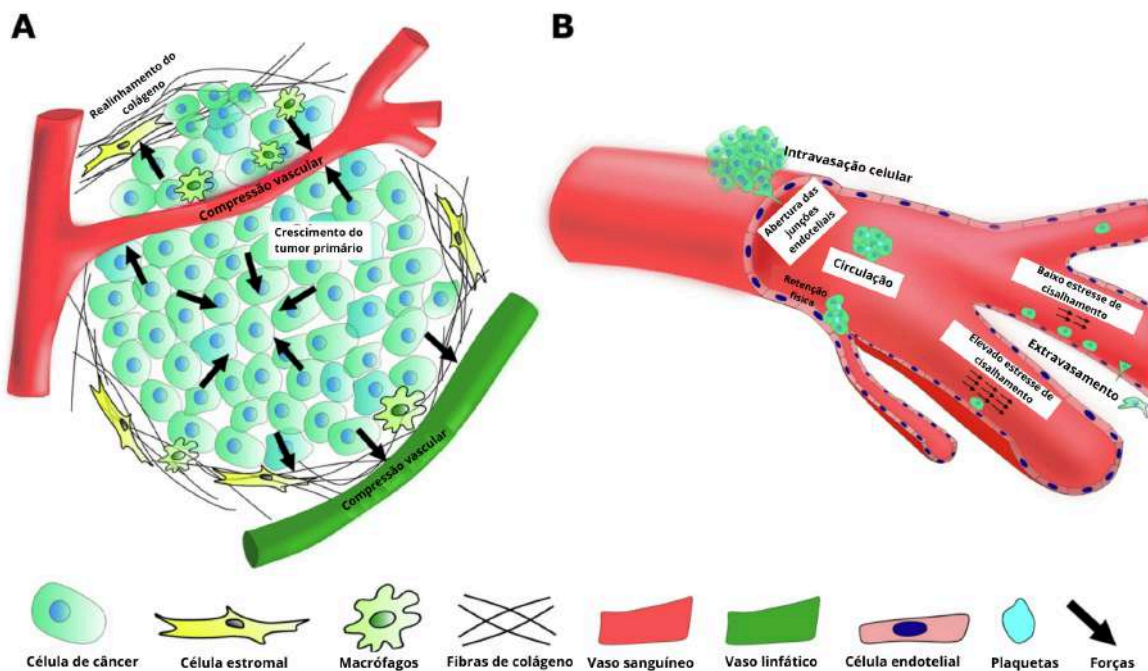
Hanahan (2026) aponta que existem marcas registradas (“*hallmarks*”) do câncer, ou seja, características específicas encontradas em todas as células cancerígenas. Em seu estudo, o mesmo demonstrou que existem 9 características próprias encontradas nas células tumorais: 1) Manutenção da sinalização proliferativa; 2) Resistência à morte celular programada; 3) Indução ou acesso à vasculatura; 4) Aquisição de plasticidade fenotípica; 5) Ativação da invasão e da metástase; 6) Evasão da destruição imunológica; 7) Desregulação do metabolismo celular; 8) Estabelecimento da imortalidade replicativa; e 9) Inativação dos supressores do crescimento. No que tange ao desenvolvimento metastático, em estudos anteriores (WELCH & HURST, 2019), demonstrou-se que existem marcos específicos característicos de tal processo, sendo estes: 1) Motilidade e invasão; 2) Modulação do microambiente tumoral; 3) Plasticidade celular e 4) Invasão.

A metástase depende da capacidade das células tumorais de adquirir um fenótipo invasivo, permitindo sua migração, invasão dos tecidos adjacentes, intravasação, sobrevivência na circulação, extravasação e colonização de órgãos distantes (HANAHAHAN, 2022). Essas mudanças envolvem uma reprogramação das interações célula-célula e célula-matriz extracelular, ou seja, alterações nos mecanismos de adesão celular, frequentemente associadas à transição epitélio-mesenquimal (TEM) e à plasticidade fenotípica. Além disso, ressalta-se como a plasticidade fenotípica permite que células cancerosas alternem entre estados mais aderentes e mais migratórios, favorecendo a disseminação metastática (WELCH & HURST, 2019).

A cascata metastática (Fig. 1) compreende diversas fases que podem ser resumidas nos seguintes passos principais: i) a dissociação de células tumorais ou de vesículas extracelulares (EVs) do tumor primário, ii) entrada e saída da corrente sanguínea ou linfática, e iii) subsequente adesão e crescimento em um novo local, geralmente distante do sítio primário (COMINETTI *et al.*, 2019). A primeira fase envolve a perda de adesão célula-célula e célula-matriz e aquisição de um fenótipo migratório invasivo denominado de transição epitélio-mesenquimal, auxiliado pela secreção e ativação de proteases que degradam a MEC (LABELLE e HYNES, 2012; YEUNG e YANG, 2017). As células tumorais alteram o microambiente em que se encontram, por meio da secreção de fatores de crescimento e outras moléculas,

modificando o comportamento de células estromais residentes tais como fibroblastos e adipócitos, criando um ambiente pró-inflamatório (RANKIN *et al.*, 2016). Este ambiente tumoral, associado à hipóxia causada pelo crescimento da massa tumoral, resulta em ativação de células endoteliais para a produção de novos vasos que possam alimentar o tumor. A angiogênese tumoral, por sua vez, facilita o intravasamento de células cancerosas e de suas EVs na corrente circulatória, auxiliando na propagação da sinalização tumoral (JAIN, 2001; FERRARA, 2010).

Fig. 1: A Cascata Metastática. (A) Demonstração das forças para desaderência da célula do sítio primário pela perda de adesão célula-célula e seu (B) intravasamento para os vasos adjacentes para posterior extravasamento e colonização de novo sítio.



Fonte: adaptado de AGRAWAL *et al.*, 2025.

Na circulação sanguínea ou linfática, as células tumorais circulantes precisam sobreviver a múltiplos estressores tais como o estresse do cisalhamento e o ataque do sistema imune, antes que consigam extravasar e chegar a um novo sítio (MASSAGUÉ e OBENAU, 2016). Para se protegerem dos estressores vasculares durante o trânsito na corrente sanguínea, as células tumorais circulantes podem se associar a plaquetas e depósitos de fibrina (LABELLE *et al.*, 2011). Além de escapar da vigilância do sistema imune, a associação com plaquetas e fibrina favorece a formação de adesões fortes e a transmigração através do endotélio (LABELLE e HYNES, 2012; GAY e FELDING-HABERMANN, 2011). Por outro lado, estes

agregados podem se comportar como microêmbolos e obstruir capilares resultando em focos metastáticos (ACETO *et al.*, 2014; CHO *et al.*, 2012). Estudos em modelos de injeção intravascular de células tumorais mostraram que estas são retidas pela rede de capilares poucos minutos após a administração. As células aderem ao endotélio sofrendo a ação dos estressores por períodos que podem variar de horas a poucos dias (LABELLE e HYNES, 2012). Diversos estudos comprovaram que menos de 1% de células tumorais circulantes vão ter sucesso na colonização secundária. Além disso, nem todas as células que extravasam resultarão imediatamente em metástases, podendo permanecer dormentes por meses ou mesmo anos antes de iniciarem a proliferação e se tornarem metástases clinicamente detectáveis (MACK e MARSHALL, 2010). É conhecido pela ciência a subdivisão dos diferentes tipos de tumores de mama pela classificação molecular dos mesmos, definida pela presença ou não de receptores hormonais: 1) Luminal A (possuem receptores de estrogênio e progesterona e não apresentam HER-2), 2) Luminal B (possuem receptores de estrogênio e/ou progesterona e não apresentam HER-2), 3) HER-2 (não expressam receptores hormonais, mas expressam HER-2) e 4) Triplo Negativo (não expressam receptores hormonais e nem HER-2) (FEMAMA, 2019).

O câncer de mama triplo-negativo (TNBC) envolve a ausência ou a expressão patologicamente deficiente dos receptores de progesterona, de estrogênio, e do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER-2). O TNBC representa cerca de 15–20% dos casos recém-diagnosticados e suas características incluem um cenário molecular complexo, proliferação agressiva/alta, levando a um mau prognóstico e heterogeneidade comportamental (BIANCHINI *et al.*, 2016), não possuindo tratamento alvo até o momento atual. Além disso, o rápido desenvolvimento do TNBC também pode levar ao desenvolvimento de hipóxia interna e subsequente núcleo necrótico, onde tumores triplo-negativos desenvolvem a resistência a múltiplas drogas (MDR - *multidrug resistant*) com pior prognóstico (LI *et al.*, 2021).

A angiogênese, processo de desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, é essencial para a tumorigênese. Quando um tumor cresce além de 1–2 mm, ele deve estabelecer seu próprio suprimento vascular de oxigênio e nutrientes. Os vasos tumorais são constantemente expostos a sinais pró-angiogênicos derivados principalmente das células tumorais, levando a uma

vasculatura desorganizada, tortuosa e com brechas devido à cobertura defeituosa de pericitos e revestimento descontínuo por células endoteliais. Isso afeta a oxigenação dos tumores, altera a dinâmica das células imunológicas e pode reduzir ou aumentar a penetração do medicamento nos tumores. É importante ressaltar que as interações entre a vasculatura e as células do sistema imunológico são recíprocas. Há evidências crescentes de que a angiogênese induzida por tumor contribui para a imunossupressão e a evasão imunológica. (JOYCE, 2023).

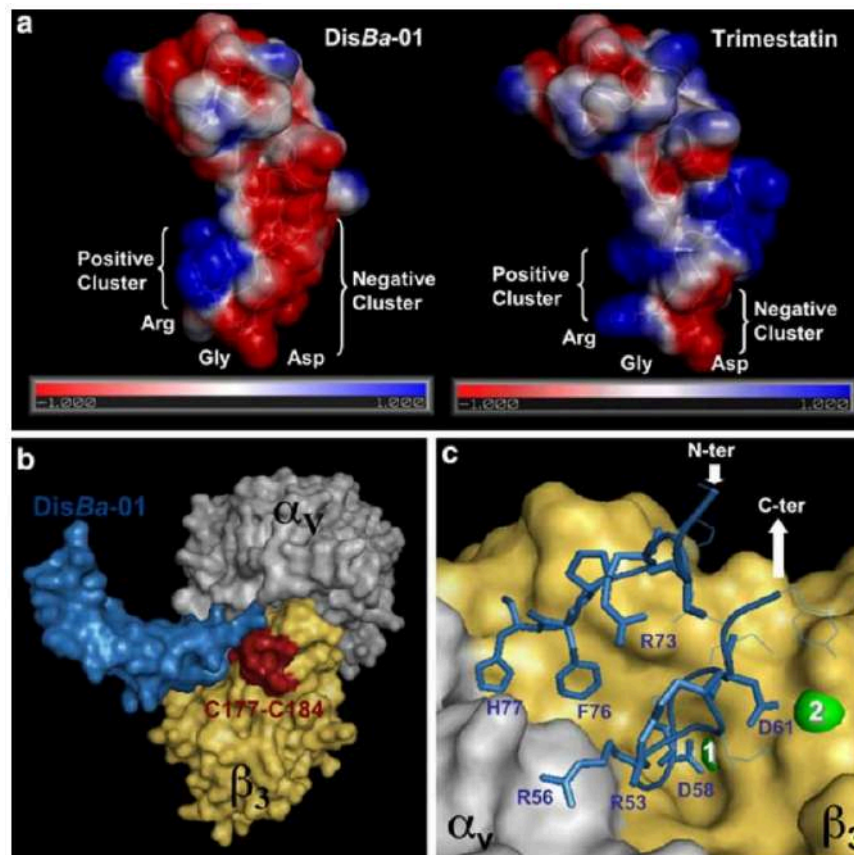
As integrinas são uma família de macromoléculas mediadoras da migração e adesão celular e reguladoras da angiogênese e da homeostasia vasculares. É conhecido que elas fornecem interação física com a matriz extracelular necessária para a adesão, migração e posicionamento celulares e a indução de eventos sinalizadores essenciais para a sobrevivência, proliferação e diferenciação celular (SILVA *et al.*, 2007). Durante o remodelamento vascular e a angiogênese, as células endoteliais aumentam a expressão de vários constituintes da sua superfície que potencializam a invasão e proliferação celular, dentre eles a integrina $\alpha\beta3$ (NERI e BICKNELL, 2005).

A integrina $\alpha\beta3$ é um receptor de vitronectina que reconhece o motivo adesivo RGD. Esta integrina é essencial para manutenção de adesões estáveis e pela direcionalidade da migração celular (MONTENEGRO *et al.*, 2017). Estudos recentes demonstraram que a integrina $\alpha\beta3$ possui papel relevante na progressão do tumor e na resistência à quimioterapia. A integrina $\alpha\beta3$ também está diretamente envolvida no processo de transição epitélio mesenquimal (TEM). Este processo envolve a conversão de células epiteliais em um fenótipo mesenquimal, estimulado por um conjunto bastante grande de fatores de transcrição tais como fatores de crescimento (FGF, EGF, HGF, PDGF, VEGF) e outras moléculas sinalizadoras (Wnt, TGF β , BMP, estrógeno) (VLAHAKIS e DEBNATH, 2017). Ao sofrerem o processo de TEM, as células epiteliais adquirem características tais como motilidade aumentada e capacidade de invasão, resistência à apoptose e a quimioterápicos.

Proteínas exógenas possuindo o motivo RGD, tais como as desintegrinas, também podem ligar-se a integrinas e bloquear as suas funções. As desintegrinas são pequenas proteínas isoladas do veneno de serpente, geralmente derivadas da proteólise de precursores com atividade metaloprotease. Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa sobre a função da integrina $\alpha\beta3$ foram realizados

utilizando a desintegrina recombinante denominada DisBa-01 (desintegrina de *Bothrops alternatus*), produzida em fusão N-terminal com um peptídeo *His-tag*, com a seguinte sequência de aminoácidos em sua composição: [NELLEAGEECDCGTPGNPCCDAATCKLRPGAQCAEGLCCDQCRFMKEGTVCRIRGDMDDDYCNISAGCPRNPFHA] (RAMOS *et al.*, 2008) (Fig. 2). Por meio de ressonância plasmônica de superfície, foi demonstrado que essa desintegrina liga-se à integrina $\alpha\beta 3$ com elevada afinidade (K_D 1.6×10^{-7} M), cerca de 100 vezes maior que a sua afinidade para a integrina $\alpha 5\beta 1$ (K_D 7.62×10^{-5} M), receptor de fibronectina que também reconhece o motivo de ligação RGD (MONTENEGRO *et al.*, 2017). Desta forma, esta proteína tem sido utilizada como ferramenta no estudo do papel da integrina $\alpha\beta 3$ na metástase.

Fig. 2: Aspecto geral da cadeia $\alpha\beta 3$ e da DisBa-01



Fonte: Ramos *et al.*, 2008.

Ramos (2008) descreve a imagem acima da seguinte forma:

“O aspecto geral da cadeia α_V (cinza), da cadeia β_3 (amarela) e da DisBa-01 (azul) no complexo predito $\alpha\beta 3$ –DisBa-01 é representado como superfície molecular colorida de acordo com as cadeias. Os resíduos C177–C184 (sequência

CYDMKTTC), que fazem parte do epítipo do anticorpo LM609 na subunidade $\beta 3$, estão destacados em vermelho-escuro. (b) Ampliação da região de interface entre a DisBa-01 (representada por bastões azuis), a integrina αV (cinza) e a cadeia $\beta 3$ (amarela), representadas por suas superfícies moleculares. Os principais resíduos de contato da DisBa-01 são indicados pelo código de uma letra seguido do número do resíduo. Os átomos de cálcio são representados por esferas e estão coloridos em verde. O cálcio 1 corresponde ao íon metálico coordenado no sítio MIDAS, e o cálcio 2 corresponde ao íon metálico coordenado no sítio ADMIDAS.”

Resumidamente, estudos anteriores contribuíram para o conhecimento do papel biológico deste receptor nos seguintes aspectos: i) a inibição da integrina $\alpha \beta 3$ bloqueia concomitantemente a ativação de MMP-2 na superfície celular, e com isso a migração é prejudicada (MONTENEGRO *et al.*, 2012); ii) células com bloqueio de integrina $\alpha \beta 3$ perdem a direcionalidade do movimento celular, por meio da formação de adesões mais estáveis (MONTENEGRO *et al.*, 2017). As células não desaderem completamente da matriz e nem morrem por perda de adesão; ao contrário, ativam o programa de autofagia (LINO *et al.*, 2019); iii) a integrina $\alpha \beta 3$ controla, de forma negativa, a sinalização intracelular induzida pela ativação do eixo VEGF/VEGFR2, inibindo a proliferação e migração de células endoteliais, impedindo a angiogênese (MONTENEGRO *et al.*, 2012; DANILUCCI *et al.*, 2019); iv). A inibição da integrina $\alpha \beta 3$ reduz a comunicação da célula tumoral de mama (MDA-MB-231) com a célula não maligna de epitélio mamário (MCF10 A), levando à uma visível redução de EVs presentes no meio extracelular. v) A inibição da integrina $\alpha \beta 3$ de vesículas extracelulares pequenas (sEVs, exossomos) inibe a via endossomal de síntese de exossomos (ALTEI *et al.*, 2020).

A linhagem 4T1 celular murina é altamente tumorigênica do tipo TNBC, pouco imunogênica com características de crescimento e metástase de células tumorais semelhantes às da glândula mamária humana em estágio IV. Morfologicamente, o carcinoma mamário 4T1 apresenta crescimento epitelial maligno em arranjo sólido, caracterizado pela proliferação de células pleomórficas e alto índice mitótico. Em modelos experimentais, o carcinoma mamário murino 4T1 é amplamente utilizado para o estudo de eventos celulares e moleculares durante a

progressão neoplásica (TAN *et al.*, 2025; SATO *et al.*, 2015). Ademais, entende-se que os modelos tumorais que se utilizam da inoculação de células 4T1 representam um sistema altamente agressivo de câncer de mama (KAUR *et al.*, 2012), com formação de uma considerável população celular formada ao redor dos ácinos e ductos (GATTER, 2005). No entanto, deve-se destacar que as células malignas enfrentam diversos desafios para formar um tumor com sucesso, muitos dos quais envolvem a subversão dos mecanismos de regulação tecidual e a apropriação de processos no microambiente, que passam a sustentar o desenvolvimento do tumor. (JOYCE, 2023).

Dado o exposto, o presente estudo visa demonstrar os resultados de um tratamento farmacológico com uma proteína recombinante (DisBa-01) em um modelo experimental de tumor de mama triplo negativo (clone 4T1Br4-*mCherry*) em camundongos através da inibição da integrina $\alpha\beta3$ por dois modelos de tratamento com injeção local (Experimento 1) e sistêmica (Experimento 2) e relacioná-los ao impacto na progressão do tumor, no sentido de contribuir para o desenvolvimento de novas terapias dirigidas a alvos. Destaca-se ainda a importância do modelo experimental com ocorrência de metástase espontânea, visto que, no câncer, o que engendra o óbito do paciente é o processo metastático, em sua maioria, e não o câncer, propriamente.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os possíveis efeitos da inibição farmacológica da integrina $\alpha\beta3$ com uso da desintegrina DisBa-01 na angiogênese e progressão tumoral em modelo experimental singênico de câncer de mama triplo negativo.

2.2 Objetivos Específicos

- I - Verificar, por meio do Experimento de Metástase Espontânea Não Cirúrgico, o efeito da injeção local do inibidor da integrina $\alpha\beta3$ sobre a angiogênese tumoral, o crescimento do tumor primário e a disseminação metastática;
- II - Verificar se, após a cirurgia de retirada do tumor, realizada por meio do Experimento de Metástase Espontânea com Cirurgia, a inibição da integrina $\alpha\beta3$ pela desintegrina DisBa-01 por injeção ip promove a diminuição do número de metástases em diferentes tecidos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Produção Recombinante de DisBa-01

A produção da desintreína foi feita adaptando-se a metodologia padronizada (Ramos *et al.*, 2008). Esta proteína foi utilizada como controle de inibição da integrina $\alpha\beta 3$.

Para o processo de crescimento bacteriano, uma cultura de *Escherichia coli* BL21(DE3) pDisBa-01 (pET-28a com o cDNA da desintegrina), selecionada do estoque mantido a -80°C através de uma alça flambada em bico de *Bunsen* e inoculada em falcon estéril de 50ml, contendo meio LB seletivo com adição do antibiótico da família dos aminoglicosídeos, Kanamicina ($30\text{ }\mu\text{g/mL}$). Após o período de crescimento no agitador, mantido a 250 RPU, 37°C , por 18h, o pré-inóculo do falcon é transferido para *erlenmeyers* com meio Broth e Kanamicina ($30\text{ }\mu\text{g/mL}$) e colocado novamente no agitador com regulação para 250 RPU e 37°C , por 2h. Terminado o período, uma alíquota de 1ml do conteúdo de um dos *erlenmeyers* é utilizada para aferir a absorbância do meio, esperando-se que atinja uma fase logarítmica identificada por uma $\text{D.O.}_{660\text{nm}} = 0.4 - 0.6$. Concretizado o resultado, uma alíquota de $50\mu\text{L}$ é retirada e denominada “T0”, concomitantemente, IPTG (*isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo*) é adicionado aos frascos e mantido novamente no agitador por 3h na configuração de 250 RPU e 37°C . Passado o período de agitação, uma nova alíquota de $50\mu\text{L}$ é retirada e denominada “T3”, então o conteúdo é transferido para uma centrífuga por 7 minutos, a 4°C e 5000rpm. O líquido sobrenadante é autoclavado e descartado enquanto o *pellet* formado é ressuspensão e lisado por sondas ultrassônicas. Após o período de lise celular, o conteúdo é encaminhado para um novo processo de centrifugação por 15 minutos a 4°C e 13000 rpm. Em seguida, retira-se a alíquota “S1” de $50\mu\text{L}$, descarta-se o sobrenadante e ressuspensão-se o novo *pellet* (mantido no falcon em gelo) e mantém-se a ressuspensão em incubação por 1h a 4°C . Ao final do período, centrifugou-se uma última vez o conteúdo por 15 minutos a 4°C e 13000 rpm. Então, filtra-se o sobrenadante e retira-se a alíquota “S2” de $50\mu\text{L}$, descartando-se o *pellet* formado. O conteúdo filtrado foi mantido no freezer a -20°C . Após o período de crescimento bacteriano, expressão da DisBa-01 e lise celular, as alíquotas “T0”, “T3”, “S1”, “S2” são testadas em SDS-PAGE 15% (*Sodium Dodecyl Sulfate*

Poliacrylamide Gel Electrophoresis) para análise da presença de DisBa-01 por meio de uma banda correspondente à altura de, aproximadamente, 12kDa.

Após o período de expressão da proteína, o conteúdo foi submetido a uma purificação sob condições desnaturantes por meio de cromatografia de afinidade em resina de Níquel, *HIS-SeleC™ Nickel Affinity Gel (Sigma Aldrich)*. Ao passar pela purificação na coluna de Níquel, tubos de ensaio são coletados e armazenados, sendo retirada sempre uma alíquota de 10µL de cada um a fim de que se corra um novo gel em SDS-PAGE 15% para identificação de qual fração extraída da purificação possui a presença da DisBa-01. As frações com maior presença da proteína de interesse foram usadas para continuidade no processo de purificação, enquanto as outras foram descartadas. As amostras selecionadas foram encaminhadas para diálise em tampão específico para cada processo, sendo que o 1º e o 2º lote foram dialisados em Tampão para SUPERDEX 75 (1 hora de diálise em 1L Ureia 3M, 1 hora em 1L de Tris 20 mM e 2 horas em 1L de Tris 20 mM), enquanto o 3º lote foi dialisado em Tampão para cromatografia em MONO Q (1 hora de diálise em 1L de Ureia 3M e 3 horas em 2L de Tris 20 mM). Passadas 4 horas de diálise, o conteúdo foi armazenado em um falcon estéril de 50 mL e levado para concentrar o conteúdo para 1 mL.

Ao final da concentração, o volume concentrado é submetido ao processo de cromatografia no AKTA PURE©. Analisando-se o perfil cromatográfico, obtêm-se quais intervalos de amostras apresentaram alguma presença de proteína. Após análise do perfil cromatográfico, as amostras selecionadas são submetidas à corrida de novos géis de SDS-PAGE que demonstraram a presença da proteína e seu grau de pureza. Posteriormente, as amostras de interesse foram reunidas e submetidas à diálise em água ultrapura por 4 horas. Após esse processo, realizou-se novamente a concentração do volume resultante da purificação para 1 mL em centrífuga *Speed Vac*©. Em seguida, o conteúdo proteico foi quantificado utilizando o kit de detecção colorimétrica pelo método do ácido bicinconínico (BCA) (*BCA™ Protein Assay Kit, Pierce*).

Por fim, o teste da atividade da proteína recombinante foi realizado mediante ensaio de migração *Transwell*, com utilização das células HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells* ou Células Endoteliais de Veia Umbilical Humana). as células HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells* ou Células Endoteliais de Veia Umbilical Humana) foram tripsinizadas e ressuspensas em DMEM sem FBS,

incubadas ou não com *DisBa-01* na concentração de 1000 nM e plaqueadas (1×10^5 células) sobre insertos para cultura celular com poros de $8 \mu\text{m}$ em placas de 24 poços (Falcon ® *Becton Dickison*); enquanto meio contendo 10% de FBS foi adicionado ao compartimento inferior do inserto, tendo função de quimioatraente. Após 6 horas de incubação em estufa a 37°C , o meio de cultura foi aspirado, e as células nos insertos foram fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos. As células da face superior foram retiradas com hastes flexíveis com algodão e as células que migraram (face inferior do inserto) foram coradas com DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol) por 10 minutos. As membranas foram retiradas dos insertos para a montagem de lâminas. Para a retirada do excesso de corante foram mergulhados em PBS e foram secos com cotonete. Quando a membrana secou, foi recortada com um estilete e com o auxílio de uma pinça retirada do inserto, foi coberta por óleo de imersão em uma lâmina e recoberta com uma lamínula. As células foram contadas a partir do editor de imagens *ImageJ – Image Processing and Analysis in Java*. Confirmada a atividade da desintegrina pelo teste, realizou-se *Western Blotting* para confirmação da banda da desintegrina, com a utilização do revelador NBT-BCPI, gentilmente doado pela Profª Drª Dulce Helena Ferreira de Souza, do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos-UFSCar.

3.2 Cultivo Celular:

A linhagem celular escolhida para cultivo foi a 4T1Br4-*mCherry*, uma linhagem de células epiteliais derivadas da glândula mamária de camundongos, sendo um clone da linhagem celular 4T1. As células foram mantidas em meio α -MEM (*Alpha Minimum Essential Medium*) utilizando o meio comercial Embriolife da Vitrocell (Brasil), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina e estreptomicina. O meio também continha bicarbonato de sódio, L-glutamina e cloreto de sódio, conforme a formulação do fabricante. As células foram mantidas em estufa a 37°C , em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 . Para os procedimentos de subcultivo e preparo para inoculação, as células foram destacadas com solução de tripsina-EDTA a 0,1%, seguida de neutralização com meio suplementado e centrifugação a 1200 rpm por 5 minutos. A contagem celular foi realizada em um contador automático TC20™ *Automated Cell Counter*, da Bio-Rad, e a viabilidade foi determinada pelo método de exclusão com *trypan blue*.

Apenas suspensões celulares com viabilidade adequada foram utilizadas nos experimentos *in vivo*.

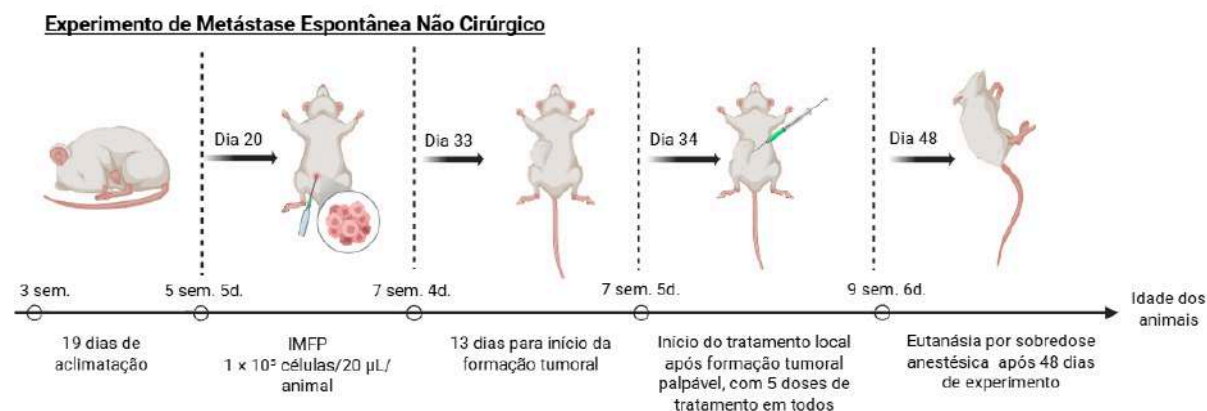
3.3 Modelo Murino Experimental:

O estudo *in vivo*, aprovado pela CEUA nº 9550180823, foi realizado com camundongos fêmeas isogênicos da linhagem Balb/c, distribuídos em três grupos experimentais, com $n = 10$ em cada grupo: Controle, DisBa-01 e Peptídeo *Scramble* não RGD. Após os animais passarem pelo período de aclimação em local adequado, com iluminação de ciclo claro (20h às 8h) e escuro (8h às 20h), os animais chegaram a uma média de peso entre 22~25g e as células 4T1Br4-*mCherry* foram inoculadas (1×10^5 células/20 μ L/animal) na quarta mama direita dos animais, utilizando a técnica de IMFP (*intramammary fat pad*) (MARTIN, 2015), técnica gentilmente ensinada com auxílio da Profª Drª Ana Carolina Baptista Moreno Martin, do Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular, do Hospital de Câncer de Barretos, com sedação temporária realizada com Isoflurano (1 mL/mL, inalável, anestésico, Cristália, Brasil). A partir da inoculação, com a formação de massa tumoral palpável, iniciou-se a divisão dos experimentos: Experimento de Metástase Espontânea Não Cirúrgico (Exp. 1) e Experimento de Metástase Espontânea com Cirurgia (Exp. 2), descritos nos itens abaixo.

3.3.1 Delineamento Experimental - Experimento 1

Por volta de 3 semanas após a inoculação das células, os animais apresentavam, em sua maioria, massa tumoral palpável, e, dessa forma, iniciou-se o protocolo terapêutico correspondente aos grupos experimentais. O grupo Controle recebeu injeções locais de solução salina 0,9% (SF 0,9%); os grupos DisBa-01 e Peptídeo *Scramble* não RGD (BbKi, gentilmente cedido pela Profª Drª Maria Luiza Vilela Oliva, do Departamento de Bioquímica da UNIFESP e transportado por sua Mestranda, Mariana Daiani Costa Silva) receberam as proteínas que os nomeiam na dose de 2 mg/kg. Todos os grupos receberam 5 doses de tratamento (Fig. 3).

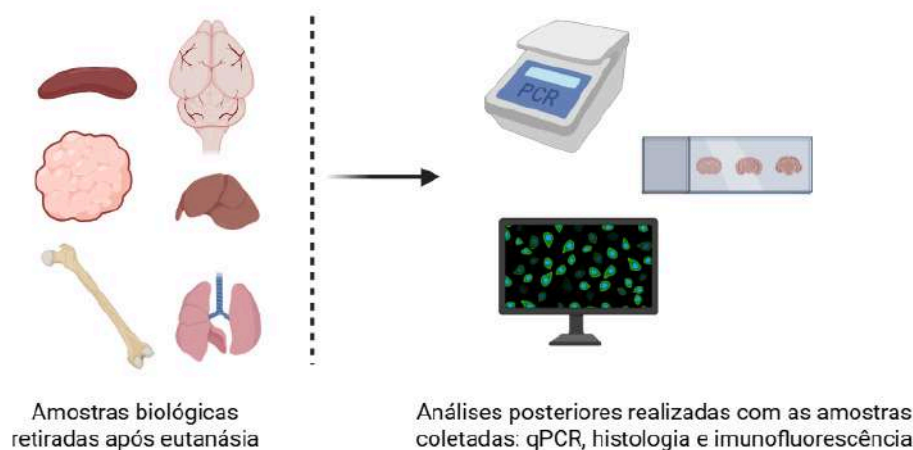
Fig. 3: Esquema representativo do modelo experimental não cirúrgico. Com representação da aclimação, inoculação celular, desenvolvimento de massa tumoral palpável, tratamento local e eutanásia, detalhando os dias de vida dos animais (em semanas).



Ao término do período experimental, os animais foram submetidos à eutanásia, por meio do método de sobredose anestésica intraperitoneal (cetamina 100 mg/kg, Dopalen®, Ceva, Brasil; associada à xilazina 10 mg/kg, Xilazin®, Syntec, Brasil) (FLECKNELL, 1996; CARPENTER, 2010; NRC, 2011), para a coleta das amostras biológicas, conforme previsto no projeto (Fig. 4).

Fig. 4: Representação das amostras biológicas coletadas na eutanásia, sendo elas: baço, cérebro, tumor, fígado, fêmur e pulmões, seguida de posterior análises, sendo elas: qPCR *real time*, análises histológicas e imunofluorescência.

Análises



Assim que coletados, os materiais foram armazenados de acordo com o tipo de análise a ser realizada, descrito na Tabela 1.

Tabela 1: Representação da alocação dos órgãos após a eutanásia. O fêmur não foi alocado para os criotubos tendo em vista que não foi realizado qPCR no mesmo, sendo descalcificado para posterior tamponamento em formalina, como os demais órgãos.

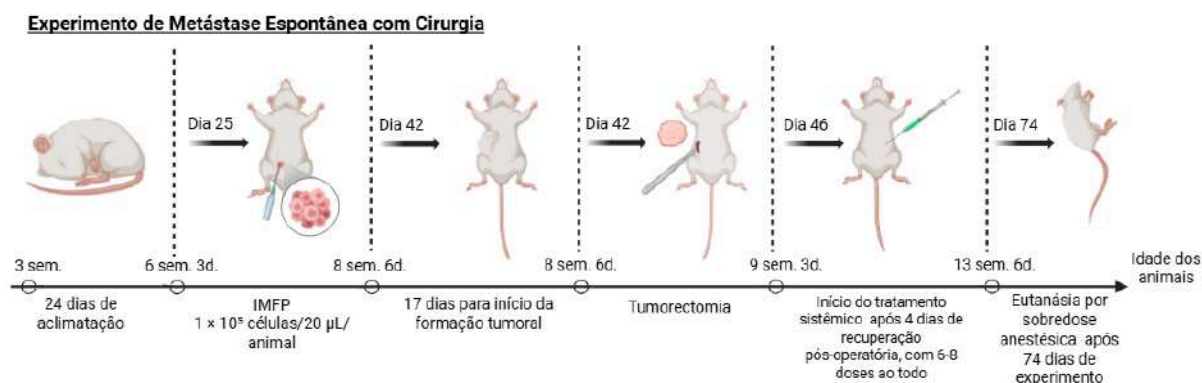
Formalina 10% (Temp. amb.)	½ Tumor	1 hemisfério cerebral	Fêmur inteiro*	½ Fígado	1 lado do Pulmão	½ Baço
Criotubo (-80°C)	½ Tumor	1 hemisfério cerebral	X	½ Fígado	1 lado do Pulmão	½ Baço

3.3.2 Delineamento Experimental - Experimento 2

Por volta de 4 semanas após a inoculação das células, já com massa tumoral palpável, os animais foram submetidos à tumorectomia sob anestesia geral, conforme protocolo previamente padronizado pela veterinária responsável pela cirurgia, Heloisa Maximo Ribeiro (CRMV-SP 56837), e descrito em guia específico para excisão de tumor mamário em camundongos fêmeas (TAI *et al.*, 2014; MARTIN, 2015), descrito no item 3.3.3.

Os animais que sobreviveram aos procedimentos foram submetidos ao protocolo terapêutico correspondente aos seus grupos experimentais. O grupo Controle recebeu injeções intraperitoneais de solução salina 0,9% (SF 0,9%); os grupos DisBa-01 e Peptídeo *Scramble* não RGD receberam as proteínas que os nomeiam na dose de 2 mg/kg. Todos os grupos receberam entre 6 e 8 doses de tratamento, dependendo da sobrevida do animal. Ao término do período experimental, os animais foram submetidos à eutanásia, por meio do método de sobredose anestésica intraperitoneal (cetamina 300 mg/kg, Dopalen®, Ceva, Brasil; associada à xilazina 30 mg/kg, Xilazin®, Syntec, Brasil) (FLECKNELL, 1996; CARPENTER, 2010; NRC, 2011) (Fig. 5), para a coleta das amostras biológicas, conforme previsto no projeto (Fig. 4), as quais foram armazenadas como descrito na Tabela 1.

Fig. 5: Esquema representativo do modelo experimental Cirúrgico. Com representação da aclimação, inoculação celular, desenvolvimento de massa tumoral palpável, realização da tumorectomia, tratamento sistêmico e eutanásia.



3.3.3 Tumorectomia

A realização da tumorectomia constituiu-se nos seguintes passos: **1) Sedação/Anestesia:** o protocolo anestésico consistiu na administração de cloridrato de cetamina (100 mg/kg, intraperitoneal, anestésico; Dopalen®, Ceva, Brasil), associada à xilazina (10 mg/kg, intraperitoneal, relaxante muscular; Xilazin®, Syntec, Brasil) (FLECKNELL, 1996; CARPENTER, 2010; NRC, 2011); **2) Tricotomia e antissepsia da região:** para tricotomia, utilizou-se lâminas de bisturi, garantindo a retirada de todo pelo da região tumoral, bem como das áreas adjacentes à mama, seguido de antissepsia com Clorexidina 2% Degermante (Chlorclear Antisséptico; Vic Pharma), com auxílio de haste flexível com algodão; **3) Retirada do tumor:** após a confirmação e garantia da anestesia dos animais através do teste dos reflexos, iniciou-se a incisão medial em relação ao tumor e lateral a ele, divulsionando o tecido aderido ao tumor, removendo o tumor com uso de tesoura cirúrgica; **4) Sutura de pele:** após a remoção tumoral, utilizou-se fio agulhado de nylon 4-0 (TECHNOFIO - Suture company), com realização de sutura simples interrompida, utilizando-se entre três e cinco pontos, conforme a extensão da incisão e a necessidade de adequada aproximação das bordas da ferida. O número de pontos foi definido de modo a promover a coaptação dos tecidos, reduzir a tensão sobre a incisão e favorecer o processo de cicatrização; **5) Pós-operatório:** passados 30 minutos desde a realização da sutura, foi administrada dipirona (80 mg/kg, via subcutânea, analgésico Ibas, Brasil) e os animais permaneceram sob monitoramento para avaliação da recuperação anestésica e da cicatrização da ferida cirúrgica (CARPENTER, 2010; HARKNESS, 1993). No dia seguinte à

tumorectomia, os animais receberam duas novas doses de dipirona (80 mg/kg), com intervalo de 8 horas entre elas. Passados dois dias desde o procedimento, os animais receberam uma última dose de dipirona (120 mg/kg), em concentração maior a fim de garantir maior analgesia na última dose. Ademais, utilizou-se uma diluição (1 mg/mL) de Tylenol (Tylenol® paracetamol 32 mg/mL, formulação líquida) na água dos animais por 4 a 5 dias como complemento ao protocolo analgésico.

Os tumores primários removidos durante a cirurgia foram pesados e divididos em duas porções: uma destinada à análise histológica e outra congelada em criotubos a -80 °C para análises de qPCR.

3.4 Análise Histológica

Após a eutanásia, os órgãos coletados (cérebro, fígado, baço, pulmão e tumor) foram inicialmente mantidos em solução de formalina tamponada a 10% por 24 horas (pH = 6,8) para fixação tecidual e, posteriormente, armazenados em álcool 70% até o processamento histológico. Já o fêmur foi mantido em solução descalcificante de EDTA em tampão fosfato 0,1 M por aproximadamente 4 semanas, com trocas semanais da solução. Ao final desse período, o tecido também foi transferido para álcool a 70% até o processamento histológico. (CAPUTO *et al.*, 2010).

3.5 Montagem das Lâminas

Para as análises histológicas, sob supervisão e orientação da Prof^a Dr^a Cynthia Aparecida de Castro, do Dr. Paulo Henrique Marques de Andrade e da Dr^a Marcela Sene-Fiorese, ambos do Departamento de Morfologia e Patologia da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, utilizou-se um processador de tecidos automatizado, no qual os tumores, fracionados e acondicionados em cassetes histológicos, foram submetidos a diversas baterias de desidratação em soluções alcoólicas crescentes (70%, 80%, 90%, 95% e 100%), seguidas do clareamento das amostras com xilol e da inclusão do tecido em parafina líquida. Após a etapa, os tecidos foram incluídos em parafina histológica fundida (62–65 °C), posicionados adequadamente em moldes metálicos e identificados individualmente. Os blocos foram mantidos à temperatura ambiente até o início da solidificação e, posteriormente, resfriados em sistema refrigerado para completa polimerização da parafina. No dia seguinte, os blocos foram resfriados e, então, preparados para a

microtomia, sendo cortados com espessura de 5 micrômetros. Posteriormente, a parafina contendo o corte do tecido foi levada para banho-maria a 40 °C para remoção das rugosidades por aproximadamente 30 minutos. Decorrido o tempo, o corte foi transferido para lâminas de vidro previamente identificadas com nomenclatura referente ao animal. Para cada tecido de cada animal, foram preparadas lâminas em triplicata, totalizando 300 lâminas ao longo de todos os experimentos (cirúrgico e não cirúrgico).

3.6 Coloração das Lâminas

As lâminas foram coradas por dois métodos: HE (coloração com Eosina-Hematoxilina) e TM (coloração com Tricrômico de Masson). Na coloração com HE, com a utilização dos corantes da Sigma-Aldrich® (Eosina Y - amarela - para microscopia Certistain® e Solução Papanicolau 1ª, solução de hematoxilina segundo Harris para citologia), as lâminas foram colocadas inclinadas e transferidas para estufa, mantidas a 60 °C por, aproximadamente, 30 minutos para que a parafina pudesse derreter e o corte ficar mais permeável à absorção da coloração. Transcorrido o tempo na estufa, iniciou-se o processo de desparafinização e reidratação do tumor. Para a desparafinização, as lâminas foram mergulhadas em um recipiente com Xilol I por 5 minutos e, em seguida, foram transferidas para um novo recipiente com Xilol II (da mesma concentração e composição que o Xilol I, porém representando outro “banho” de Xilol) por mais 5 minutos. No processo de reidratação, as lâminas foram colocadas em recipientes com distintas concentrações de álcool: 100%, 95%, 70% e 50%, com 2 minutos de submersão em cada recipiente, seguidas de 2 minutos em recipiente com água corrente. Para coloração, as lâminas foram submetidas aos seguintes recipientes com as respectivas soluções: 1) solução de hematoxilina - 1 minuto; 2) água corrente - lavagem rápida; 3) álcool 95% - 2 minutos; 4) solução de eosina - 1 minuto; 5) álcool 100% - 4 banhos rápidos em recipientes separados; 6) Xilol I e II - 5 minutos em cada recipiente. Após o processo 6, as lâminas foram levemente batidas contra um papel absorvente de xilol e encaminhadas para o suporte de montagem, no qual foram adicionadas de 1 a 3 gotas de Entellan® para fixação da lamínula, seguidas de secagem overnight para análise posterior.

Para a coloração com TM, utilizou-se o kit Histokit™ Tricrômico de Masson, da *EasyPath*. A etapa inicial de desparafinização com xilol, seguida de reidratação

com os álcoois, foi feita como a realizada na coloração com HE. Passadas tais etapas, as lâminas foram levadas para coloração, sendo submetidas aos seguintes processos: 1) coloração com *Bouin* - 1 hora com as lâminas colocadas na estufa a 60°C, 2) lavagem rápida em água corrente para desaparecer o amarelo da coloração anterior, 3) passagem rápida em água destilada, 4) coloração com solução de Hematoxilina Férrica de *Weigert* (A e B) - 10 minutos, 5) lavagem em água corrente - 10 minutos, 6) passagem rápida em água destilada, 7) coloração com solução Escarlata de *Biebrich* - 5 minutos, 8) passagem rápida por água destilada, 9) coloração com Ácido Fosfotúngstico-Fosfomolibdico - 15 minutos, 10) passagem rápida por água destilada, 11) coloração com Azul de Anilina - 10 minutos, 12) lavagem rápida em água destilada, 13) lavagem em água ácida - 5 minutos, 14) passagem rápida em água destilada, 15) álcool 100% I - 5 minutos, 16) álcool 100% II - 5 minutos, 17) álcool 100% III - 5 minutos, 18) Xilol I - 10 minutos e, por fim 19) Xilol II - 10 minutos. Após o processo 19, as lâminas foram levadas para montagem com lamínula no mesmo modelo das lâminas coradas com HE.

3.7 Leitura das Lâminas

Para leitura das lâminas de ambas as colorações (HE e TM), utilizou-se o scanner de lâminas Grundium Ocus®40 do laboratório de Biofotônica do Instituto de Física de São Carlos/USP, utilizando o sistema *Grundium.net* para obtenção das imagens obtidas, as quais foram armazenadas utilizando armazenamento interno do computador do próprio estudante. Para a análise das imagens, foi utilizado o programa *QuPath-0.5.1*, que é compatível com o formato das imagens salvas pelo scanner de lâminas e oferece recursos de ampliação para a análise das regiões de cada tumor fotografado. Após a digitalização das lâminas, as imagens foram analisadas com o auxílio da Profa. Dra. Lucimar Retto da Silva de Avó, Histopatologista do Departamento de Medicina da UFSCar, para a avaliação dos tecidos e a seleção das imagens que representassem alterações. As imagens indicadas com presença de metástase foram selecionadas para a elaboração das pranchas histológicas.

3.8 Detecção do Gene *mCherry* por qPCR

Para a realização da qPCR (Reação da Cadeia da Polimerase Reversa em tempo real) dos tecidos coletados na eutanásia, realizaram-se, em suma, duas

etapas: 1) Extração e quantificação de DNA genômico e 2) Realização da qPCR no *QuantStudio™ 5*.

1) Extração e quantificação de DNA genômico: os tecidos foram retirados do *freezer* a -80 °C e armazenados em caixa de isopor com gelo. Posteriormente, cada tecido foi cortado em pequenos fragmentos em placas de Petri, com auxílio de lâminas de bisturi, e higienizado com álcool 70% entre as amostras. Os pedaços de cada tecido foram colocados em tubos para *fast prep* livres de RNase, com a presença de 4 pequenas beads metálicas, com tampão de homogeneização (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl e 100 mM EDTA, com pH ajustado para 7,5 e volume final completado para 500 mL com água ultrapura). Os tubos foram encaminhados ao homogeneizador de amostras *FastPrep-24™* da MPbio para a realização de 6 ciclos de 30 segundos, com intervalos de 1 minuto entre eles, mantendo as amostras em gelo nesses intervalos. Após a homogeneização, 250 µL do homogeneizado completar transferidos para um novo tubo com 750 µL de tampão de lise (Solução composta por tampão de homogeneização suplementado com 1% (m/v) de SDS, 100 µg/mL de Proteinase K e 100 µg/mL de RNase, com pH ajustado para 7,5), deixando as amostras digerindo em banho seco a 55 °C *overnight*. No dia seguinte, 500 µL do digerido foram transferidos para um novo tubo com 350 µL de solução super-salt (NaCl 5 M), sendo agitado no Agitador Vórtex KASVI basic por 20 segundos e incubado em gelo por 30 minutos. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 4 °C e a 14.000 rpm na *Centrifuge 5430 R* da Eppendorf. Após a centrifugação, os 800 µL do conteúdo sobrenadante foram transferidos para um novo tubo com 800 µL de etanol a 100% para precipitação do DNA, sendo submetidos à agitação por inversão e à centrifugação por 5 min, a 4 °C, a 13.000 rpm. Em seguida, coletou-se o sobrenadante para outro tubo contendo 500 µL de etanol a 70% em água ultrapura e centrifugou-se por 5 min, a 4 °C, a 13.000 rpm. Passada a centrifugação, o etanol foi retirado cautelosamente com auxílio de pipeta com filtro e adicionaram-se mais 500 µL de etanol a 70%, submetendo as amostras a uma nova centrifugação por 5 min, a 4 °C, a 13.000 rpm. Ao final da centrifugação, o etanol foi novamente retirado e os tubos foram deixados secar em estufa a 37 °C por aproximadamente 10 minutos. Por fim, ressuspendeu-se o DNAg (DNA genômico) em 100 µL de tampão TE 0,25X e realizaram-se as leituras das amostras no espectrofotômetro de microvolumes

NanoDrop 200 - *Thermo Fisher (Thermo)*. Os dados foram anotados e utilizados para determinar a concentração final de 20 ng/ μ L para a realização da qPCR.

2) Realização da qPCR no *QuantStudio™5*: Para obtenção das análises de qPCR a partir do DNAg obtido pela extração, utilizou-se o equipamento *QuantStudio™5 System* do Laboratório de Biologia do Envelhecimento (LABEN) da UFSCar. Utilizou-se o protocolo elaborado durante os testes deste experimento. Inicialmente, preparou-se as alíquotas da *working solution* com a junção de “*TaqMan™ Fast Universal qPCR Master Mix (2X) (Applied Biosystem #4352042)*, no *AmpErase™*” (Taq DNA Polimerase, dNTPs, *Buffer* otimizado, $MgCl_2$, estabilizadores e aditivos, agentes passivadores e substâncias de referência passiva) com as *probes* e *primers* da vimentina - controle endógeno da reação (*Forward primer*: 5'-AGCTGCTAACTACCAGGACACTATTG-3' | *Reverse primer*: 5'-CGAAGGTGACGGACCATCTC-3' | *Probe*: VIC-CCTTCATGTTTTGGATCTCATCCTGCAGG-TAMRA) e da mCherry - gene de interesse na reação (*Forward primer*: 5'-GACCACCTACAAGGCCAAGAAG-3' | *Reverse primer*: 5'-AGGTGATGTCCAACCTTGATGTTGA-3' | *Probe*: GFAM-CAGCTGCCGGGCCCTACA-TAMRA), conforme a tabela 2. Após a realização das contas e do mapa da placa, realizou-se a pipetagem de 8 μ L de *working solution* + 2 μ L de cada amostra de DNAg, por poço, em triplicata. Após a montagem da placa, a mesma foi colocada no “*Applied Biosystems™ QuantStudio™ 5 Real-Time qPCR System, 96-well*” (Eva-2725211288 - *QuantStudio™ 5 - 96-Well 0.2-mL Block, 96-Well 0.2-mL*), sendo configurado para realização da qPCR com as especificações: 1) *Experiment type: Comparative Ct ($\Delta\Delta Ct$)* | 2) *Chemistry: TaqMan™ reagents* | 3) *Run mode: FAST* | 4) *Hold stage: 10 μ L* | 5) Número de ciclos: 40 ciclos. Após a configuração das especificações, as amostras foram configuradas na placa do programa e a corrida em tempo real foi iniciada. Ao final do processo, os dados de ΔCt foram coletados para cálculo de $\Delta\Delta Ct$ em planilha do Excel pré-configurada para a realização das contas.

Tabela 2: molde para as contas de aliquotação da *working solution*.

	p/ 1 poço
2X Universal TaqMan™ Fast Mix	5 μ L
1 mM Vimentin F+R	0,5 μ L

1 mM Vimentin Probe (VIC) (quencher=TAMRA)	0,5 µL
1 mM mCherry F+R 100µM	0,5 µL
1 mM mCherry Probe (FAM) (quencher=NFQ)	0,5 µL
H2O	1 µL
template (40ng)	2
Total (µL)	10 p/ poço

3.9 Relative Tumor Burden (RTB)

A Carga Relativa de Tumor (RTB - *Relative Tumor Burden*) de cada animal foi calculada a partir do *Ct mean* obtido por qPCR em tempo real multiplex com Taqman®, conforme descrito no tópico 3.8. Assim, por meio da comparação dos valores de *Ct* da vimentina e da *mCherry* em cada amostra, o ΔCt foi calculado como a diferença entre os valores de ΔCt : (*Ct* para *mCherry* – *Ct* para vimentina). Em seguida, o valor de RTB foi utilizado na seguinte fórmula, conforme demonstrado por Sloan *et al.* (2006): $RTB = 10.000/2^{\Delta Ct}$. Usando-se essa fórmula, para análise considerou-se os tecidos com valores zero como sem tumor, enquanto que os tecidos com valor de 10.000 sendo compostos totalmente por tumor. Após a realização dos ensaios e dos cálculos para análise do RTB dos pulmões, os resultados foram utilizados para a construção de um gráfico em dot plot no programa *GraphPad Prism* 8.0.1, a fim de avaliar se havia diferenças estatísticas entre as amostras e observar a distinção na expressão gênica da *mCherry* nos tecidos dos diferentes grupos representados no experimento 2 (tratamento sistêmico).

3.10 Detecção da Integrina $\alpha\beta3$ por Imunofluorescência

Para a realização das análises por imunofluorescência, inicialmente as lâminas silanizadas com cortes de tumor foram colocadas em estufa a 60°C por 30 minutos e depois passaram pelo processo de desparafinação, sendo incubadas em soluções de 1) Xilol I - 5 minutos, 2) Xilol II - 5 minutos, 3) Xilol III - 5 minutos, 4) álcool 100% - 5 minutos, 5) álcool 95% - 5 minutos, 6) álcool 70% - 5 minutos, 7) água destilada - 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram submergidas em tampão

citrato (2,94 g de citrato trissódico di-hidratado, 0,5 mL de *Tween* 20 e 1000 mL de água destilada - pH 6,0) e a solução com as lâminas foi colocada sob um suporte no banho-maria a 98 °C por 30 minutos, seguida de 20 minutos de resfriamento à temperatura ambiente. Após o resfriamento das lâminas foram realizadas 3 lavagens em TBS-T (Tampão TBS (20 mM) contendo 0,1% (v/v) de *Tween* 20, com pH ajustado para 7,4), com 5 minutos cada, e 10 minutos em água destilada. Passadas as lavagens, as lâminas foram submetidas ao bloqueio proteico (BSA 1%) em câmara úmida, ao abrigo da luz, à temperatura ambiente, por 60 minutos, seguido de 3 lavagens em TBS-T, de 5 minutos cada. Em seguida, os cortes histológicos foram incubados com o anticorpo primário *Anti-Integrin* $\alpha\beta 3$ (Santa Cruz - diluição 1:100) *overnight*, em geladeira, ao abrigo da luz, em câmara úmida. No dia seguinte, realizaram-se 3 novas lavagens com TBS-T (5 minutos cada), seguidas de incubação com o anticorpo secundário *Goat anti-mouse* IgG - FITC (Abcam - diluição 1:500) por 60 minutos, à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, em câmara úmida. Após isso, foram realizadas 3 lavagens com TBST-T (5 minutos cada) e as lâminas foram seladas com 1 a 3 gotas de meio de montagem com DAPI, sendo armazenadas a 4 °C, ao abrigo da luz, para análise em microscópio de fluorescência.

Para a leitura das lâminas de imunofluorescência, utilizou-se o microscópio de fluorescência EVOS FL Auto da *Thermo Fisher*, do Laboratório de Biologia do Envelhecimento (LABEN). As lâminas foram submetidas aos canais GFP (coloração verde para análise da fluorescência), DAPI (coloração azul para marcação dos núcleos) e Campo Claro (para avaliação da morfologia celular). Todas as imagens obtidas mantiveram o aumento de 4x, proporcionando visibilidade de uma área maior de cada tumor analisado. Após a obtenção das imagens, utilizou-se o programa *ImageJ* para análise e quantificação da fluorescência das imagens, calculando a porcentagem da área tumoral preenchida pela fluorescência, construindo um gráfico de barras com os valores obtidos através do programa *GraphPad Prism* 8.0.1.

3.11 Análises Estatísticas

Para análise estatística dos dados, foi utilizado o programa *GraphPad Prism* 8.0.1. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de *Shapiro-Wilk* para verificar a normalidade de sua distribuição. As amostras com distribuição não

normal (dados não paramétricos) foram submetidas à análise pelo teste de *Kruskal-Wallis*, com *post-hoc* de *Dunn* para comparações múltiplas. As amostras com distribuição normal (dados paramétricos) foram submetidas à análise de variância (ANOVA), utilizando o teste *one-way* ANOVA, com *post-hoc* de *Tukey* para comparações múltiplas. O nível de significância estatística adotado foi de $P < 0,05$. Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

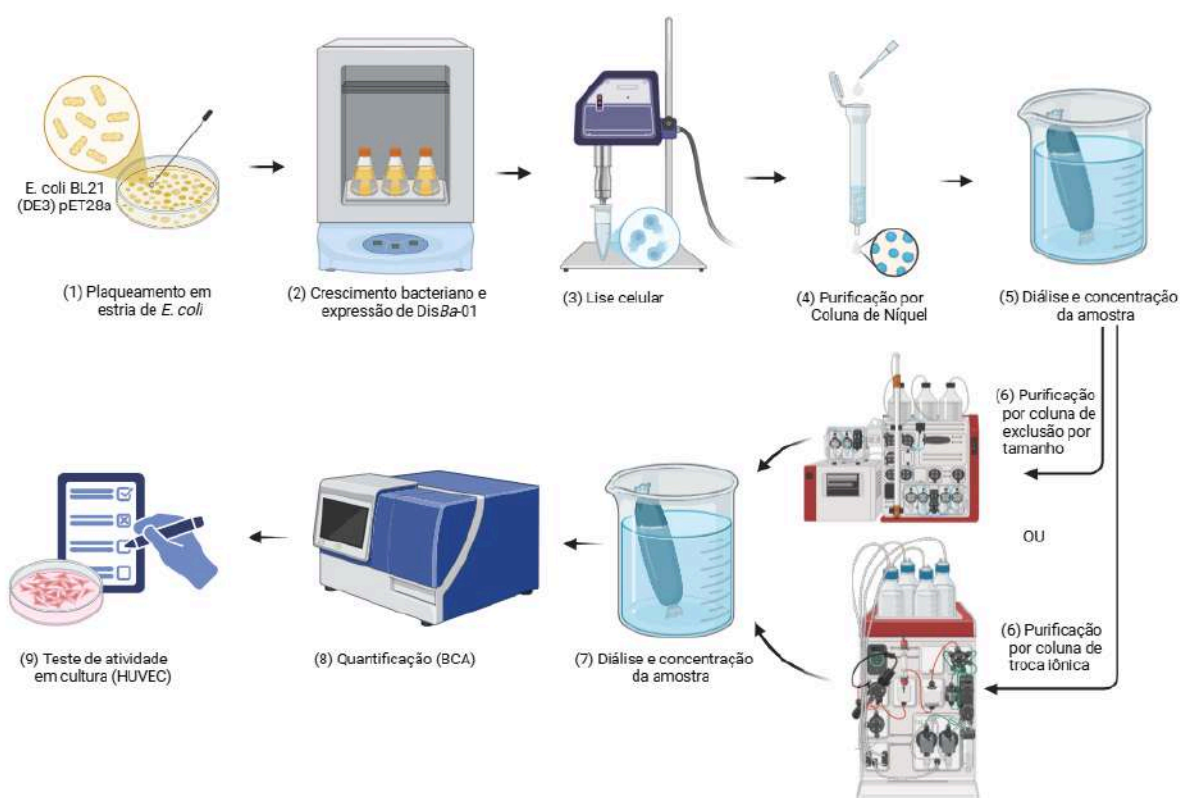
4. RESULTADOS

Após a realização dos experimentos, dividiu-se os resultados em três tópicos principais descritos e discutidos abaixo.

4.1 Produção da DisBa-01

Para a realização do presente estudo, realizou-se 3 produções de DisBa-01, desde a expressão e purificação até o teste de atividade da mesma, resultando em dois lotes de proteína - visto que o 1º e o 2º lote foram unidos para otimização da purificação dos mesmos, resultando em dois lotes: “Lote 1+2” e “Lote 3”. Os lotes foram testados e aprovados quanto à atividade de inibição da migração. O esquema representativo do processo está descrito na Fig. 6.

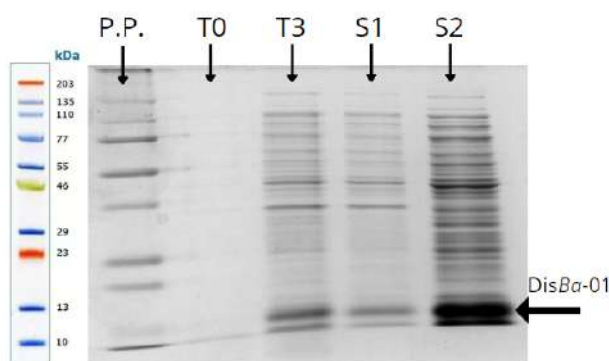
Fig. 6: Esquema do processo de produção da desintegrina DisBa-01. Acrescenta-se que o “Lote 1+2” foi realizado utilizando o método (6) “Purificação por coluna de exclusão por tamanho”; enquanto o “Lote 3” foi realizado utilizando o método (6) “Purificação por coluna de troca iônica”.



4.1.1 Crescimento bacteriano, Expressão da DisBa-01 e Lise Celular

Após o procedimento de crescimento bacteriano, seguido da expressão de DisBa-01, as *E. coli* foram submetidas à lise celular e o conteúdo lisado foi aliqotado para realização de um gel. A Fig. 7 mostra um gel que representa o resultado, contendo a banda relativa à desintegrina em questão.

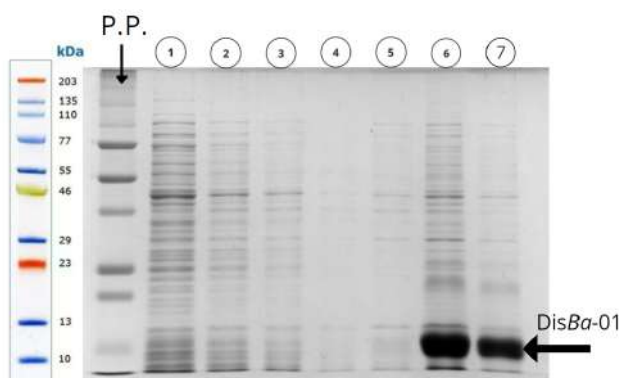
Fig. 7: Análise da expressão proteica de DisBa-01 por *E. coli* BL21(DE) após indução por IPTG em gel de SDS-PAGE. Ao lado esquerdo, tem-se uma imagem de identificação das massas moleculares em kDa; no poço 1, P.P. (Padrão de Proteína), e as amostras “T0”, “T3”, “S1”, “S2”. A seta indica a proteína de interesse “DisBa-01”, de tamanho aproximado de 12,8 kDa.



4.1.2 Purificação, Diálise e Concentração da Proteína

Após o período de produção da proteína, o conteúdo foi submetido a uma purificação sob condições desnaturantes por meio de cromatografia de afinidade em resina de Níquel. Ao passar o extrato celular pela na coluna de Níquel, as frações eluídas foram coletadas em tubos de ensaio e armazenadas, sendo retirada sempre uma alíquota a fim de que se corra um novo gel. A Figura 8 apresenta a imagem do gel das alíquotas da purificação com Níquel:

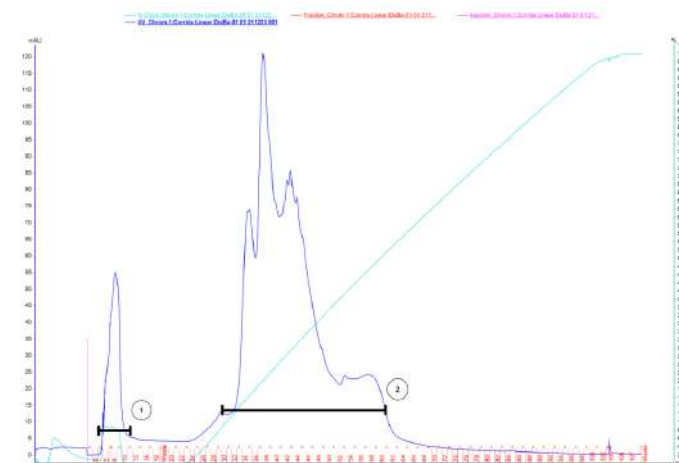
Fig. 8: Análise por SDS-PAGE das frações extraídas da purificação da coluna de níquel. Amostras eluídas com o tampão *Binding Buffer* 1X com Ureia (1-3), *Washing Buffer* 1X Ureia (6-7) e *Elute Buffer* 1X com Ureia (6-7);



4.1.3 Cromatografia nas Colunas MONO Q e SUPERDEX 75

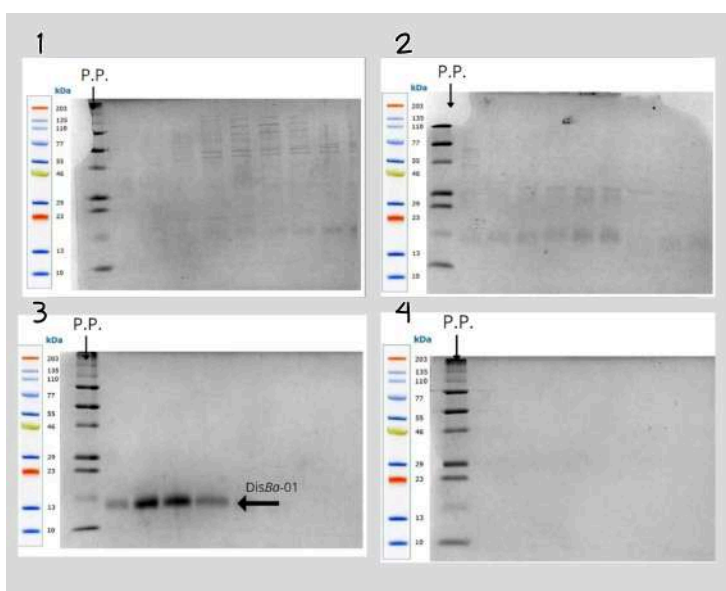
Ao final da concentração, o volume concentrado é submetido ao processo de cromatografia no AKTA PURE©. Analisando-se o perfil cromatográfico, obtêm-se quais intervalos de amostras apresentaram alguma presença de proteína, como observa-se abaixo.

Fig. 9: Perfil cromatográfico da amostra impura de DisBa-01 (1º e 2º Lotes) em coluna SUPERDEX 75. Os picos de presença de proteína nos intervalos “6-10” (linha 1) e “30-62” (linha 2) foram coletados para análise por SDS-PAGE.



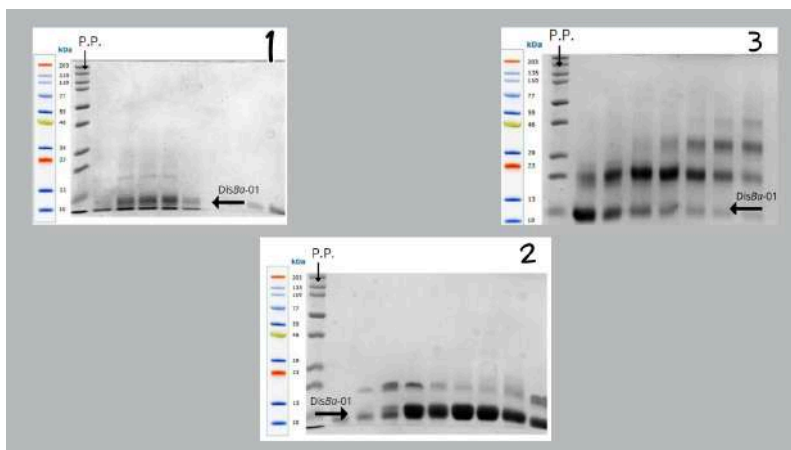
Após análise do perfil cromatográfico, as amostras selecionadas foram submetidas à corrida de novos géis de SDS-PAGE que demonstraram a presença da proteína e seu grau de pureza, como se observa na Fig. 10.

Fig. 10: Análise da expressão proteica de DisBa-01 (Lote 1+2) com as amostras extraídas do AKTA PURE© resultantes da purificação em coluna de SUPERDEX 75. A seta com nome “DisBa-01” indica a presença da proteína de interesse.



A amostra purificada pelo método de troca iônica, com uso da coluna MONO Q gerou 4 outros géis, demonstrados na Fig. 11.

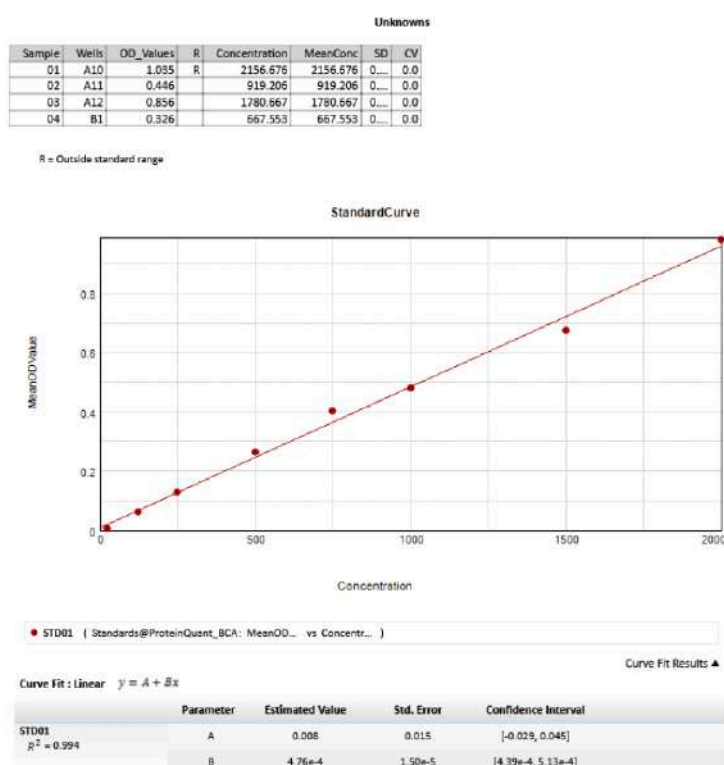
Fig. 11: Análise da expressão proteica de DisBa-01 (3º Lote) com as amostras extraídas do AKTA PURE© resultantes da purificação em coluna MONO Q. A seta com nome “DisBa-01” indica a presença da proteína de interesse.



4.1.4 Quantificação da Proteína

Após o conteúdo proteico ser dialisado e concentrado, realizou-se quantificação utilizando o kit de detecção colorimétrica pelo método do ácido bicinconínico (BCA) (BCA™ Protein Assay Kit, Pierce).

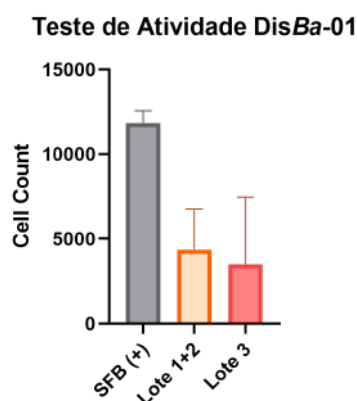
Fig. 12: Quantificação por BCA da amostra purificada. A concentração final foi de 3,936mg em um volume de 1 mL, resultando 2 mg/L de cultura.



4.1.5 Teste de Atividade em Cultura Celular

Sob orientação da Ma. Aline Maria Machado, do Laboratório Multiusuário de Bioquímica e Biologia Celular da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, realizou-se o teste de migração *Transwell* com utilização das células HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells* ou Células Endoteliais de Veia Umbilical Humana), realizando as imagens com representação da porcentagem de inibição da migração a partir do editor de imagens *ImageJ – Image Processing and Analysis in Java*.

Fig. 13: Ensaio de inibição de migração de células endoteliais em câmara de *Boyden*. SFB (+): controle positivo, com FBS; Lote 1+2: amostra de DisBa-01 (1000 nM) purificada por SUPERDEX-75; e Lote 3: amostra de DisBa-01 (1000 nM) purificada por troca iônica.

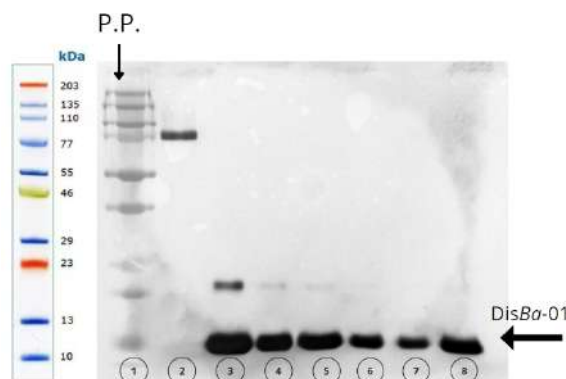


O ensaio de migração mostrou que os dois lotes de DisBa-01 apresentaram atividade inibitória da migração, resultando nas seguintes porcentagens de inibição: “Lote 1 + 2”: 63,34%; “Lote 3”: 70,6%.

4.1.6 Confirmação da Identificação da DisBa-01 por Western Blotting

A produção da DisBa-01 recombinante foi também analisada por *western blotting* utilizando anticorpo *anti Histag* para maior certeza da eficácia do processo. A fig. 14 apresenta a imagem resultante do processo, com o sinal forte na banda de tamanho esperado para a DisBa-01, demonstrando a eficácia do processo de expressão e purificação da proteína.

Fig. 14: *Western blotting* para detecção de amostras de DisBa-01 por anticorpo *anti-His-tag*. A sequência dos poços, do 1 ao 8, consecutivamente é: 1) PP - padrão de Proteína -, 2) amostra controle positivo para *His-tag* (Quitinase recombinante), 3-8), DisBa-01 5 μ g, 2 μ g, 1 μ g, 0,5 μ g, 0,3 μ g e 0,1 μ g, consecutivamente. A seta com nome “DisBa-01” indica a presença da proteína de interesse.



4.2 Modelo Murino Experimental

O modelo experimental *in vivo* possui resultados divididos de acordo com os experimentos a que estão alocados, como descrito abaixo.

4.2.1 Experimento de Metástase Espontânea Não cirúrgico

A priori, ressalta-se que ocorreram mortes espontâneas nos grupos antes da finalização do experimento, tornando os grupos com um n final diferente do inicial, ficando a distribuição de animais por grupos da seguinte forma:

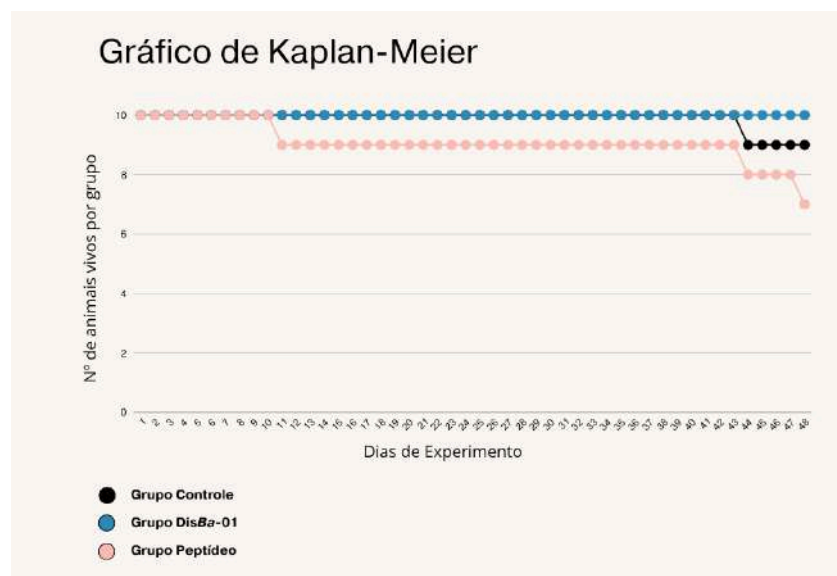
→ Grupo Controle: n = 9

→ Grupo Tratado com DisBa-01: n = 10

→ Grupo Tratado com Peptídeo *Scramble* não RGD: n = 7

Como já citado, o número de animais de cada grupo foi reduzido ao longo das realizações experimentais, principalmente devido à agressividade das células tumorais, demonstrado no gráfico de *Kaplan-Meier* abaixo.

Fig. 15: Gráfico de Kaplan-Meier experimento 1. Representação do número de animais vivos por grupo (Grupos Controle, DisBa-01 e Peptídeo *Scramble* não RGD) durante o período do experimento (48 dias).



Os dois tratamentos, DisBa-01 e Peptídeo *Scramble* não RGD, injetados localmente, inibiram significativamente o comprimento do tumor, obtendo-se uma maior média de comprimento tumoral, em cm, no grupo controle, em comparação com os tumores dos grupos DisBa-01 e Peptídeo *Scramble* não RGD. Além disso, o peso médio dos tumores também foi significativamente diminuído pelo tratamento com DisBa-01 e com o Peptídeo *Scramble* não RGD em relação ao Controle, assim como o peso do baço nos mesmos grupos (Tabela 3).

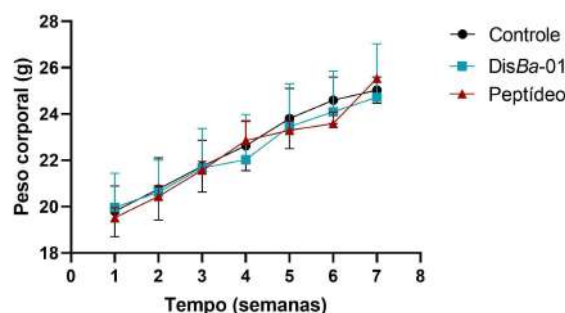
Tabela 3: Representação dos valores de média e desvio padrão relativos aos comprimentos e peso dos tumores e peso dos baços coletados entre os diferentes grupos do experimento 1.

	Grupo Controle	Grupo DisBa-01	Grupo Peptídeo
Média tumores (cm)	1,34	1,07	0,914
Desvio Padrão tumores (cm)	0,3086	0,28622	0,3132
Média tumores (g)	2,1426	1,2289	0,9903
Desvio Padrão tumores (g)	0,7546	1,5524	0,4848
Média baços (g)	0,7091	0,6298	0,4581

Desvio Padrão baços (g)	0,2382	0,2373	0,1967
----------------------------	--------	--------	--------

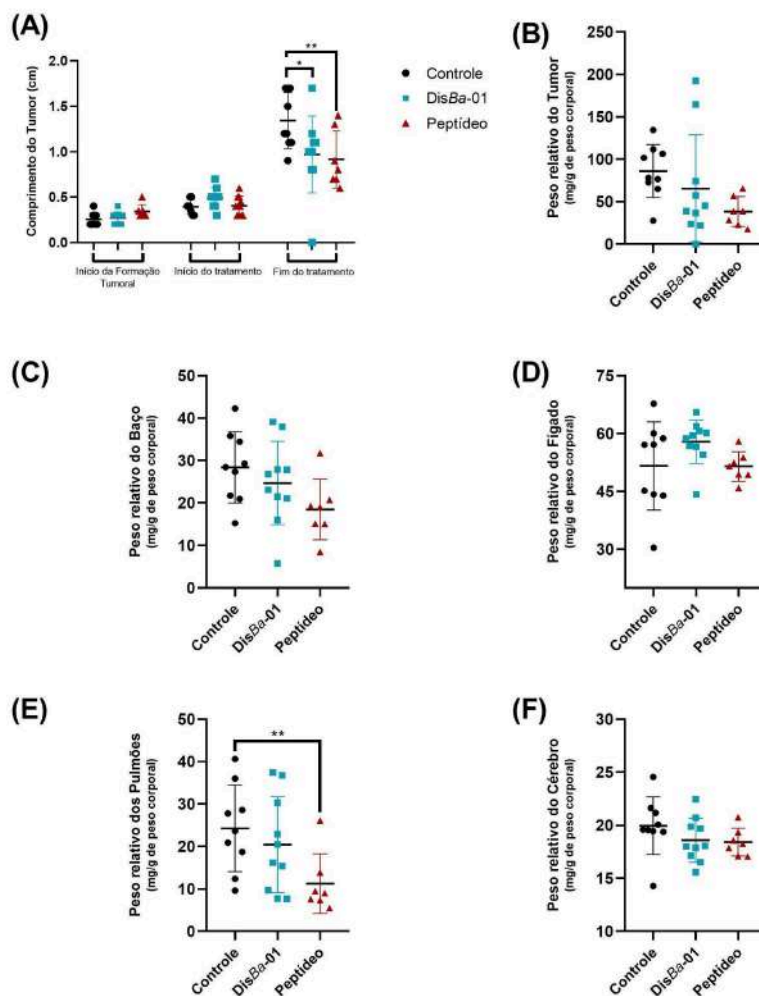
Como mencionado anteriormente, os animais foram mantidos com alimentação e hidratação *ad libitum*. Sendo assim, demonstrou-se que a evolução do peso corporal evolui igualmente entre os grupos, não havendo interferência dos tratamentos no peso dos animais (Fig. 16).

Fig. 16: Evolução do peso corporal dos animais do experimento de metástase espontânea não cirúrgico (grupos Controle, tratado com DisBa-01 e Peptídeo *Scramble* não RGD) durante as 7 semanas de experimento. Observa-se no gráfico a contínua progressão de peso em todos os grupos representados.



Tanto o tratamento local com DisBa-01 como com o Peptídeo *Scramble* não RGD inibiram significativamente o comprimento do tumor ao fim do tratamento (Fig. 17A). A média do comprimento dos tumores no grupo controle foi de 1,36 cm, no grupo DisBa-01, foi de 1,0675 e no grupo Peptídeo *Scramble* não RGD foi de 0,925. O peso dos tumores também foi diminuído pelo tratamento com DisBa-01 e com o Peptídeo *Scramble* não RGD (Fig. 17B), assim como o peso do baço (Fig. 17C), contudo, sem diferenças estatísticas.

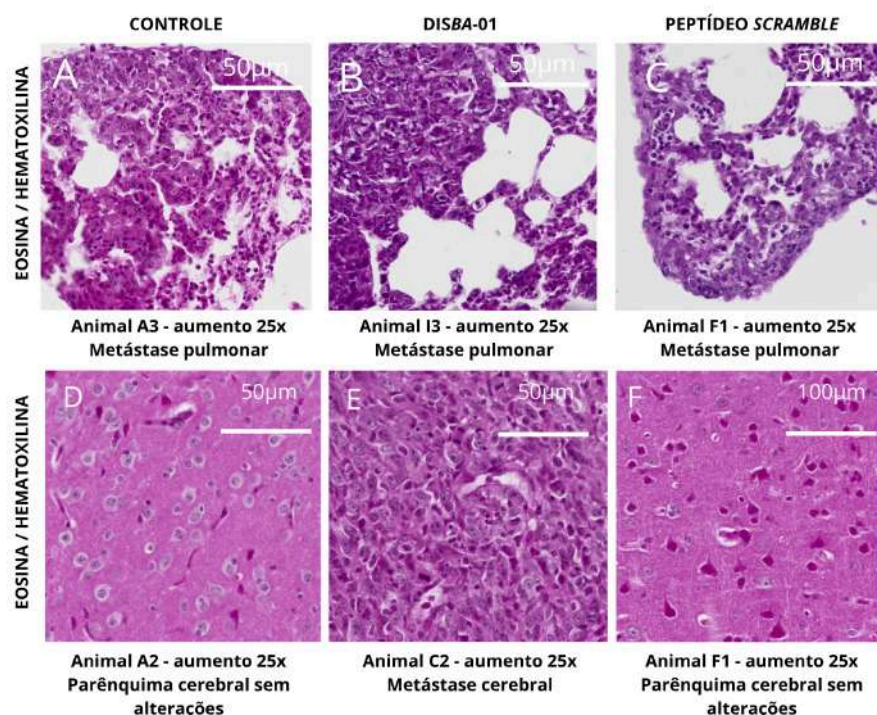
Fig. 17: Análise comparativa do peso dos órgãos dos grupos tratados e não tratados do experimento de metástase espontânea não cirúrgica. Evolução do comprimento do tumor em três momentos: início da formação tumoral, início do tratamento e final do tratamento (A); Pesos relativos do: tumor (B); baço (C); fígado (D); pulmões (E) e cérebro (F).



4.2.1.1 Análise Histológica

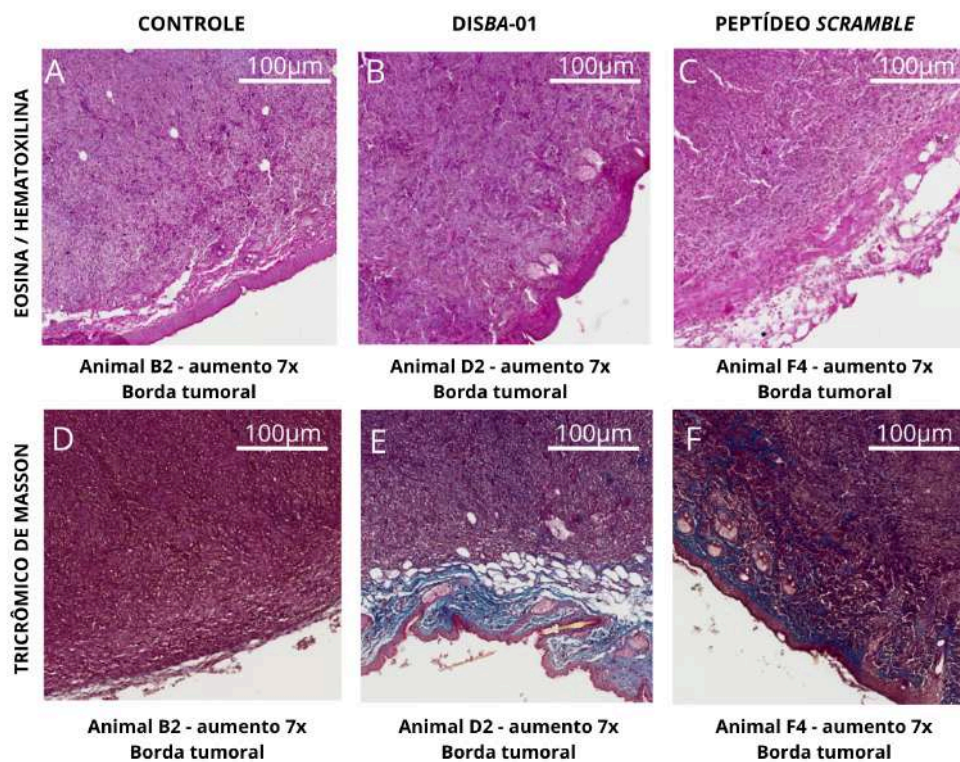
Observou-se, por histologia de tecidos, a presença de metástase no cérebro de dois animais do grupo tratado com DisBa-01, bem como nos pulmões de todos os grupos do experimento de metástase espontânea não cirúrgica, além de metástase esplênica em 1 animal do grupo Controle e em 1 animal do grupo DisBa-01 (Fig. 18).

Fig. 18: Tecidos acometidos por metástase no experimento de metástase espontânea não cirúrgico (tratamento local). As imagens (A), (B) e (C) representam metástases pulmonares dos grupos Controle (n = 9), DisBa-01 (n = 10) e Peptídeo *Scramble* não RGD (n = 7), respectivamente. As imagens (D) e (F) representam córtex cerebral saudável dos grupos Controle e Peptídeo *Scramble* não RGD, respectivamente, enquanto a imagem (E) representa uma metástase cerebral no grupo DisBa-01. Todas as imagens estão com aumento de 25× no programa *QuPath-0.5.1*.



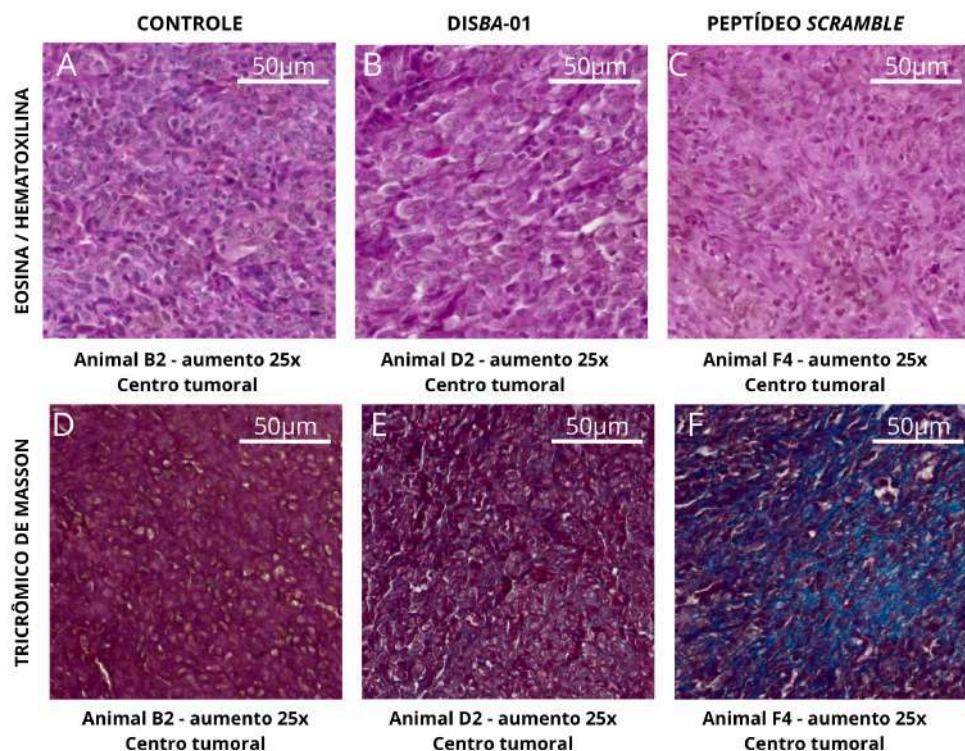
Para a análise histológica, os tumores dos grupos foram retirados após a eutanásia e tratados como descrito anteriormente. Após obtenção das imagens, foram realizadas as pranchas com uma amostra de cada animal de cada um dos grupos, com representação da histologia em duas colorações (HE e TM) das regiões distal (Fig. 19) de cada tumor observado.

Figura 19: Parte distal dos tumores do experimento de metástase espontânea não cirúrgico. A, B e C: Análise histológica por HE da parte distal dos tumores do grupo Controle, DisBa-01 e Peptídeo *Scramble*, respectivamente. D, E, e F: Análise histológica dos tumores do grupo Controle, DisBa-01 e Peptídeo *Scramble*, respectivamente - corados por Tricrômico de Masson (com aumento 7x no programa QUPath).



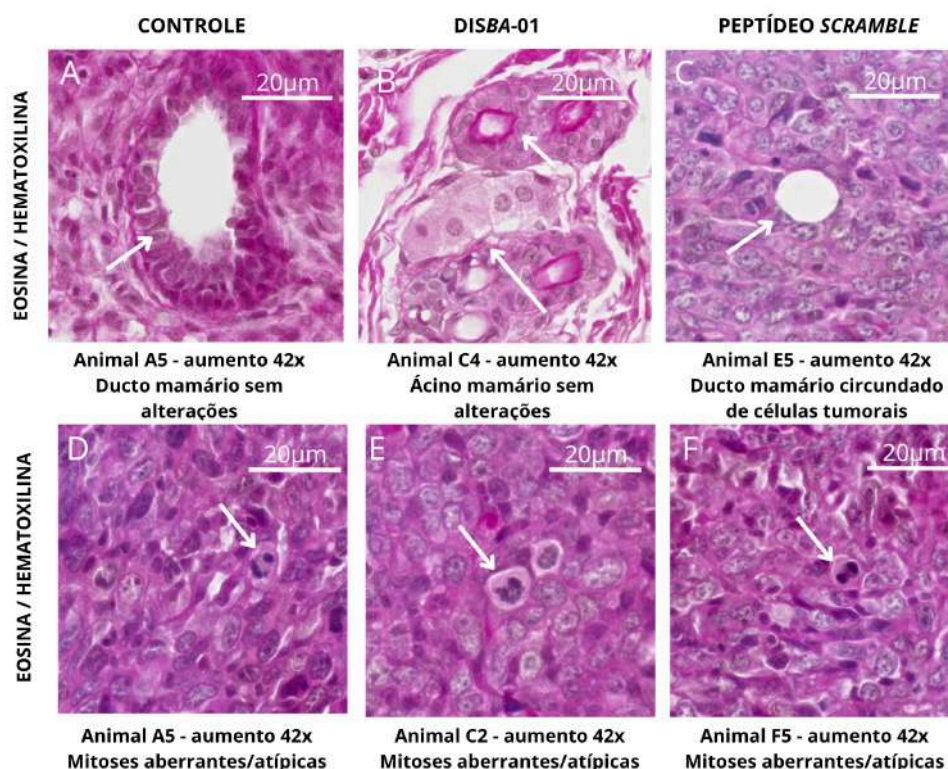
Além da região distal, observou-se também a região medial dos mesmos tumores (Fig. 20).

Figura 20: Parte central dos tumores do experimento de metástase espontânea não cirúrgico. As imagens A-C representam a coloração de HE, enquanto as imagens D-F representam as imagens coradas pelo Tricrômico de Masson (aumento 25x no programa QUPath).



Além disso, montou-se uma prancha com representação dos ductos e ácinos mamários dos animais, com representação da mitose aberrante/atípica evidenciada nos tumores (Fig. 21).

Figura 21: Representação da região mamária dos animais do experimento de metástase espontânea não cirúrgico. Análise histológica com coloração de HE representando os ductos mamários mamários (A, B - seta menor - e C), os ácinos mamários (B - seta maior) e as mitoses aberrantes/atípicas (D, E e F), característico de tumores (aumento 42x no programa).



Ademais, o número total de metástases em cada sítio, evidenciados por histologia e por qPCR, está expresso na Tabela 4.

Tabela 4: Representação do número de metástases por sítio de cada animal do experimento de metástase espontânea não cirúrgico evidenciado por histologia e qPCR *real time*.

	BAÇO	CÉREBRO	FÊMUR	FÍGADO	PULMÕES
Exp. Não cirúrgico - grupo controle	1/9	0/9	0/9	0/9	3/9
Exp. Não cirúrgico - grupo DisBa-01	1/10	2/10	0/10	0/10	2/10
Exp. Não cirúrgico - grupo peptídeo	0/7	0/7	0/7	0/7	2/7

<i>Scramble</i> não RGD					
-------------------------	--	--	--	--	--

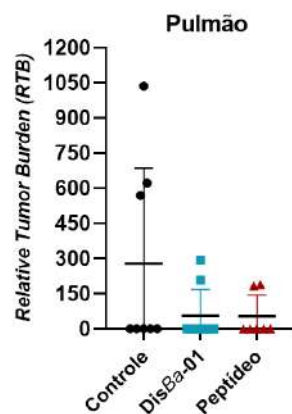
Quando submetidas à análise qualitativa, nas lâminas com coloração de HE observa-se, primeiramente, os ductos mamários circundados por um ambiente característico do câncer (Fig. 21), demonstrando a localização do TNBC na mama dos animais. Nota-se a similaridade entre a desorganização celular no ambiente tumoral presente nos três grupos do experimento (Fig. 21D-F), com presença de mitoses atípicas/aberrantes, desproporção entre núcleos e citoplasma, aumento evidente dos núcleos, perda da arquitetura normal do tecido e polimorfismo celular, com sinal de anaplasia - perda da diferenciação celular, analisados seguindo os padrões histológicos dos estudos de Donovan *et al.* (2020).

Entretanto, observa-se pela coloração do tricrômico de masson que os grupos tratados com DisBa-01 (Fig. 19E) e o Peptídeo *Scramble* não RGD (Fig. 19F) possuem maior deposição de colágeno nas bordas do tumor, com certa deposição nas regiões centrais também. O Peptídeo *Scramble* não RGD aparentemente causou uma maior deposição de colágeno também no interior do tumor (Fig. 20F).

4.2.1.2 Detecção do Gene *mCherry* por qPCR

A Figura 22 apresenta uma imagem representativa das curvas de amplificação dos genes *mCherry* e vimentina. Após a realização dos ensaios e dos cálculos para análise do RTB dos pulmões, os resultados foram usados para construção de um gráfico em *dot plot* (Fig. 22) através do programa *GraphPad Prism 8*, a fim de se avaliar se haviam diferenças estatísticas entre as amostras e observar a distinção entre a expressão gênica da *mCherry* nos pulmões dos diferentes grupos representados.

Fig. 22: Gráfico em *dot plot* com o RTB dos pulmões do experimento de metástase espontânea não cirúrgico. Os valores foram submetidos à análise de variância ANOVA, utilizando o teste *One Way*, com *post-hoc* de *Tukey* para comparações múltiplas, com $P < 0,05$ e resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão, sem apresentar diferenças estatísticas.

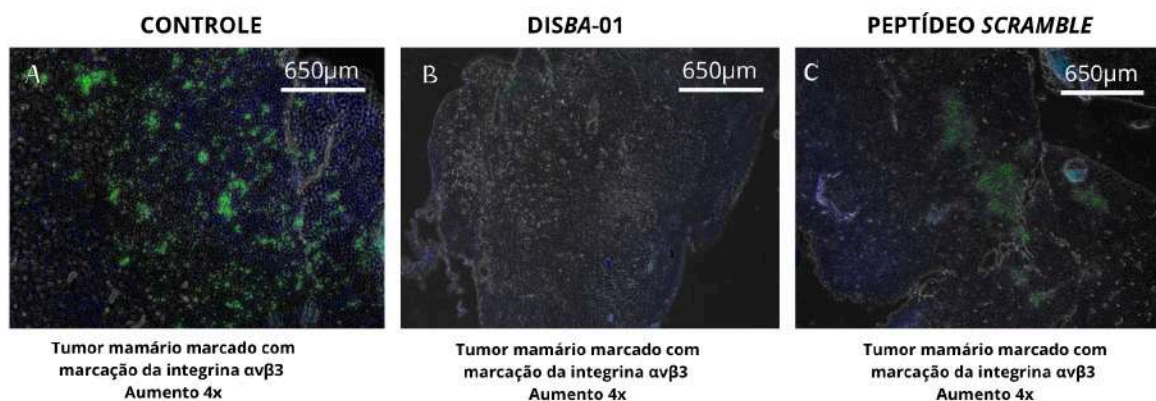


Observa-se com o experimento que a maior parte dos tumores que amplificaram sinal para *mCherry* encontram-se no grupo controle, com 37,5% do grupo apresentando amplificação para o gene de interesse, sendo que houve amplificação em 22,22% dos animais do grupo DisBa-01 e 28,57% no grupo Peptídeo *Scramble* não RGD. Além disso, destaca-se que, dentre os que amplificaram para *mCherry*, os que possuem os menores *CT mean* foram os animais do grupo Controle (33,174, 38,774 e 39,459). Os animais do grupo Peptídeo *Scramble* não RGD (34,856 e 39,341) e o grupo DisBa-01 (39,374 e 39,787) tiveram um *CT mean* mais perto de 40, o que demonstra que a quantidade de *mCherry* amplificada nos grupos tratados, mesmo que tenha atingido o limiar da reação (*threshold*: 0.040), foi baixa, demonstrando menor presença do gene de interesse nas amostras, denotando, portanto, menor presença de células tumorais, comparado ao grupo Controle. Acrescenta-se que foram adicionados na análise os animais que obtiveram o valor para o cálculo do RTB para que fosse possível a realização da análise estatística, a qual, como mencionado, não apresentou diferença estatística entre os grupos. Ademais, observa-se que as demais imagens de gráficos gerados após o qPCR dos demais órgãos estão apresentados no Anexo I ao final do presente estudo.

4.2.1.3 Detecção da Integrina $\alpha\beta 3$ por Imunofluorescência

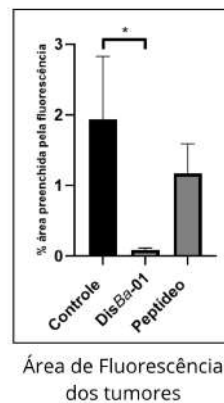
Para a realização da imunofluorescência, foi utilizado o anticorpo *Anti-Integrin $\alpha\beta 3$* para visualização das integrinas $\alpha\beta 3$, muito presentes nos vasos, para verificação de marcadores de angiogênese nos distintos grupos. Foi notável que a marcação de fluorescência nos grupos tratados com a desintegrina foi consideravelmente menor do que a dos demais grupos (Fig. 23).

Fig. 23: Imunodetecção da integrina $\alpha\beta 3$ do experimento de metástase espontânea não cirúrgica. As colorações representam: azul: núcleos celulares; verde: marcação da integrina $\alpha\beta 3$; fundo branco: morfologia celular. (A) Tumor do grupo controle com intensa fluorescência; (B) Tumor do grupo tratado com DisBa-01, com marcação discreta de fluorescência; (C) Tumor do grupo tratado com Peptídeo *Scramble* não RGD, com marcação visível de fluorescência;



O gráfico em *dot plot* (Fig. 24) com os valores das áreas de fluorescência de todos os animais de cada grupo do experimento de metástase espontânea não cirúrgica demonstrou uma considerável diminuição da fluorescência no grupo tratado com DisBa-01. Este resultado sugere que houve interação entre a integrina $\alpha\beta 3$ e a desintegrina, provavelmente resultando na internalização do receptor.

Fig 24: Representação da porcentagem da área dos tumores do experimento de metástase espontânea não cirúrgico em que há fluorescência.



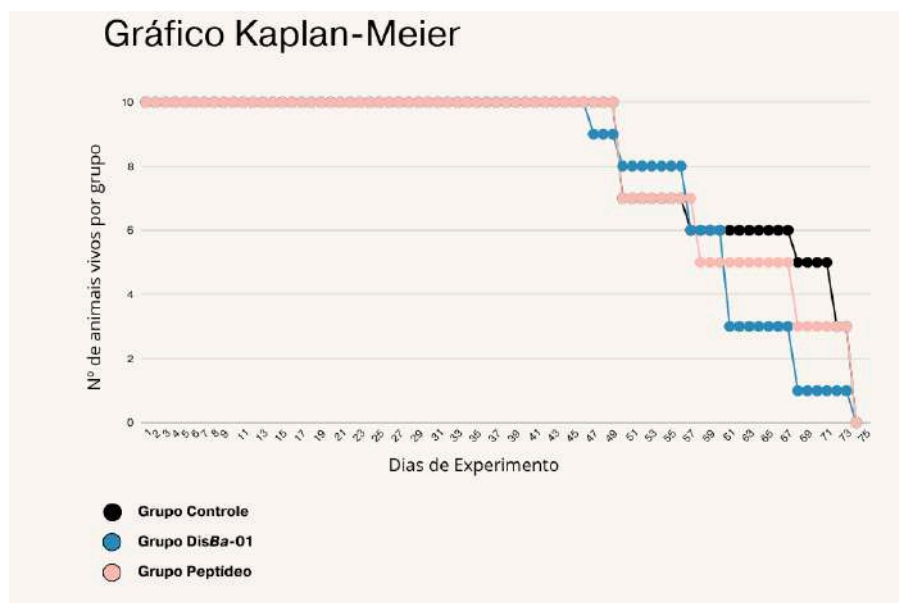
4.2.2 Experimento de Metástase Espontânea com Cirurgia

Assim como no Exp. 1, no Exp. 2 também ocorreram mortes espontâneas nos grupos antes da finalização do experimento, tornando os grupos com um n final diferente do inicial, ficando a distribuição de animais por grupos da seguinte forma:

- Grupo Controle: n = 6
- Grupo Tratado com DisBa-01: n = 6
- Grupo Tratado com Peptídeo *Scramble* não RGD: n = 6

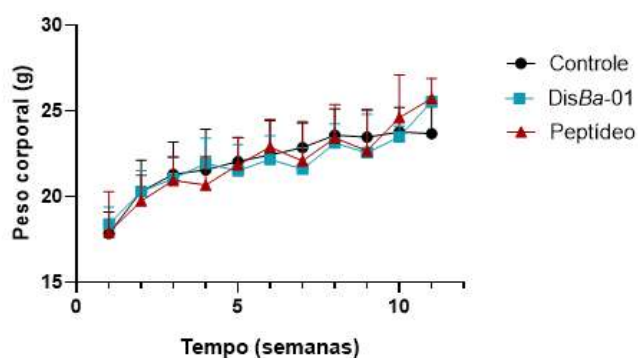
O número de animais de cada grupo foi reduzido ao longo das realizações experimentais, principalmente devido à agressividade das células tumorais, bem como à tumorectomia, demonstrado no gráfico de *Kaplan-Meier* abaixo.

Fig. 25: Gráfico de *Kaplan-Meier* experimento de metástase espontânea com cirurgia. O gráfico representa o número de animais vivos de cada grupo, separados por tratamento, ao longo do período experimental, totalizando 74 dias desde a aclimação até a eutanásia.



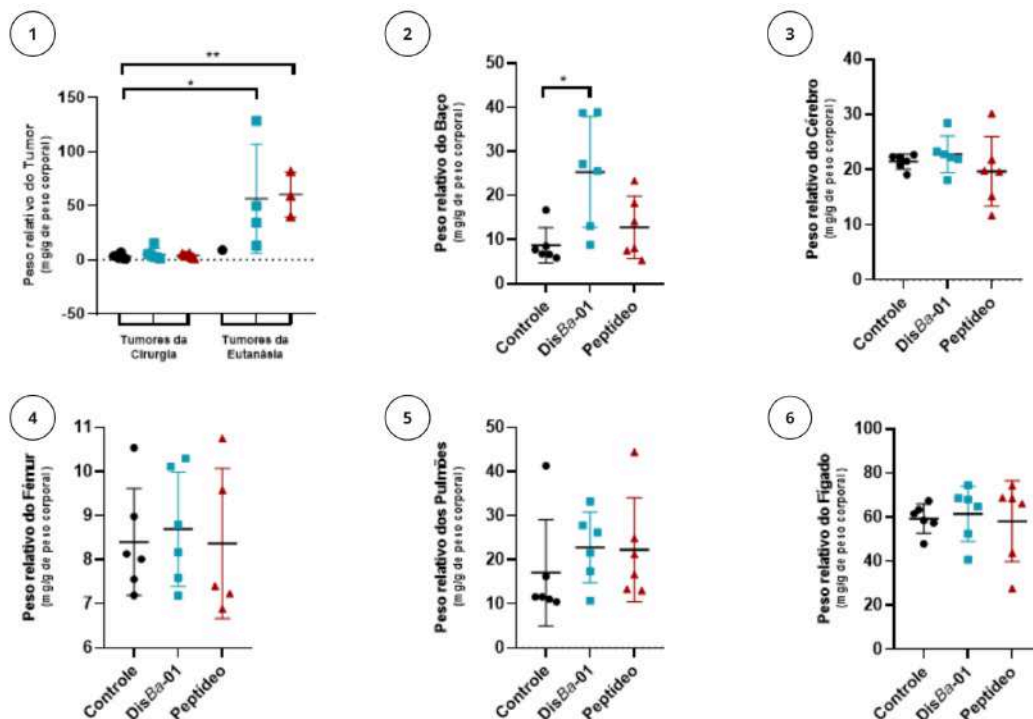
O acompanhamento do desenvolvimento do peso dos animais ao longo do experimento também foi registrado por meio de gráficos de linha (Fig. 26).

Fig. 26: Desenvolvimento de peso corporal dos grupos tratados com tratamento sistêmico ao longo do tempo de experimento.



Além disso, o peso de cada órgão no momento da eutanásia foi registrado em formato de gráficos de *dot plots* (Fig. 27).

Fig. 27: Pesos relativos de cada órgão coletado dos animais após a realização da eutanásia no experimento de metástase espontânea com cirurgia. Os gráficos representam: (1) recidiva do tumor primário na mama da tumorectomia, (2) baço, (3) cérebro, (4) fêmur, (5) pulmão e (6) fígado.



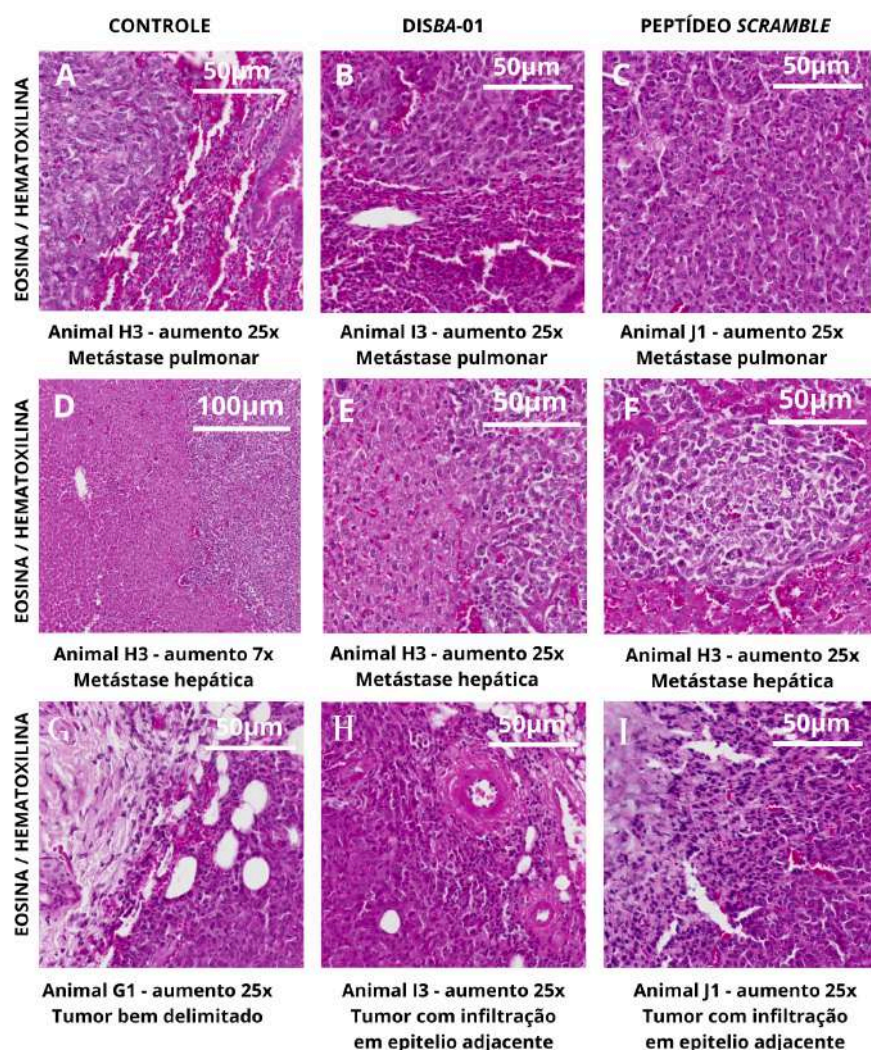
As imagens indicam que o ganho de peso dos animais não apresentou diferença, demonstrando que todos os grupos tiveram bom ganho de peso, tendo em vista que todos tiveram comida *ad libitum* (Fig. 26). Além disso, observa-se maior recidiva tumoral nos grupos tratados com DisBa-01 e com o Peptídeo *Scramble* não RGD, bem como maior peso desses tumores em relação ao grupo Controle. Acrescenta-se ainda o aumento do peso dos baços dos animais tratados com DisBa-01, quando comparados aos demais grupos, fato observado na própria eutanásia, em que os baços se apresentavam hiperplasiados. Para os demais órgãos, não se observou diferença entre os grupos.

4.2.2.1 Análise Histológica

Após a obtenção das imagens, foram elaboradas as pranchas com as imagens de interesse, com a representação das alterações observadas. Observou-se através da histologia dos tecidos a presença de metástase hepática em 1 animal do grupo Controle (Fig. 28D-F), bem como nos pulmões de todos os grupos do experimento de metástase espontânea não cirúrgico (Fig. 28A-C).

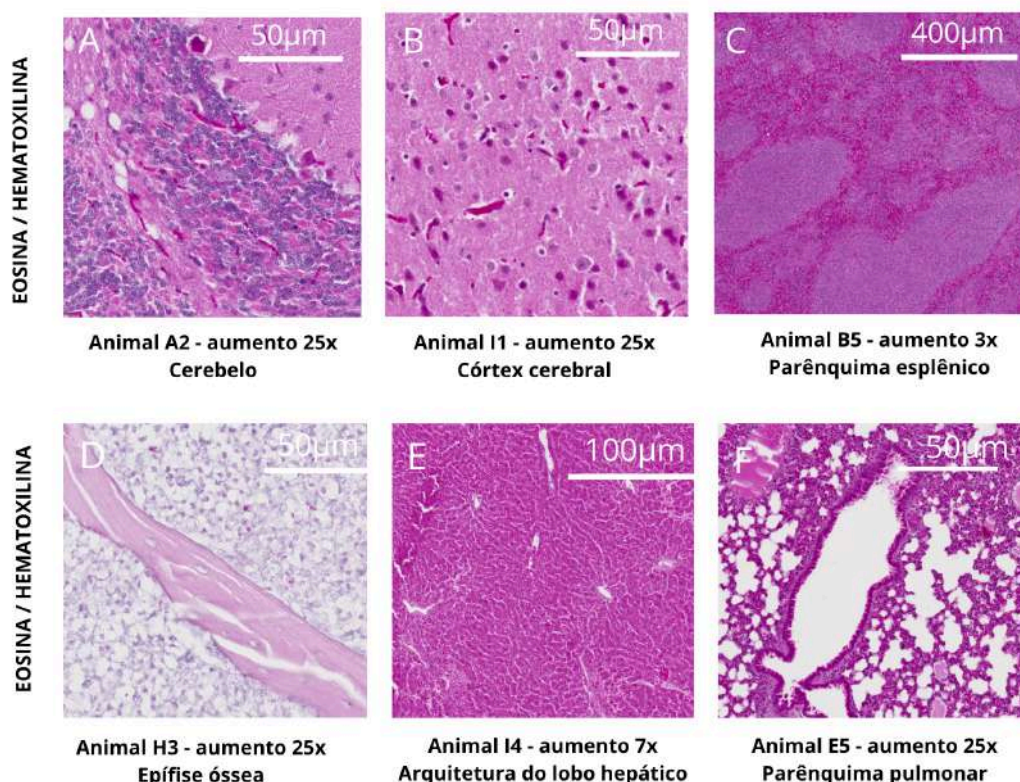
Acrescenta-se ainda o fato de que a análise gerada pela histopatologista sobre o experimento de metástase espontânea com cirurgia revelou um padrão tumoral mais invasivo nos animais tratados com DisBa-01 (Fig. 28H) e o Peptídeo *Scramble* não RGD (Fig. 28I), comparados ao grupo Controle, que possuíam bordas relativamente mais delimitadas (Fig. 28G), majoritariamente.

Fig. 28: Prancha representativa dos tecidos afetados nos animais do experimento de metástase espontânea com cirurgia (tratamento sistêmico). As imagens (A), (B) e (C) representam metástases pulmonares dos grupos Controle, DisBa-01 e Peptídeo *Scramble* não RGD, respectivamente. As imagens (D), (E) e (F) representam metástase hepática em um animal do grupo Controle. As imagens (G), (H) e (I) representam bordas tumorais com infiltração nos tecidos adjacentes de animais dos grupos Controle, DisBa-01 e Peptídeo *Scramble* não RGD. Todas as imagens estão no aumento de 25x no programa *QuPath-0.5.1*, com exceção da imagem (D), que está no aumento de 7x no programa.



Além disso, realizou-se uma prancha histológica que contém exemplos de órgãos com seus parênquimas não afetados pela invasão metastática (Fig. 29).

Fig. 29: Prancha representativa dos demais tecidos saudáveis dos animais do experimento de metástase espontânea com cirurgia. (A) Cerebelo - animal grupo Controle; (B) Córtex - Cerebral animal grupo DisBa-01; (C) Parênquima esplênico - animal grupo Controle; (D) Epífise óssea - animal grupo Controle; (E) Lobo hepático - animal grupo DisBa-01; (F) Parênquima pulmonar - animal grupo Peptídeo *Scramble* não RGD. O aumento relativo de cada imagem está escrito na mesma.

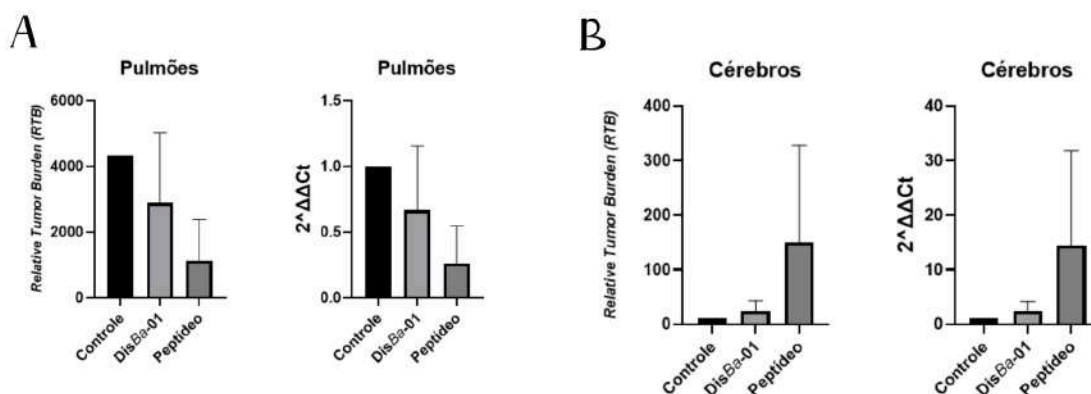


4.2.2.2 Detecção do Gene *mCherry* por qPCR

Os gráficos do *Amplification Plot* (Fig. 30A/30C) demonstram que o *threshold* foi delimitado em 0.040 e as amostras que apresentaram amplificação acima do limiar foram demarcadas como positivas para o gene de interesse (*mCherry* - marcação vermelha) ou para a referência (Vimentina - marcação azul). Com os gráficos dos cálculos de RTB e de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, entende-se que todos os grupos apresentaram expressão de *mCherry* nos pulmões e no cérebro, demonstrando metástase em todos os tratamentos. Contudo, é notória a diminuição da expressão do gene de interesse nos pulmões dos grupos tratados com DisBa-01 e o Peptídeo

Scramble não RGD em comparação ao grupo Controle (Fig. 30A), assim como também observa-se diminuição da expressão de tal gene nos cérebros nos grupos DisBa-01 e Controle em relação ao grupo Peptídeo *Scramble* não RGD (Fig. 30B), mesmo que houve maior número de metástase pulmonar no grupo DisBa-01, os valores de “Ct mean” do grupo eram mais altos, demonstrando menor carga tumoral.

Fig. 30: Quantificação da expressão dos genes de interesse (*mCherry* - em vermelho) e do gene de referência (Vimentina - em azul). As imagens (A) e (C) representam o gráfico *Amplification Plot* gerado pelo programa de qPCR *real-time*, referentes aos pulmões e cérebros, respectivamente. As imagens (B) e (D) representam gráficos de barras que mostram os cálculos de RTB e $2^{-\Delta\Delta Ct}$ dos pulmões e do cérebro, respectivamente.



Ressalta-se que o número total de metástase em cada sítio, evidenciados por histologia e qPCR, está expresso na Tabela 5.

Tabela 5: Representação do número de metástases por sítio em cada grupo do experimento de metástase espontânea com cirurgia evidenciado por histologia e qPCR *real time*.

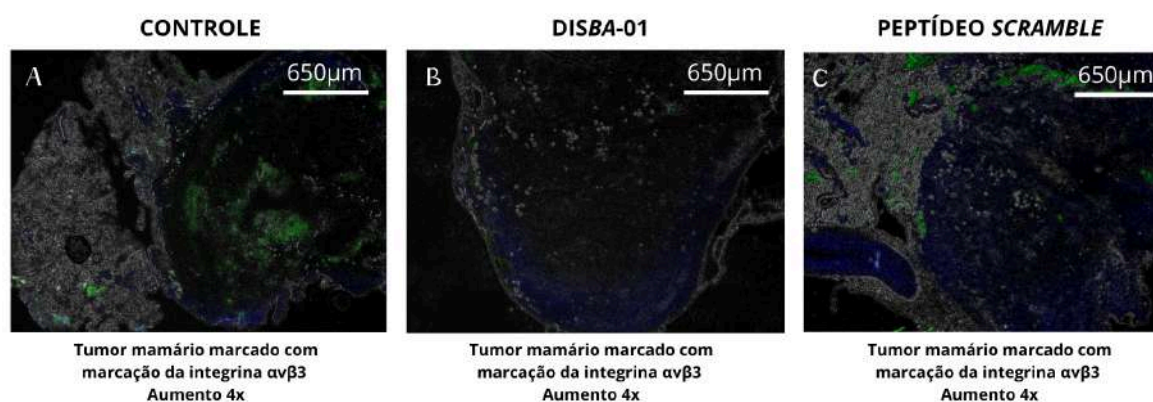
	BAÇO	CÉREBRO	FÊMUR	FÍGADO	PULMÕES
Exp. Cirúrgico - grupo Controle	1/6	1/6	0/6	1/6	2/6
Exp. Cirúrgico - grupo DisBa-01	1/6	2/6	0/6	0/6	5/6
Exp. Cirúrgico - grupo peptídeo <i>Scramble</i> ã RGD	0/6	2/6	0/6	0/6	3/6

Ademais, observa-se que as demais imagens de gráficos gerados após o qPCR dos demais órgãos estão apresentados no Anexo I ao final do presente estudo.

4.2.2.3 Detecção da Integrina $\alpha\beta 3$ por Imunofluorescência

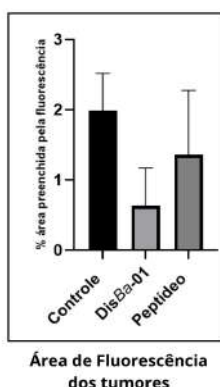
Para a realização da imunofluorescência, foi utilizado o anticorpo *Anti-Integrin $\alpha\beta 3$* para visualização das integrinas $\alpha\beta 3$, muito presentes nos vasos, para verificação de marcadores de angiogênese nos distintos grupos. Assim como observado no experimento de metástase espontânea não cirúrgico, a marcação de fluorescência nos grupos tratados com a desintegrina foi consideravelmente menor do que a dos demais grupos (Fig. 31).

Fig. 31: Imunodetecção da integrina $\alpha\beta 3$ no experimento de metástase espontânea com cirurgia. Imagens de fluorescência dos tumores de recidiva no sítio primário. As colorações representam: azul (DAPI): núcleos celulares; verde (FITC): marcação da integrina $\alpha\beta 3$; fundo branco: morfologia celular. (A) Tumor do grupo controle com intensa fluorescência; (B) Tumor do grupo tratado com DisBa-01, com marcação discreta de fluorescência; (C) Tumor do grupo tratado com Peptídeo *Scramble* não RGD, com marcação visível de fluorescência;



O gráfico em *dot plot* (Fig. 32) com os valores das áreas de fluorescência de todos os animais de cada grupo do experimento de metástase espontânea com cirurgia demonstrou uma considerável diminuição da fluorescência no grupo tratado com DisBa-01, demonstrando, novamente, a possível internalização do receptor da integrina através do tratamento. Essa é uma observação muito interessante, uma vez que o tratamento foi sistêmico, por via ip.

Fig. 32: Representação da porcentagem da área do tumor com fluorescência.



4.3 Comparação Entre os Experimentos

No que tange à comparação entre os experimentos 1 e 2, considerando as diferenças de delineamento experimental entre ambos, foi possível observar algumas diferenças nos resultados obtidos. A priori, destaca-se a menor sobrevivência dos animais ao experimento de metástase espontânea com cirurgia quando comparado ao não cirúrgico, sendo que a tumorectomia representa maior risco à disseminação tumoral, tendo em vista a invasividade do procedimento e a impossibilidade de garantia de que toda a região do tumor primário fosse removida - tomando por fator limitante o tamanho dos animais para incisões maiores, as quais poderiam garantir a extração de uma maior área tomada pelas células do tumor primário. Ademais, observou-se um número maior de metástases no experimento de metástase espontânea com cirurgia, bem como mais sítios afetados (baço, cérebro, fígado e pulmões - Tabela 5) pela ocorrência metastática em comparação ao experimento não cirúrgico (baço, cérebro e pulmão - Tabela 4).

5. DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi verificar se a inibição da integrina $\alpha v \beta 3$ pela desintegrina recombinante DisBa-01 poderia reduzir o número de metástases em um modelo experimental de câncer de mama triplo negativo. O modelo utilizado foi o de injeção de células 4T1Br4-*mCherry* no tecido adiposo da glândula mamária de camundongos fêmeas, seguindo-se 2 protocolos diferentes. No primeiro protocolo, os tratamentos foram realizados diretamente no local do tumor, sem cirurgia de ressecção. No segundo protocolo, os tumores, assim que palpáveis, eram retirados cirurgicamente e os tratamentos eram realizados por via ip. Como controles foram

utilizados 2 grupos, um sem tratamento, e um segundo grupo tratado com um peptídeo sem a sequência RGD.

5.1 Experimento de Metástase Espontânea Não Cirúrgico

De forma enfática, observou-se que a inibição da integrina, em resposta ao tratamento local, foi realizada, demonstrando, através da quantificação da área ocupada pela fluorescência, que os tumores tratados com a desintegrina tiveram a internalização do receptor, fato observado pela atuação da DisBa-01 *in vitro*, e, agora, demonstrado *in vivo* (Fig. 23). Tal inibição relaciona-se à menor carga tumoral nos pulmões tratados (Fig. 22), bem como na discreta diminuição do número de metástases do grupo DisBa-01 em relação ao grupo Controle (Tabela 4).

A análise macroscópica do peso dos órgãos e dos tumores (Tabela 3; Fig. 17) demonstrou que o tratamento com a desintegrina conseguiu diminuir significativamente o tamanho dos tumores em comparação ao grupo controle. Estudos anteriores (MARTIN, 2015; LIMAM *et al.*, 2023), realizados com linhagens celulares tumorais altamente metastáticas, com posterior tratamento que inibisse a progressão tumoral. Com ênfase nos estudos de Limam *et al.* (2023), observou-se que o tratamento com Leb-C, um peptídeo que mimetiza desintegrinas com motivo RGD, com mesmo alvo específico que a DisBa-01, *in vivo*, com tratamento realizado em região próxima ao tumor, também apresentou diminuição das dimensões tumorais através da inibição das integrinas alvo, corroborando com os resultados apresentados no presente estudo.

No que diz respeito à histologia, observa-se que a metástase pulmonar esteve presente em todos os grupos - com sutil atenuação nos grupos DisBa-01 e Peptídeo *Scramble* não RGD. A ocorrência de metástase esplênica e cerebral foi observada apenas através do qPCR, sem observação de massa tumoral à análise histológica, demonstrando possível invasão de células tumorais próxima à eutanásia, impedindo formação de um aglomerado visível à histologia.

De acordo com Zhou *et al.* (2018), um componente importante do estroma tumoral TNBC são os fibroblastos associados ao câncer (CAFs). Os CAFs expressam uma série de citocinas, quimiocinas e proteínas da matriz extracelular (MEC) essenciais para arquitetura tumoral, crescimento, invasão e metástase (KARAGIANNIS *et al.*, 2012). Em modelos *in vivo* de câncer de mama, foi demonstrado que os CAFs promovem desenvolvimento e progressão de

metástases. Portanto, pesquisas nos CAFs tornou-se um ponto crítico nos últimos anos (LOUAULT *et al.*, 2019).

Joyce (2023) aponta que os CAFs podem ser ativados para secretar proteínas da MEC e fatores angiogênicos, incluindo VEGF-A, contribuindo ainda mais para o complexo MT primário entrelaçado. Além disso, a origem dos CAFs nos tumores permanece controversa e pode variar dependendo do estágio do tumor e do tipo de câncer. A expansão de fibroblastos residentes em tecidos locais pode representar uma fonte de CAFs em tumores em estágio inicial. Há evidências crescentes mostrando que os CAFs permitem a invasão coletiva de células cancerígenas, gerando fisicamente trilhas na MEC por meio de suas propriedades de remodelação e exercendo forças físicas de tração.

Os CAFs são ativados por vários mecanismos no MT, incluindo exposição a mediadores inflamatórios, alterações na rigidez e composição da MEC e metabólitos alterados. Acrescenta-se ainda que são os principais responsáveis pela deposição e remodelação da MEC dentro do MT. Por exemplo, a fibrose no MT causa rigidez tecidual, o que está significativamente associado à baixa sobrevida de pacientes com câncer de pâncreas e câncer de mama. Ademais, neste contexto, acrescenta-se que os tumores fibróticos têm um fenótipo inflamado e a inflamação promove maior fibrose (JOYCE, 2023). Sendo assim, com base no exposto na literatura, entende-se que a formação de fibrose não se apresenta como fator contribuinte para as ações antitumorais, sendo necessário, assim, maiores estudos sobre a relação entre a DisBa-01 e a deposição de colágeno nos tumores tratados.

5.2 Experimento de Metástase Espontânea com Cirurgia

Com relação ao Experimento de Metástase Espontânea com Cirurgia, observou-se uma grande mortalidade, tanto devido à agressividade das células 4T1Br4-*mCherry*, como também do procedimento de ressecção do tumor, o que diminuiu sensivelmente o número de animais, prejudicando as análises estatísticas. Tai e colaboradores (2014) demonstraram que o trauma cirúrgico libera fatores inflamatórios que podem potencializar a disseminação tumoral, fato observado no experimento, em que a tumorectomia operou como fator potencializador da diminuição da expectativa de vida dos animais, reduzindo o n amostral dos grupos.

Além disso, foi possível observar recidiva tumoral em alguns animais na glândula mamária (Tabela 5), com ênfase no grupo DisBa-01, o qual apresentou

maior número de recidivas quando comparado aos outros grupos. Uma das vias de análise para o ocorrido pode ser atribuído ao fenômeno da *upregulation* compensatória de outras integrinas, tendo em vista que a inibição da integrina $\alpha\beta3$ pode gerar aumento da expressão de outras integrinas que também promovem invasão e contribuem para continuidade tumoral, como a integrina $\alpha5\beta1$ (CASWELL *et al.*, 2008).

Através da realização do RTB, observa-se uma tendência de diminuição no grupo tratado com DisBa-01, fato explicado pelos maiores valores de *Ct mean* em tal grupo, demonstrando que a expressão da fluorescência do gene de interesse (*mCherry*) se deu nos ciclos finais do qPCR *real-time*, tendo, assim, menor carga tumoral quando comparada aos outros grupos, demonstrando diminuição da metástase para os cérebros e pulmões (Fig. 30).

As imagens da imunofluorescência (Fig. 31) demonstram que a injeção de doses sistêmicas da DisBa-01 levaram a desintegrina a se ligar à integrina $\alpha\beta3$, e provavelmente provocou a sua internalização, como demonstrado pela diminuição da fluorescência visível pelas imagens e explanada pelos dados da área das imagens expressa no gráfico em *dot plot* (Fig. 32). Tal fato representa um importante achado, pois, diferente do experimento de metástase espontânea não cirúrgico, em que o tratamento era inoculado no próprio tumor *in situ*, no experimento de metástase espontânea com cirurgia, o tratamento sistêmico levou a desintegrina a se ligar ao receptor alvo, mesmo sem ser inoculada no tumor.

No que tange à análise do peso dos baços, indicadores de carga tumoral geral (MARTIN, 2015), pode-se notar maior média de peso no grupo tratado com DisBa-01 (Fig. 27.2). Sabendo que o baço é um órgão linfóide secundário, a esplenomegalia pode refletir infiltração tumoral direta ou resposta imunológica sistêmica. Entretanto, a literatura aponta correlação entre esplenomegalia e maior RTB (WIEMERS *et al.*, 2025), fato observado de forma inversa no presente estudo, em que o RTB dos animais tratados com DisBa-01 não se apresentaram maior que o dos outros grupos, mesmo acompanhado do aumento do peso dos baços.

Ademais, Hanahan (2026) aponta que a inibição farmacológica em pacientes com câncer, combinada com alterações farmacológicas e genéticas em modelos murinos, têm validado e esclarecido ainda mais os papéis e a importância dos oncogenes promotores de proliferação na tumorigênese e na progressão tumoral subsequente. Assim, ressalta-se a continuidade dos estudos para uma melhor

compreensão da relação entre a inibição das integrinas e o impacto sobre a continuidade tumoral.

6. FATORES LIMITANTES

Durante a realização dos experimentos, observou-se uma série de fatores que limitaram os resultados esperados: 1) O uso das células tumorais da linhagem 4T1Br4-*mCherry* apresentou-se extremamente agressiva aos animais, gerando alta mortalidade e, possivelmente, mascarando os efeitos terapêuticos mais sutis; 2) O tamanho amostral reduzido após as mortes dos animais tornou-se fator limitante pela dificuldade de traçar estatística com um *n* reduzido; 3) A ausência de um grupo controle sem o desenvolvimento de tumor, sem tratamento e com cirurgia, para observação mais concreta dos efeitos da cirurgia sob os animais; e 4) A ausência de diferença estatística significativa no ensaio da zimografia, fato que manteve o questionamento sobre a deposição de colágeno observada pela histologia dos tumores tratados.

7. CONCLUSÕES

Com o estudo, pode-se observar a influência da interação da integrina $\alpha\beta3$ no microambiente tumoral, tendo em vista que sua inibição farmacológica, por meio da DisBa-01, promoveu mecanismos que se apresentaram de forma pró-tumoral e antitumoral. Os resultados do experimento de metástase espontânea não cirúrgico demonstraram diminuição do peso e do comprimento dos tumores tratados, além da diminuição de metástase pulmonar no grupo DisBa-01, evidenciado pela PCR com maiores valores de RTB neste grupo, além da maior deposição de colágeno nos tumores dos grupos tratados com a DisBa-01 e o Peptídeo *Scramble* não RGD. Já o experimento de metástase espontânea com cirurgia trouxe como resultado a diminuição da metástase pulmonar para o grupo tratado com DisBa-01 em relação ao grupo controle, mas um maior número de recidiva tumoral em tal grupo, bem como a presença de esplenomegalia sob o tratamento da desintegrina recombinante. A realização dos experimentos mostrou que houve discreta melhora na resposta ao tratamento no experimento 1, em que os animais não foram submetidos à cirurgia, sendo que o experimento 2 evidenciou maior resposta metastática, aumento do número de sítios de disseminação tumoral e diminuição da sobrevida dos animais. Remata-se, então, que, no presente estudo, a inibição

farmacológica da integrina $\alpha v \beta 3$, *in vivo*, como fator único, não foi suficiente para inibir os demais mecanismos do microambiente tumoral envolvidos na progressão do tumor, sendo necessário maior aprofundamento dos estudos sobre a relação entre a inibição da integrina $\alpha v \beta 3$ e a continuidade tumoral.

8. REFERÊNCIAS

ACETO N, BARDIA A, MIYAMOTO DT, et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell*. 2014. doi:10.1016/j.cell.2014.07.013.

AGRAWAL, A., JAVANMARDI, Y., WATSON, SA et al. Assinaturas mecânicas na metástase do câncer. *npj Biol. Phys. Mech.* 2 , 3 (2025). <https://doi.org/10.1038/s44341-024-00007-x>

ALTEI et al., Inhibition of $\alpha\beta 3$ integrin impairs exosome adhesion, biogenesis and cellular uptake by recipient cells. *Cell Commun. Signal*. Submetido em março de 2020.

BIANCHINI G, BALKO JM, MAYER IA, SANDERS ME, GIANNI L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016 Nov;13(11):674-690. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.66. Epub 2016 May 17. PMID: 27184417; PMCID: PMC5461122.

CAPUTO, L. F. G.; GITIRANA, L. B.; MANSO, P. P. A. Técnicas histológicas. In: MOLINARO, E.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, R. (org.). Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. Rio de Janeiro: EPSJV/Fiocruz, 2010. v. 2, cap. 3.

CARPENTER, J. W. Formulário de animais exóticos. 3. ed. São Paulo: MedVet, 2010.

CASWELL PT, CHAN M, LINDSAY AJ, MCCAFFREY MW, BOETTIGER D, NORMAN JC. Rab-coupling protein coordinates recycling of $\alpha 5 \beta 1$ integrin and EGFR1 to promote cell migration in 3D microenvironments. *J Cell Biol*. 2008 Oct 6;183(1):143-55. doi: 10.1083/jcb.200804140. PMID: 18838556; PMCID: PMC2557049.

CHO EH, WENDEL M, LUTTGEN M, et al. Characterization of circulating tumor cell aggregates identified in patients with epithelial tumors. *Phys Biol*. 2012. doi:10.1088/1478-3975/9/1/016001.

COMINETTI, MR, ALTEI, WF e SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. Metastasis inhibition in breast cancer by targeting cancer cell extravasation. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 2019, 11: 1-14.

DANILUCCI TM, SANTOS PK, PACHANE BC, PISANI GFD, LINO RLB, CASALI BC, ALTEI WF, SELISTRE-DE-ARAÚJO HS. Recombinant RGD-disintegrin DisBa-01 blocks integrin $\alpha v \beta 3$ and impairs VEGF signaling in endothelial cells. *Cell Commun. Signal.* 2019; 17: 27-42. doi: 10.1186/s12964-019-0339-1.

DASGUPTA A, LIM AR, GHAJAR CM. Circulating and disseminated tumor cells: harbingers or initiators of metastasis? *Mol Oncol.* 2017. doi:10.1002/1878-0261.12022.

FEMAMA. Federação Brasileira de Intituições Filantrópicas de Apoio à Saúde da Mama. Tipos de câncer de mama. 2019. Disponível em: https://femama.org.br/site/blog-da-femama/tipos-de-cancer-de-mama/?gad_source=1&gad_campaignid=10615117816&gbraid=0AAAAADNp79q6C3ZFkpR2eMbOOTRKTEXTI&gclid=Cj0KCQjw3qLSBhDaARIsAFTiVh4qRRe0E0siFsyy43vqJYluTjQE69h24yuKoLxPz1rBVmNv6Lpn7gQaAoMfEALw_wcB.

FERRARA, N. Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010. doi:10.1016/j.cytogfr.2009.11.003.

FLECKNELL PA. Anesthetic management. In: *Laboratory animal anaesthesia*. 2nd ed. 1996; Academic Press: 75-101.

GATTER KC. Handbook of immunohistochemistry and in situ hybridisation of human carcinomas: molecular genetics – lung and breast carcinomas. *Br J Cancer.* 2005 Nov 28;93(11):1318. doi: 10.1038/sj.bjc.6602863. Epub 2005 Nov 22. PMCID: PMC3216112.

GAY LJ, FELDING-HABERMANN B. Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2011. doi:10.1038/nrc3004.

GRZELAK CA, GHAJAR CM. Metastasis ‘systems’ biology: how are macro-environmental signals transmitted into microenvironmental cues for disseminated tumor cells? *Curr Opin Cell Biol.* 2017. doi:10.1016/j.ceb.2017.06.002.

HANAHAN D. Hallmarks of cancer-Then and now, and beyond. *Cell.* 2026 Jan 29:S0092-8674(25)01498-9. doi: 10.1016/j.cell.2025.12.049. Epub ahead of print. PMID: 41616779. Disponível em: <https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2825%2901498-9>.

HANAHAN, D. Hallmarks of cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*. (2022) 12 (1): 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.

HARKNESS, JE. *A Practitioner's Guide to Domestic Rodents*. American Animal Hospital Association, 1993.

HOSSEINI H, OBRADOVIC MMS, HOFFMANN M, *et al*. Early dissemination seeds metastasis in breast cancer. *Nature*. 2016. doi:10.1038/nature20785.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Controle do câncer de mama no Brasil: dados e números. 2025. Rio de Janeiro: INCA, 2025. Disponível em: <https://ninho.inca.gov.br/jspui/handle/123456789/17733>.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. Disponível em: <https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2023v69n1.3700>.

JAIN RK. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: A new paradigm for combination therapy. *Nat Med*. 2001. doi:10.1038/nm0901-987.

JOYCE JA, DE VISSER KE. The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth. *Cancer Cell*. 2023 Mar 13;41(3):374-403. doi: 10.1016/j.ccell.2023.02.016. PMID: 36917948.

KARAGIANNIS G.S., POUTAHIDIS T., ERDMAN S.E., KIRSCH R., RIDDELL R.H., DIAMANDIS E.P., Cancer-associated fibroblasts drive the progression of metastasis through both paracrine and mechanical pressure on cancer tissue, *Mol. Cancer Res. MCR* 10 (2012) 1403–1418.

KAUR P, NAGARAJA GM, ZHENG H, GIZACHEW D, GALUKANDE M, KRISHNAN S, ASEA A. A mouse model for triple-negative breast cancer tumor-initiating cells (TNBC-TICs) exhibits similar aggressive phenotype to the human disease. *BMC Cancer*. 2012 Mar 27;12:120. doi: 10.1186/1471-2407-12-120. PMID: 22452810; PMCID: PMC3340297.

LABELLE M, BEGUM S, HYNES RO. Direct Signaling between Platelets and Cancer Cells Induces an Epithelial-Mesenchymal-Like Transition and Promotes Metastasis. *Cancer Cell*. 2011. doi:10.1016/j.ccr.2011.09.009.

LABELLE M, HYNES RO. The initial hours of metastasis: The importance of cooperative host-tumor cell interactions during hematogenous dissemination. *Cancer Discov*. 2012. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0329.

LI Q, LI M, ZHENG K, TANG S, MA S. Expression pattern analysis and drug differential sensitivity of cancer-associated fibroblasts in triple-negative breast cancer. *Transl Oncol*. 2021 Jan;14(1):100891. doi: 10.1016/j.tranon.2020.100891. Epub 2020 Oct 14. PMID: 33069102; PMCID: PMC7563008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33069102/>.

LIMAM I, ABDELKARIM M, EL AYEB M, CREPIN M, MARRAKCHI N, DI BENEDETTO M. Disintegrin-like Protein Strategy to Inhibit Aggressive Triple-Negative Breast Cancer. *Int J Mol Sci*. 2023 Jul 30;24(15):12219. doi: 10.3390/ijms241512219. PMID: 37569595; PMCID: PMC10418936.

LINO RLB et al., Alphavbeta3 integrin blocking inhibits apoptosis and induces autophagy in murine breast tumor cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2019 Dec;1866(12):118536. doi: 10.1016/j.bbamcr.2019.118536.

LOUAULT K., BONNEAUD T., SÉVENO C., GOMEZ-BOUGIE P., NGUYEN F., GAUTIER F., BOURGEOIS N., LOUSSOUARN D., KERDRAON O., BARILLÉ-NION S., Interactions between cancer-associated fibroblasts and tumor cells promote MCL-1 dependency in estrogen receptor-positive breast cancers, *Oncogene* 38 (2019) 3261–3273.

MACK GS, MARSHALL A. Lost in migration. *Nat Biotechnol*. 2010. doi:10.1038/nbt0310-214.

MARTIN, ACBM. Eficácia do [10]-gingerol contra metástases de câncer de mama : estudos in vitro e in vivo em camundongos. São Carlos : UFSCar, 2015. 108 p. Tese. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/server/api/core/bitstreams/a7519f01-3367-4203-a9ad-00c130d7ac42/content>.

MASSAGUÉ J, OBENAU AF. Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature*. 2016. doi:10.1038/nature17038.

MONTENEGRO CF, CASALI BC, LINO RLB, PACHANE BC, SANTOS PK, HORWITZ AR, et al. Inhibition of $\alpha\beta 3$ integrin induces loss of cell directionality of Oral Squamous Carcinoma Cells (OSCC). *PLoS One*. 2017; 12(4):e0176226. doi: 10.1371/journal.pone.0176226.

MONTENEGRO CF, SALLA-PONTES CL, RIBEIRO JU, MACHADO AZ, RAMOS RF, FIGUEIREDO CC, et al. Blocking $\alpha\beta 3$ integrin by a recombinant RGD

disintegrin impairs VEGF signaling in endothelial cells. *Biochimie*. 2012; 94(8):1812–20. doi: 10.1016/j.biochi.2012.04.020.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (US). Guide for the care and use of laboratory animals. 8. ed. Washington, DC: National Academies Press, 2011. DOI: 10.17226/12910.

NERI, D., & BICKNELL, R. (2005). Tumour vascular targeting. *Nature Reviews Cancer*, 5(6), 436-446. <https://doi.org/10.1038/nrc1627>.

NIGHTINGALE, F. Notes on nursing: what it is and what it is not. New York: D. Appleton and Company, 1860. Disponível em: <https://www.digital.library.upenn.edu/women/nightingale/nursing/nursing.html>.

RAMOS OHP, KAUSKOT A, COMINETTI MR, BECHYNE I, SALLA PONTES CL, CHAREYERE F, et al. A novel $\alpha\beta 3$ -blocking disintegrin containing the RGD motive, DisBa-01, inhibits bFGF-induced angiogenesis and melanoma metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 2008; 25(1): 53–64. doi: 10.1007/s10585-007-9101-y.

RANKIN EB, NAM JM, GIACCIA AJ. Hypoxia: Signaling the Metastatic Cascade. *Trends in Cancer*. 2016. doi:10.1016/j.trecan.2016.05.006.

SILVA, T. H. Á. da ., BUTERA, A. P., Leal, D. H. S., & Alves, R. J.. (2007). Agentes antitumorais inibidores da angiogênese: modelos farmacofóricos para inibidores da integrina anb3. *Revista Brasileira De Ciências Farmacêuticas*, 43(1), 1–17. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322007000100002>.

SLOAN, E. K., POULIOT, N., STANLEY, K. L., CHIA, J., MOSELEY, J. M., HARDS, D. K., & ANDERSON, R. L. (2006). Tumor-specific expression of $\alpha\beta 3$ integrin promotes spontaneous metastasis of breast cancer to bone. *Breast Cancer Research*, 8(2), R20. <https://doi.org/10.1186/bcr1398>.

SOUZA, V.O.; GRANDO, J.P.S.; FILHO, J.O.; Tempo decorrido entre o diagnóstico de câncer de mama e o início do tratamento, em pacientes atendidas no Instituto de Câncer de Londrina (ICL). *RBM Rev Bras Med*, 2008. Acesso em: 29 nov. 2017; Disponível em: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=485556&indexSearch=ID>.

TAI, L.; TANASE DE SOUZA, C.; SAHI, S.; ZHANG, J.; ALKAYYAL, A. A.; ANANTH, A. A.; AUER, R. A. A mouse tumor model of surgical stress to explore the

mechanisms of postoperative immunosuppression and evaluate novel perioperative immunotherapies. *Journal of Visualized Experiments*, n. 85, e51253, 2014. DOI: 10.3791/51253.

TAN AA, WONG YL, GOPINATH SCB, KIEW LV, SASIDHARAN S, CHEN Y. Comparative Glycoproteomic Analysis of Mouse 4T1 Breast Cancer Model. *Curr Med Chem*. 2025;32(39):8997-9013. doi: 10.2174/0109298673360978250329065548.

SATO M. et al. Differential Proteome Analysis Identifies TGF- β -Related Pro-Metastatic Proteins in a 4T1 Murine Breast Cancer Model. *PLoS One*. 2015 May 18;10(5):e0126483. doi: 10.1371/journal.pone.0126483.

VLAHAKIS A, DEBNATH J. The Interconnections between Autophagy and Seraya-Bareket. *Integrin-Mediated Cell Adhesion*. *Journal of Molecular Biology*. 2017, 429: 515–30. doi: 10.1016/j.jmb.2016.11.027.

WELCH DR, HURST DR. Defining the Hallmarks of Metastasis. *Cancer Res*. 2019 Jun 15;79(12):3011-3027. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-0458. Epub 2019 May 3. PMID: 31053634; PMCID: PMC6571042.

WIEMERS TC, FERLE M, ADER J, SOTIKOVA V, FANDREI D, GRIEB N, FISCHER L, BORN P, WEIDNER H, WANG SY, JENTZSCH M, FRANKE GN, HERLING C, METZELER K, HERLING M, HEYN S, DENECKE T, REICHE K, PLATZBECKER U, VUCINIC V, NEUMUTH T, MEYER HJ, MERZ M. Prognostic Implications of Splenomegaly in BCMA-Directed CAR T-Cell Therapy for Relapsed Myeloma. *Transplant Cell Ther*. 2025 Oct;31(10):789-803. doi: 10.1016/j.jtct.2025.07.003. Epub 2025 Jul 16. PMID: 40680848.

YEUNG KT, YANG J. Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis. *Mol Oncol*. 2017. doi:10.1002/1878-0261.12017.

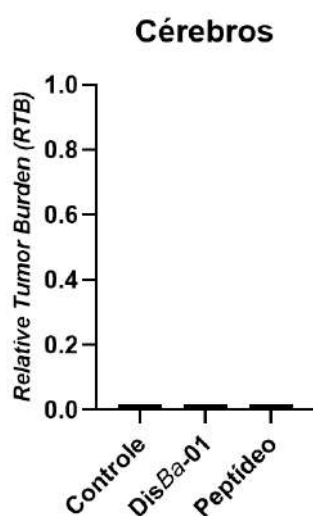
ZHOU J., WANG X.H., ZHAO Y.X., CHEN C., XU X.Y., SUN Q., WU H.Y., CHEN M., SANG J.F., SU L., TANG X.Q., SHI X.B., ZHANG Y., YU Q., YAO Y.Z., ZHANG W.J., Cancer-associated fibroblasts correlate with tumor-associated macrophages infiltration and lymphatic metastasis in triple negative breast cancer patients, *J. Cancer* 9 (2018) 4635–4641.

ANEXO I

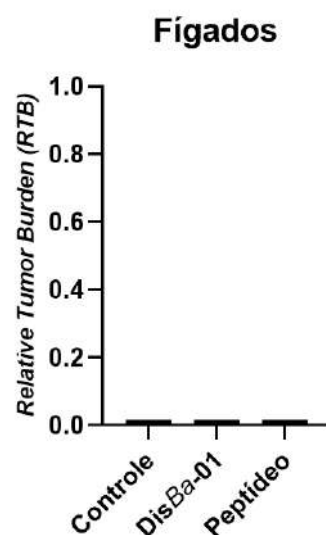
Após a realização das análises por qPCR *real time*, as imagens foram geradas com a utilização dos valores de *Ct mean* obtidos com o procedimento. Segue abaixo as demais imagens não expostas ao longo da monografia por não apresentarem diferença estatística e/ou não apresentaram *Ct mean* de expressão do gene de interesse (*mCherry*).

1) Imagens gráficos do Experimento de Metástase Espontâneo Não Cirúrgico:

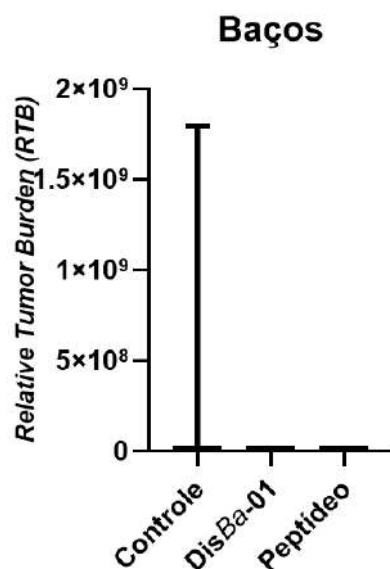
→ Cérebros:



→ Fígados:

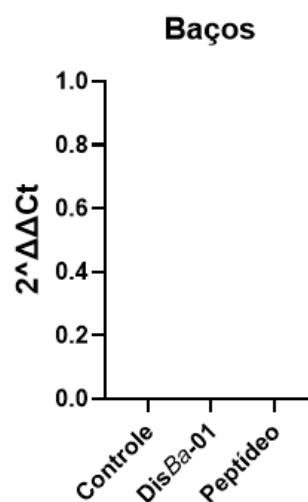
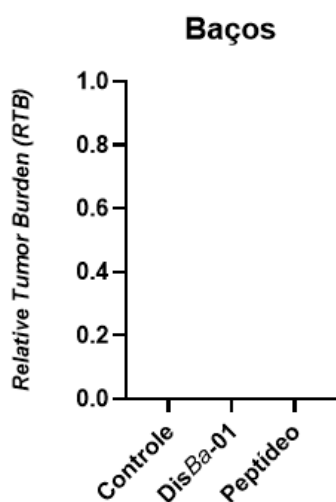


→ Baços:



2) Imagens dos Gráficos de PCR do Experimento de Metástase Espontânea com Cirurgia:

→ Baços:



→ Fígados:

