

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

**ANA CAROLINA WOORD**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM  
MODELO DE TUMOR DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO  
A PARTIR DE CÉLULAS 4T1 EM CAMUNDONGOS  
BALB/C**

**SÃO CARLOS -SP  
2024**

ANA CAROLINA WOORD

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM  
MODELO DE TUMOR DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO A  
PARTIR DE CÉLULAS 4T1 EM CAMUNDONGOS BALB/C**

Trabalho de conclusão de curso apresentado  
à Universidade Federal de São Carlos, para  
obtenção do título de bacharel em Ciências  
Biológicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Heloísa Sobreiro  
Selistre de Araújo

São Carlos-SP  
2024

Dedico este trabalho a minha família, em especial aos meus pais e avós, por todo o amor, apoio e carinho durante toda essa jornada. Muito obrigada por tanto.

## **AGRADECIMENTO**

Agradeço imensamente aos meus pais, que sempre acreditaram no meu potencial, me deram apoio e nunca deixaram com que eu perdesse o encanto pela vida durante toda a minha trajetória. Sei que palavras nunca serão o suficiente para expressar minha profunda admiração e agradecimento por todo o amor, carinho e cuidado que vocês me deram. Obrigada por me ensinarem que a educação é transformadora e, o amor, acolhedor.

Agradeço aos meus avós que sempre estiveram ao meu lado, auxiliando no meu crescimento pessoal e espiritual. Obrigada por todo amor e cuidado. Também ao meu Malibu, por ser meu companheirinho e apoio emocional durante esses últimos 17 maravilhosos meses.

Agradeço também aos meus amigos que conheci e que me acompanharam durante a trajetória acadêmica fazendo com que os anos dedicados à universidade se tornassem mais leves e mais alegres. Em especial, agradeço aos meus amigos Mariannah, Barbara e Julio que, desde o início estiveram presentes nessa jornada.

Agradeço também aos meus amigos de infância, que seguem me mostrando que a amizade verdadeira é persistente e duradoura. Em especial as minhas amigas Amanda, Iara, Thaís e Ana Bia. Agradeço também a todas as novas amigas e pessoas que cruzaram meu caminho e deixaram boas memórias.

Sou grata às pessoas que cuidaram de mim no quesito emocional e psicológico durante períodos difíceis, especialmente Dani e Alceu.

Agradeço à minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Heloisa - carinhosamente, Helô – por ter aceitado fazer parte da minha formação acadêmica, me incluindo em seu excelente grupo de pesquisa do Laboratório Multidisciplinar de Bioquímica e Biologia Molecular (LMBBM), onde pude conhecer profissionais incríveis. Agradeço aos meus colegas de laboratório por todo o auxílio e conhecimento compartilhado, em especial à Aline, Bianca, Grazi, Paulo, Gabi e Lívia. Agradeço também à Irene, mais conhecida como Bete, por alegrar nossos dias no laboratório.

Agradeço a todos os colaboradores que estiveram presentes no decorrer desse trabalho, em especial à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cynthia Aparecida de Castro e ao técnico Paulo do Departamento de Morfologia e Patologia, à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nathalia e à Dr<sup>a</sup>. Lilian Tan Moriyama do Instituto de Física de São Carlos e à Mirian, também do

Laboratório de Biofotônica do Grupo de Óptica do Instituto de Física de São Carlos.

Agradeço aos integrantes da banca, composta por pessoas que admiro muito, por ter disponibilizado seu tempo nessa etapa final que tem um grande significado simbólico para mim.

Agradeço ao CNPq por ter concedido minha primeira bolsa de iniciação científica e à FAPESP pela concessão da bolsa de iniciação científica atual, dentro da qual foi desenvolvida parte do presente projeto.

Você não pode esperar construir um mundo melhor sem melhorar os indivíduos. Para esse fim, cada um de nós deve trabalhar para o seu próprio aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, compartilhar uma responsabilidade geral por toda a humanidade.

- Marie Curie

## RESUMO

O câncer de mama é a doença que mais afeta mulheres no Brasil, sendo também o câncer com maior índice de óbito entre as mulheres brasileiras. O câncer apresenta grande heterogeneidade, tanto no que diz respeito às características intrínsecas de cada tipo e subtipo, quanto às influências sofridas pelo microambiente tumoral e respostas individuais de cada órgão e/ou indivíduo. O processo de desenvolvimento tumoral, denominado carcinogênese, envolve uma série de alterações celulares genéticas e epigenéticas, que levam ao crescimento e proliferação celular descontrolada. Nos tumores malignos, a indiferenciação celular, bem como sua perda de função e ausência de delimitações claras são características relacionadas à invasão de tecidos adjacentes e à ocorrência de metástases. O processo metastático consiste na dispersão de células tumorais do sítio primário, culminando com a colonização de um sítio para desenvolvimento tumoral secundário. Esse processo envolve uma cascata de eventos que vai desde a perda de adesão das células cancerosas do tumor primário até a colonização de um novo tecido. A angiogênese, que consiste na formação de novos vasos sanguíneos para suprir o tumor com nutrientes e oxigênio, é fortemente estimulada quando o crescimento tumoral atinge proporções que geram regiões de hipóxia, e também contribui para facilitar a dispersão das células tumorais através da corrente sanguínea. Dentre os subtipos de câncer de mama, o triplo-negativo (TNBC) destaca-se pela ausência de receptores ER, PR e HER2, sendo considerado um dos mais agressivos e com pior prognóstico. O presente trabalho objetivou o desenvolvimento de um modelo animal para caracterização de tumor de mama triplo-negativo originado a partir de células 4T1 em camundongos BALB/c. Com o desenvolvimento desse modelo, foi possível identificar os comportamentos celulares durante a etapa de cultivo, bem como a progressão tumoral primária nos animais, ocorrência de metástases e as características histopatológicas dos tumores.

**Palavras-chave:** Câncer de mama; TNBC; 4T1; Metástase; Modelo experimental *in vivo*

## ABSTRACT

Breast cancer is the most prevalent disease affecting women in Brazil and it is also the type of cancer with the highest mortality rate among Brazilian women. Cancer exhibits significant heterogeneity, both in terms of the intrinsic characteristics of each type and subtype, as well as the influences exerted by the tumor microenvironment and individual responses of each organ and/or individual. The process of tumor development, called carcinogenesis, involves a series of genetic and epigenetic cellular alterations that lead to uncontrolled cell growth and proliferation. In malignant tumors, cellular dedifferentiation, as well as the loss of function and the absence of clear boundaries, are characteristics related to the invasion of adjacent tissues and the occurrence of metastases. The metastatic process consists of the spread of tumor cells from the primary site, culminating in the colonization of a site for secondary tumor development. This process involves a cascade of events, from the loss of adhesion of cancer cells from the primary tumor to the colonization of a new tissue. Angiogenesis, which is the formation of new blood vessels to supply the tumor with nutrients and oxygen, is strongly stimulated when tumor growth reaches proportions that generate hypoxic regions, and it also facilitates the spread of tumor cells through the bloodstream. Among the subtypes of breast cancer, triple-negative breast cancer (TNBC) stands out due to the absence of ER, PR, and HER2 receptors, being considered one of the most aggressive types with the poorest prognosis. The present study aimed to develop an animal model to characterize triple-negative breast cancer originating from 4T1 cells in BALB/c mice. Through the development of this model, it was possible to identify cellular behaviors during the cultivation stage, as well as the primary tumor progression in animals, occurrence of metastases, and the histopathological characteristics of the tumors.

**Keywords:** Breast cancer; TNBC; 4T1; Metastasis; In vivo experimental model

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - Marcas registradas do desenvolvimento do câncer              | 14 |
| Figura 2 - Subtipos de câncer de mama                                   | 16 |
| Figura 3 - Etapas da metástase: cascata de eventos metastáticos         | 18 |
| Figura 4 - Principais sítios metastáticos no câncer de mama             | 19 |
| Figura 5 - Componentes do microambiente tumoral                         | 22 |
| Figura 6 - Desenho experimental do Modelo <i>in vivo</i>                | 28 |
| Figura 7 - 4T1 em cultivo em média e alta confluência                   | 30 |
| Figura 8 - Imagens do tumor primário in situ                            | 39 |
| Figura 9 - Imagens do tumor primário ex situ                            | 39 |
| Figura 10 - Possíveis metástases encontradas                            | 40 |
| Figura 11 - Regiões dos cortes tumorais corados em HE                   | 42 |
| Figura 12 - Mitose                                                      | 43 |
| Figura 13 - Regiões dos cortes tumorais corados em Tricrômico de Masson | 43 |

## LISTA DE GRÁFICOS

|                                                          |    |
|----------------------------------------------------------|----|
| Gráfico 1 - Ensaio de migração transwell 4T1             | 32 |
| Gráfico 2 - Evolução da massa corporal                   | 33 |
| Gráfico 3 - Evolução da média da massa corporal          | 34 |
| Gráfico 4 - Evolução do tamanho tumoral                  | 35 |
| Gráfico 5 - Evolução da média do tamanho tumoral         | 36 |
| Gráfico 6 - Relação entre massa tumoral e massa corporal | 38 |

## **LISTA DE ABREVIACÕES**

|                 |                                                           |
|-----------------|-----------------------------------------------------------|
| BL1/BL2         | Tipo basal 1 / Tipo basal 2                               |
| CAFs            | Fibroblastos associados ao câncer                         |
| CK 5/6          | Citoqueratinas 5/6                                        |
| CO <sub>2</sub> | Dióxido de carbono                                        |
| CSC             | Células-tronco cancerígenas                               |
| CTCs            | Células tumorais circulantes                              |
| DAPI            | 4',6-Diamidino-2-fenilindol                               |
| DisBa-01        | Desintegrina de <i>Bothrops alternatus</i>                |
| DMSO            | Dimetilsulfoxido                                          |
| DNA             | Ácido desoxirribonucleico                                 |
| ECM             | Matriz extracelular                                       |
| EDTA            | Ácido etilenodiamino tetra-acético                        |
| EGFR1           | Receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 1 |
| EMT             | Transição epitélio-mesenquimal                            |
| ER              | Receptor de estrogênio                                    |
| HER2            | Receptor do fator de crescimento epitelial humano 2       |
| HIF-1           | Fator induzido por hipóxia 1                              |
| IGF-1R          | Receptor do fator de crescimento 1 semelhante à insulina  |
| IM              | Imunomodulatório                                          |
| ITGB3           | Gene codificador da Integrina beta 3                      |
| LAR             | Receptor de andrógeno luminal                             |
| MES             | Mesenquimal                                               |
| MET             | Transição mesenquimal-epitelial                           |
| O <sub>2</sub>  | Oxigênio                                                  |
| PBS             | Tampão fosfato-salino                                     |
| PR              | Receptor de progesterona                                  |
| RGD             | Arginina, Glicina, Ácido aspártico                        |
| RPMI-1640       | Meio de cultivo Roswell Park Memorial Institute           |
| SFB             | Soro fetal bovino                                         |
| TGF-β           | Fator de crescimento transformador beta                   |
| TME             | Microambiente tumoral                                     |
| TNBC            | Câncer de mama triplo-negativo                            |
| VEGF            | Fator de crescimento endotelial vascular                  |
| VEGFR           | Receptor do fator de crescimento endotelial vascular      |

## SUMÁRIO

|                                                                                                   |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>                                                                              | <b>13</b> |
| 1.1 CÂNCER                                                                                        | 13        |
| 1.1.1 Subtipos de câncer de mama                                                                  | 14        |
| 1.2 METÁSTASE                                                                                     | 16        |
| 1.3 MICROAMBIENTE TUMORAL                                                                         | 20        |
| 1.4 ANGIOGÊNESE                                                                                   | 22        |
| 1.5 INTEGRINAS                                                                                    | 23        |
| <br>                                                                                              |           |
| <b>2. OBJETIVOS</b>                                                                               | <b>25</b> |
| 2.1 OBJETIVO GERAL                                                                                | 25        |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS                                                                         | 25        |
| <br>                                                                                              |           |
| <b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>                                                                     | <b>25</b> |
| 3.1 CULTIVO CELULAR                                                                               | 25        |
| 3.2 ENSAIO DE MIGRAÇÃO TRANSWELL                                                                  | 26        |
| 3.3 MODELO ORTOTÓPICO DE FORMAÇÃO DE METÁSTASE ESPONTÂNEA POR IMFP (INTRAMAMMARY FAT PAD) IN VIVO | 27        |
| 3.4 HISTOLOGIA                                                                                    | 28        |
| <br>                                                                                              |           |
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                                                                  | <b>29</b> |
| 4.1 CULTIVO CELULAR                                                                               | 29        |
| 4.2 ENSAIO DE MIGRAÇÃO TRANSWELL                                                                  | 31        |
| 4.3 MODELO ORTOTÓPICO DE FORMAÇÃO DE METÁSTASE ESPONTÂNEA POR IMFP (INTRAMAMMARY FAT PAD) IN VIVO | 32        |
| 4.4 HISTOLOGIA                                                                                    | 40        |
| <br>                                                                                              |           |
| <b>5. CONCLUSÃO</b>                                                                               | <b>45</b> |
| <br>                                                                                              |           |
| <b>REFERÊNCIAS</b>                                                                                | <b>46</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 O CÂNCER

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças que se caracterizam pelo crescimento e proliferação celular descontrolada, gerando a formação de um tumor primário que, ao passar pelo processo de metástase, pode causar danos aos órgãos adjacentes ou distantes (INCA, 2022). A carcinogênese (ou oncogênese), refere-se a todo o processo de formação tumoral, que se inicia a partir de uma mutação genética, principalmente com a ativação de genes denominados proto-oncogenes que, ao sofrerem efeito de agentes oncopromotores, passam a se desenvolver de forma maligna até atingirem o estágio de progressão, no qual surgem os primeiros sintomas clínicos (INCA, 2022).

Alterações genéticas e epigenéticas que desregulam mecanismos de controle celular, culminando na quebra da homeostase, também influenciam no potencial de resistência de uma neoplasia a determinados tipos de tratamentos (BAU et al., 2006; CHATTERJEE; MCCAFFREY, 2014; LIU et al., 2015; MBEUNKUI; JOHANN, 2009).

De acordo com dados disponibilizados pela OMS (Organização Mundial da Saúde), somente no ano de 2022, cerca de 2,3 milhões de mulheres ao redor do mundo foram diagnosticadas com câncer de mama, com aproximadamente 670.000 óbitos em decorrência da doença. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), a estimativa de novos casos de câncer de mama no ano de 2023 ultrapassou 73.000, sendo a neoplasia que mais afeta mulheres no Brasil. Além disso, a doença foi responsável por 18.139 óbitos registrados apenas no ano de 2021.

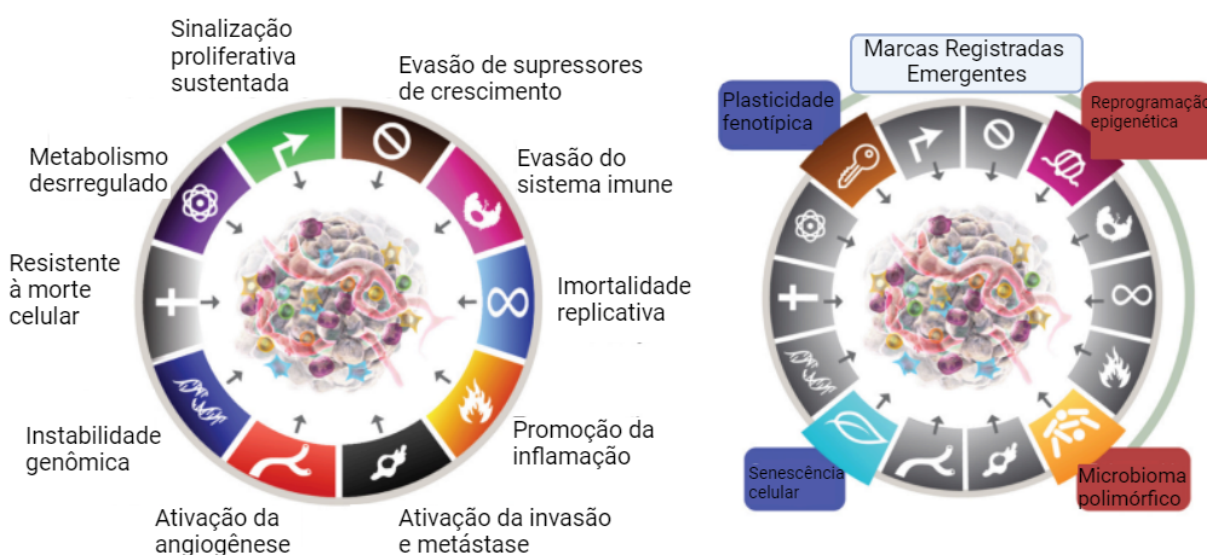
As células tumorigênicas são caracterizadas pela perda da capacidade de se diferenciarem completamente, além de serem geneticamente instáveis e não dependerem de ancoragem para continuarem viáveis (WELCH; HURST, 2019). As células que constituem um tumor são geneticamente heterogêneas entre si, variando em morfologia e em sua bioquímica (HUNTER, KENT W et al., 2018; WELCH, 2016).

Os diferentes comportamentos adquiridos pelas células tumorais também variam de acordo com alterações epigenéticas, que levam a modificações químicas transitórias do material genético em resposta a estímulos do microambiente tumoral,

como disponibilidade de O<sub>2</sub>, pH, fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, entre outros. A obtenção de energia pelas células cancerosas ocorre predominantemente pela via metabólica da glicólise anaeróbica, mesmo na presença de oxigênio, fator conhecido como efeito de Warburg (Warburg, 1956).

Uma das principais características indicadoras da natureza maligna de uma massa tumoral é a aptidão de um subconjunto celular neoplásico de se desprender do tumor primário, atravessar a membrana basal e invadir tecidos secundários para darem origem a metástases (WELCH; HURST, 2019). Merriam-Webster definiu “hallmark” como sendo uma característica ou traço distintivo para que determinado processo ocorra. A figura 1, adaptada de de HANAHAHAN, D., Hallmarks of Cancer: New Dimensions, ilustra as características observadas no desenvolvimento cancerígeno.

Figura 1: Marcas registradas do desenvolvimento do câncer



Fonte: Adaptado de HANAHAHAN, D., Hallmarks of Cancer: New Dimensions, 2022.

### 1.1.1 SUBTIPOS DE CÂNCER DE MAMA

Para classificação dos subtipos de tumores de mama, é comum a utilização de características moleculares, como a presença ou ausência de determinados receptores hormonais e de fatores de crescimento. Os subtipos clássicos de câncer de mama, classificados molecularmente por meio do sistema de classificação

PAM50, são: i) luminal A, ii) luminal B, iii) enriquecido com HER2, iv) basal e v) normal – like (MARTIN et al., 2021).

O subtipo luminal A é caracterizado pela ausência de receptores HER2 e presença de receptores hormonais de estrogênio, progesterona ou ambos. Além disso, o baixo índice de proliferação celular é evidenciado pela baixa expressão do marcador Ki-67, mantendo-se, geralmente, inferior a 20% (ORRANTIA-BORUNDA et al., 2022). No luminal B, a alta expressão do marcador Ki-67 indica uma alta taxa de proliferação celular, sendo um subtipo mais agressivo e com pior prognóstico quando comparado ao luminal A (ORRANTIA-BORUNDA et al., 2022). Esse subtipo pode ou não apresentar receptores HER2, sendo que nos casos de HER2+, apresentam também receptores de progesterona, ausentes ou baixos nos casos de HER2-. Em ambas as situações, o receptor de estrogênio está presente (GOLDHIRSCH et al., 2013). O índice do marcador Ki-67 no subtipo luminal B é variável e superior a 20% na maioria dos casos (ORRANTIA-BORUNDA et al., 2022). O subtipo HER2 se caracteriza pela presença e superexpressão desse receptor, responsável por um aumento no crescimento celular, contudo, a presença de receptores hormonais, como ER e PR, pode variar (ORRANTIA-BORUNDA et al., 2022).

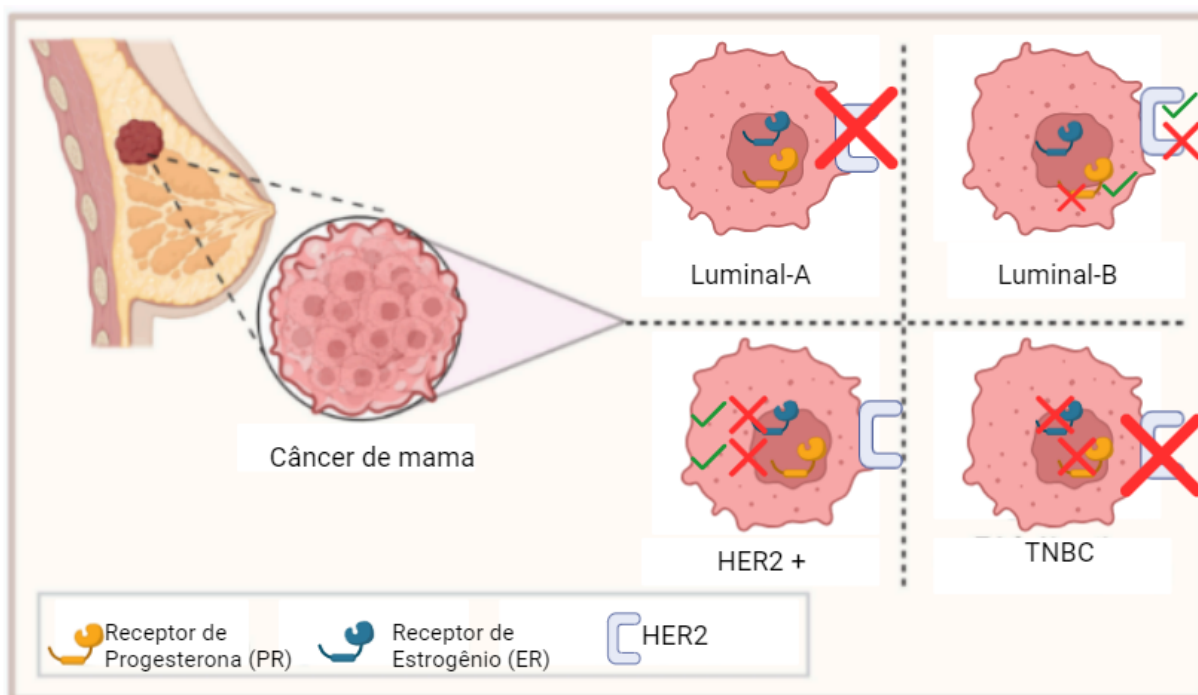
Os subtipos caracterizados pela ausência dos receptores ER, PR e HER2 são denominados triplo-negativos (TNBC) (FOULKES; SMITH; REIS-FILHO, 2010). Algumas subclassificações do TNBC, baseadas em componentes moleculares, incluem o tipo basal (BL1 e BL2), “claudin-low”, mesenquimal (MES), receptor de andrógeno luminal (LAR) e imunomodulatório (IM), sendo os basais os mais frequentes (YIN et al., 2020). Em relação aos demais subtipos, o TNBC apresenta aumento da instabilidade genômica, com alterações em genes de reparo de DNA e alta capacidade proliferativa (ORRANTIA-BORUNDA et al., 2022).

Em termos histológicos, é uma neoplasia com células pobremente diferenciadas e alta heterogeneidade (DERAKHSHAN; REIS-FILHO, 2022). Já em termos imunohistoquímicos, o TNBC pode ser subdividido em basal, quando expressa citoqueratinas (CK)5/6 e EGFR1 (receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 1), e não basal, quando não expressa citoqueratinas CK5/6 (ORRANTIA-BORUNDA et al., 2022). No subtipo com baixa expressão de claudinas (Claudin-low Subtype), além da ausência de marcadores de diferenciação luminal e aumento da transição epitélio mesenquimal, a expressão de marcadores típicos de

células-tronco cancerígenas (CSC, em inglês) no desenvolvimento desse subtipo tumoral é uma característica notável (TURNER et al., 2021).

O câncer de mama triplo-negativo é reconhecido pela sua elevada agressividade, alta taxa de reincidência precoce e maior tendência de apresentar estágios avançados. Além disso, é mais comumente observado em mulheres jovens (ORRANTIA-BORUNDA et al., 2022).

Figura 2: Subtipos de câncer de mama



Fonte: Adaptado pela própria autora, por meio do BioRender, de Kirkby, M.; Popatia, A.M.; Lavoie, J.R.; Wang, L. The Potential of Hormonal Therapies for Treatment of Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers* 2023

## 1.2 METÁSTASE

A principal causa de morte decorrente do câncer de mama está associada a sua capacidade de produzir metástases (ALIZADEH; SHIRI; FARSINEJAD, 2014). Segundo a American Cancer Society (Treating Breast Cancer, American Cancer Society, 2021), os locais mais comuns para os quais os diferentes tipos de câncer de mama se espalham são os ossos, fígado e pulmão, mas também podem atingir outros órgãos, como cérebro.

A metástase é um processo definido pela disseminação tumoral, a partir de um tumor primário, para um sítio secundário. Esse processo se inicia com a

formação de subpopulações celulares com características específicas que conferem a elas as capacidades necessárias para completarem, com êxito, o processo metastático. Essas subpopulações surgem a partir de pressões seletivas tanto do microambiente tumoral, da competição entre as próprias células tumorais, quanto da resposta do hospedeiro (WELCH; HURST, 2019).

O processo metastático pode ser subdividido em etapas que resumem as principais características para seu sucesso. A primeira etapa, conhecida como invasão, tem como mecanismo chave a Transição Epitelial-Mesenquimal (EMT: *Epithelial-Mesenchymal Transition*), que consiste em alterações fenotípicas epiteliais sofridas por células tumorais marginais, que promovem o aumento de sua mobilidade (CATALANO et al., 2013). Essa transição é pertinente ao processo de metástase devido a maior propensão das células com fenótipos mesenquimais de iniciarem o processo de invasão (MAJIDPOOR; MORTEZAEI, 2021). O fenótipo celular mesenquimal é representado pela perda da proteína de adesão E-caderina nas junções aderentes e pela substituição da queratina pela vimentina como principal constituinte dos filamentos intermediários. A reversão desse fenótipo, denominada transição mesenquimal-epitelial (MET), é importante para que a capacidade proliferativa seja retomada, possibilitando a colonização do novo sítio metastático pelas células tumorais (HIROHASHI, 1998; WELCH; HURST, 2019).

Posteriormente, inicia-se a etapa de dispersão, sendo chamada de intravasamento quando se dá por meio da corrente sanguínea. Esse é um processo complexo que envolve fatores intrínsecos e extrínsecos, sendo facilitada pela permeabilidade anormal da vasculatura nesse contexto metastático (MAJIDPOOR; MORTEZAEI, 2021). Essa permeabilidade é influenciada pela produção de fatores de crescimento vascular endotelial (VEGF) pelas células tumorais. Dale Coman, Irving Zeidman e colegas descreveram um mecanismo de intravasamento passivo, na qual a multiplicação das células e a expansão progressiva do tumor fariam com que as células à margem da massa tumoral seriam forçadas para atravessarem a barreira endotelial e atingirem a corrente sanguínea (ERDOGAN et al., 2017; WELCH; HURST, 2019)

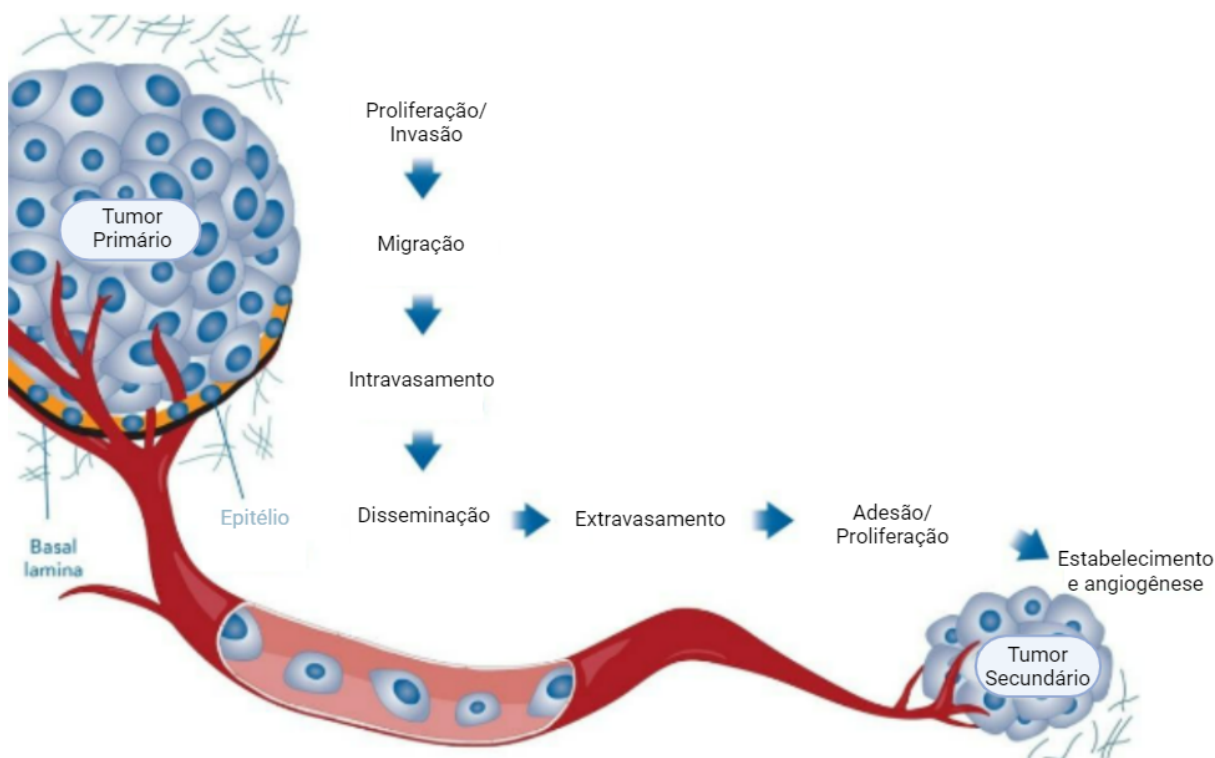
Após o intravasamento, as células tumorais precisam sobreviver na corrente sanguínea até seu extravasamento para o novo sítio de colonização. As células tumorais circulantes (CTCs) dependem de estratégias para evitar a morte por *anoikis* (do grego: an-sem; oikos-casa), um tipo de morte celular programada que ocorre

após o desprendimento da célula da matriz extracelular (ECM). Para isso, a sinalização por TGF- $\beta$  (fator de crescimento transformador beta) auxilia na manutenção do estado transicional epitélio-mesenquimal das CTCs, tornando-as mais resistentes à morte celular devido ao fenótipo mesenquimal. Além disso, a modulação da forma de obtenção de energia contribui para a sobrevivência das CTCs, que apresentam maior prevalência da via metabólica de fosforilação oxidativa em relação à glicólise (*MAJIDPOOR; MORTEZAEI, 2021*). A cooptação entre os sistemas linfático e sanguíneo também é uma estratégia para maximizar a eficiência do transporte das CTCs até que atinjam um novo sítio para a formação do tumor secundário. Para isso, é necessário que elas resistam tanto aos estresses mecânicos quanto ao sistema imune.

Acredita-se que a tendência das células tumorais ao organotropismo seletivo se deve a presença de marcadores endoteliais específicos presentes nas células endoteliais de cada tecido (*ALBY; AUERBACH, 1984; BELLONI; NICOLSON, 1988*). O reconhecimento desses marcadores pelas células tumorais promove sua aderência ao endotélio para posterior extravasamento (*PASQUALINI; ARAP; McDONALD, 2002; PASQUALINI; RUOSLAHTI, 1996*). Essa aderência pode ser ainda mais efetiva em locais onde há inflamação ativa (*GREENWELL et al., 2020*). Após a saída das células tumorais através dos vasos sanguíneos até o parênquima de um órgão, processo chamado de extravasamento, inicia-se a etapa de colonização. Nessa etapa, as condições necessárias para o estabelecimento de uma massa tumoral metastática se assemelham às mesmas para a formação do tumor primário, sendo que progenitores de medula óssea VEGFR+ são considerados elementos de suporte para essa condição (*KAPLAN et al., 2005; WELCH; HURST, 2019*).

Apesar do processo metastático incluir diversas etapas, cinco características são essenciais para o sucesso da formação de um foco tumoral secundário a partir de um tumor primário: 1) Motilidade; 2) Invasão; 3) Plasticidade; 4) Modulação do microambiente tumoral e; 5) Capacidade de colonização de tecidos secundários (*WELCH; HURST, 2019*).

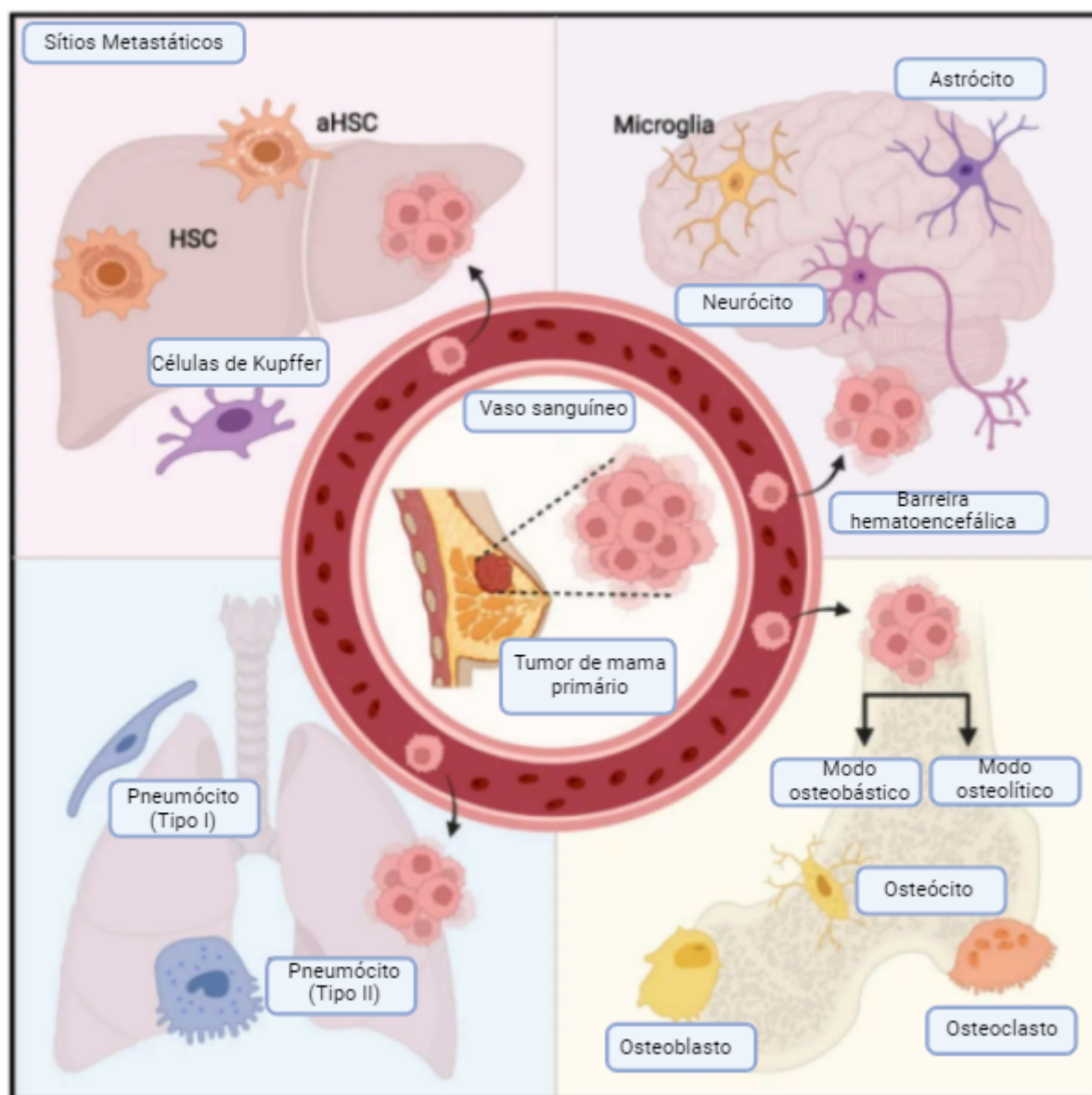
Figura 3: Etapas da metástase: cascata de eventos metastáticos



Fonte: Adaptado de Bio-Techne, 2024.

No caso do câncer de mama, o osso é o local mais observado para metástase, que pode ocorrer também para o tecido pulmonar, hepático e cerebral (Xu, J., Gao, F., Liu, W. et al., 2024). A hipótese “semente - solo” (*seed and soil hypothesis*), proposta por Stephen Paget, busca explicar melhor o motivo pelo qual isso acontece. Na hipótese de Paget (1889), as células tumorais são comparadas a sementes, que só seriam capazes de se desenvolverem adequadamente em um microambiente receptor adequado, comparado ao solo específico. Ou seja, o local da metástase seria resultado da interação preferencial entre as células tumorais e o ambiente específico do tecido receptor, não sendo, portanto, aleatória. A natureza dessas interações pode variar desde a secreção de fatores de crescimento e sinalização molecular de citocinas e quimiocinas pelo órgão receptor, até o nível de vascularização apresentado por ele. Além disso, a expressão de determinadas moléculas de adesão, como as integrinas, pelas células do tecido secundário (WELCH; HURST, 2019).

Figura 4: Principais sítios metastáticos no câncer de mama



Fonte: Adaptado de Xu, J., Gao, F., Liu, W. et al., 2024.

### 1.3 O MICROAMBIENTE TUMORAL

Nos últimos anos, a compreensão da biologia tumoral avançou significativamente, revelando a complexidade do microambiente tumoral (TME). O TME é composto por uma variedade de células não tumorais, como fibroblastos, células endoteliais e diversas células do sistema imunológico, que interagem de maneira dinâmica com as células tumorais e desempenham um papel crucial na progressão do câncer (HANAHAHAN et al., 2012).

As células cancerosas são capazes de modificar o TME por meio da secreção de citocinas, quimiocinas e outros fatores, que reprogramam as células ao

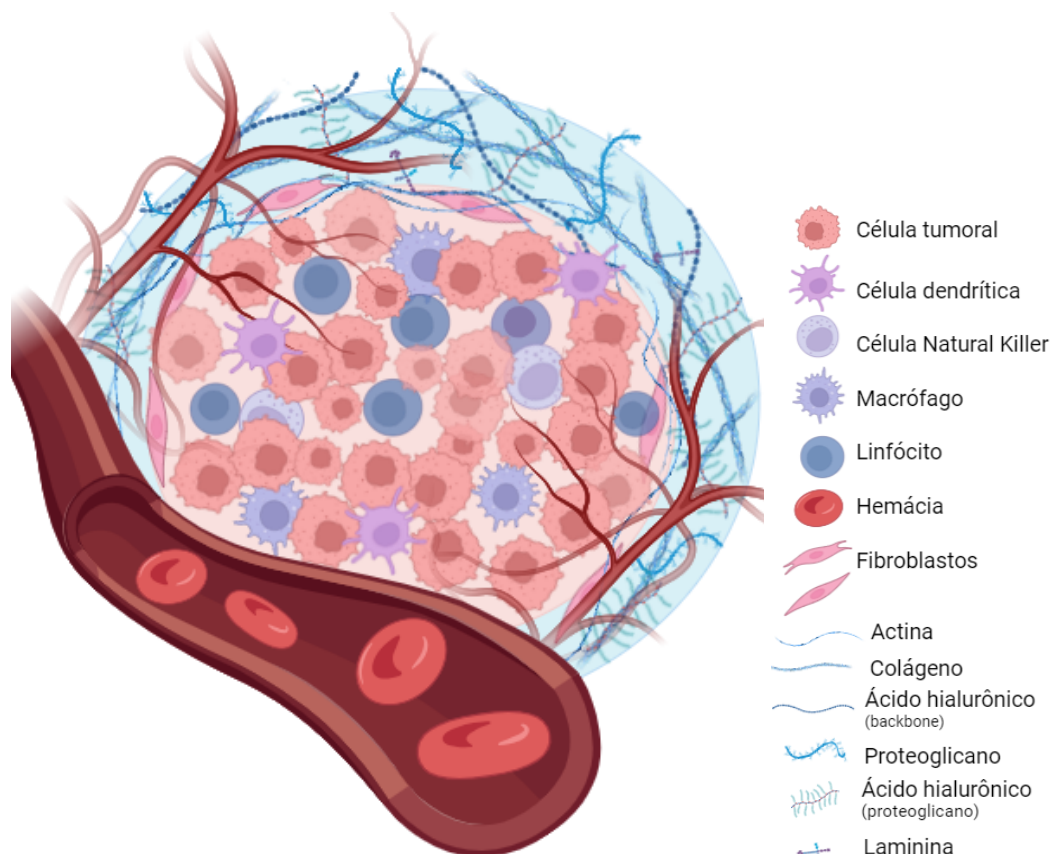
redor, transformando-as em colaboradoras no processo tumoral (BALKWILL; CAPASSO; HAGEMANN, 2012). Essas interações entre células tumorais e o microambiente influenciam diretamente a sobrevivência, crescimento, invasão e metástase do tumor. Além disso, componentes do TME, como a matriz extracelular (ECM), fornecem suporte estrutural e bioquímico, influenciando a adesão, proliferação e migração celular, desempenhando um papel essencial no desenvolvimento do câncer.

O papel do sistema imunológico dentro do TME tem ganhado destaque, uma vez que células imunológicas, inicialmente recrutadas para combater o tumor, podem ser reprogramadas para apoiar o crescimento tumoral. Macrófagos, neutrófilos e células T, por exemplo, podem promover a proliferação das células cancerosas e facilitar sua disseminação, enquanto fibroblastos associados ao câncer (CAF) contribuem para a remodelação do estroma, auxiliando na invasão e metástase (HINSHAW; SHEVDE, 2019; ARNETH, 2019).

A matriz extracelular, composta por proteínas como colágeno, glicoproteínas e proteoglicanos, também desempenha um papel fundamental na regulação da sinalização celular. A rigidez e composição da ECM têm sido associadas ao aumento do risco de desenvolvimento de carcinoma, especialmente no câncer de mama, onde áreas de alta densidade tecidual são mais propensas à formação de tumores. Estudos mostram que a deposição aumentada de colágeno no estroma está correlacionada com a progressão tumoral e com a maior agressividade da doença (DE VISSER; JOYCE, 2023).

Dessa forma, compreender as interações entre as células tumorais e os diversos componentes do TME, bem como seus respectivos mecanismos de ação, é crucial para o desenvolvimento de terapias mais eficazes no combate ao câncer. Ao focar em componentes do microambiente tumoral como alvos terapêuticos, modificando o ambiente no qual o tumor está inserido, possibilita um potencial aumento das chances de resultados clínicos positivos para os pacientes.

Figura 5: Componentes do microambiente tumoral



Fonte: autoria própria. Criada através do BioRender, 2024.

## 1.4 ANGIOGÊNESE

Um dos processos críticos para o desenvolvimento tumoral é a angiogênese, nome dado ao processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes (FOLKMAN, 1971). Esse processo, que é rigorosamente regulado em tecidos normais para garantir a reparação tecidual e o desenvolvimento, torna-se desregulado no contexto do câncer de mama, contribuindo para a proliferação descontrolada das células tumorais (HANAHA; FOLKMAN, 1996). No microambiente tumoral, a angiogênese é promovida por uma série de fatores de crescimento e citocinas, que asseguram um fornecimento contínuo de nutrientes e oxigênio para o tumor (FERRARA; KERBEL, 2005).

O crescimento tumoral e a angiogênese apresentam uma relação interdependente, pois, à medida que o tumor cresce, ele supera sua oferta de sangue existente, criando áreas de hipóxia, que, por sua vez, estimulam a liberação de fatores angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (BERGERS; HANAHA, 2008; CARMELIET, 2005). Essa interação entre

crescimento tumoral, hipóxia e angiogênese, além de sustentar o crescimento tumoral também facilita a disseminação metastática das células cancerosas (JAIN, 2005).

No contexto do TNBC, a regulação da angiogênese é ainda mais complexa devido à presença de altos níveis do fator induzido por hipóxia 1-alfa (HIF-1 $\alpha$ ), que é responsável pela adaptação das células tumorais às condições de baixa oxigenação (BRIGGS et al., 2016). O HIF-1 $\alpha$ , frequentemente superexpresso no TNBC, atua promovendo a transcrição de genes angiogênicos, como o VEGF, além de recrutar células progenitoras endoteliais, intensificando ainda mais a formação de novos vasos. A superexpressão de HIF-1 $\alpha$  em TNBC está associada a mutações em genes supressores tumorais, como p53 e PTEN, e à superexpressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), todos contribuintes para a agressividade desse subtipo de câncer (DE HEER; JALVING; HARRIS, 2020; CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2012).

Dessa forma, entender os mecanismos moleculares que regulam o processo angiogênico no contexto do câncer de mama, especialmente no TNBC, é essencial para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que possam interromper o fornecimento sanguíneo ao tumor, limitando seu crescimento e potencial metastático.

## **1.5 INTEGRINAS**

Dentre os diversos fatores que contribuem para a progressão tumoral e a disseminação metastática, as integrinas desempenham um papel crucial. As integrinas são uma família de receptores transmembranares que medeiam a adesão celular à matriz extracelular e a outros tipos celulares, sendo essenciais não apenas para a manutenção da integridade estrutural dos tecidos, mas também para a regulação de processos celulares críticos, como proliferação, sobrevivência, motilidade e diferenciação celular (KEELY, 2011).

Essas proteínas são compostas pela combinação de duas subunidades,  $\alpha$  e  $\beta$ , formando heterodímeros com especificidades únicas para ligantes da ECM. No total, são 18 subunidades  $\alpha$  e 8 subunidades  $\beta$  capazes de formar 24 tipos diferentes de integrinas quando combinadas (HYNES, 2002).

No contexto do câncer, a função das integrinas é particularmente relevante, pois sua ativação desencadeia vias de sinalização intracelular que podem favorecer tanto a supressão quanto a promoção tumoral (KEELY, 2011).

Estudos recentes destacam o papel da integrina  $\alpha\beta3$  no câncer de mama, especialmente em sua forma metastática para o tecido ósseo (TSAI et al., 2023). A expressão elevada dessa subunidade tem sido amplamente associada à metástase precoce e à piora do prognóstico. Além disso, essa integrina é considerada uma das moléculas chave na promoção da migração celular, na expressão de proteases e na disseminação vascular, contribuindo significativamente para a progressão tumoral (DESGROSELLIER; CHERESH, 2010; LINO et al., 2019; DANILUCCI et al., 2019).

Na porção intracelular, as integrinas são atreladas à quinases de adesão focal (FAKs) que, ao se conectarem com a proteína tirosina quinase (Src), promovem uma cascata de sinalização intracelular, resultando nos comportamentos relacionados à progressão tumoral, como motilidade celular e sobrevivência (MITRA; SCHLAEPFER, 2006). A integrina  $\alpha\beta3$  é responsável pelo reconhecimento do motivo RGD (Arginina, Glicina, Ácido Aspártico) presentes em proteínas da ECM, como a vitronectina e fibronectina, iniciando uma sinalização *outside-in* (SHATTIL, S. J., KIM, C., GINSBERG, M. H., 2010).

A sinalização mediada por integrinas envolve a modulação de diversas vias, como a transição epitelial-mesenquimal (EMT), visto que há uma regulação positiva do gene codificador da subunidade  $\beta3$  (ITGB3) durante o processo induzido por TGF- $\beta$  (ZHU, C. et al, 2019). Um modelo foi proposto no qual, através de sua subunidade  $\beta3$ , a integrina  $\alpha\beta3$  se liga com receptores de fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGFR1) intensificando a atividade desses receptores, essenciais na progressão tumoral (DA SILVA et al., 2019). Além disso, acredita-se que a integrina  $\alpha\beta3$  esteja intimamente associada à persistência direcional da migração (MONTENEGRO et al., 2017).

Moléculas bloqueadoras ou inibidoras da ação de integrinas, conhecidas como desintegrinas, são pequenas proteínas que apresentam motivos adesivos RGD ou KGD capazes de interagirem com alta afinidade com as integrinas (SELISTRE-DE-ARAUJO et al., 2010). Ao associar-se com a integrina  $\alpha\beta3$ , a desintegrina DisBa-01, inicialmente isolada da peçonha da serpente Urutu-cruzeiro (*Bothrops alternatus*), é capaz de inibir a sinalização do eixo VEGF/VEGFR2 e, conseqüentemente, causar a perda do direcionamento das células tumorais, por

meio da formação de adesões mais estáveis (MONTENEGRO et al., 2017). Desse modo, as integrinas, em especial a integrina  $\alpha\beta3$ , tornam-se potenciais alvos terapêuticos para o desenvolvimento de novas estratégias no tratamento do câncer de mama.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Estabelecer e caracterizar um modelo ortotópico metastático de tumor de mama triplo negativo a partir da injeção de células 4T1 em camundongos Balb/c, avaliando a formação e comportamento tumoral, metástase e comportamento celular.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Cultivar e expandir as células 4T1 para injeção em camundongos Balb/c.
2. Induzir o crescimento tumoral nos camundongos Balb/c através da injeção das células 4T1 e monitorar a progressão do tumor.
3. Analisar a ocorrência de metástase nos camundongos, investigando tecidos específicos após a eutanásia.
4. Realizar análise e caracterização histológica do tumor
5. Investigar as características migratórias e invasivas das células 4T1 por meio de ensaios *transwell*, correlacionando com a capacidade metastática observada *in vivo*.

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 Cultivo celular**

A linhagem celular 4T1, utilizada no desenvolvimento desse projeto, foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Biofotônica do Grupo de Óptica do Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo (USP). As células aderidas em monocamada, recebidas em frasco de cultivo com meio pronto RPMI 1640

(ATCC® Modification), adquirido da empresa Gibco (ref. A10491-01) e suplementadas com 10% de soro fetal bovino, foram mantidas em incubadora 37° C e 5% de CO<sub>2</sub>. A confluência celular foi acompanhada por microscopia óptica (Olympus CK2) durante três dias até atingirem confluência de aproximadamente 80%.

O subcultivo foi conduzido com lavagem inicial com PBS 1X, seguido pela adição de solução de Tripsina-EDTA 0,1% e incubação por cerca de 3 minutos, para perda de adesão das células com a garrafa. Após a neutralização da tripsina com meio de cultivo RPMI 1640, o conteúdo foi levado à centrifuga a 1000 RPM por 5 minutos (Centrifuga Excelsa, FANEM). A ressuspensão do pellet resultante da centrifugação foi realizada em meio RPMI. A contagem das células viáveis foi efetuada em contador automático (TC20™ Automated Cell Counter, BioRad) com a utilização Trypan Blue 0,4%. Repiques foram realizados a cada três dias, aproximadamente, para expansão das células até que atingissem quantidade necessária para a aplicação nos animais modelos. As células para a formação de um novo estoque em nosso laboratório foram congeladas em vials contendo FBS, 10% de DMSO e 1X10<sup>6</sup> células, totalizando 1 ml por vial, e armazenadas em freezer -80°.

### **3.2 Ensaio de migração Transwell**

As células 4T1 foram divididas em três grupos distintos: i) Controle negativo; ii) Controle positivo (10% SFB) e; iii) Tratadas com DisBa-01 (1.000nm). Cada grupo foi preparado em duplicata, com 1 x 10<sup>5</sup> células em 250 µL de meio de cultivo RPMI-1640, inicialmente isento de SFB. Posteriormente, cada grupo foi plaqueado na parte superior de suas respectivas câmaras de Boyden com poros de 8.0 µm (Greiner bio-one® ThinCert™), que foram imediatamente inseridas em placa de 24 poços (K12-024, Kasvi), contendo 750 µL de meio RPMI-1640 10% SFB, com exceção dos poços referentes ao grupo controle negativo, que receberam meio sem SFB. A placa foi mantida em incubadora por 24 h a 37 °C e 5 % CO<sub>2</sub>.

Após o período de incubação, foi utilizado paraformaldeído (4 %) durante 10 minutos para fixação das células que migraram através das membranas. Posteriormente, após três lavagens consecutivas com PBS 1X, as membranas foram marcadas com DAPI por 10 minutos, seguidas de nova lavagem com PBS 1X. Logo

após, as membranas das câmaras de cada um dos grupos foram destacadas de suas respectivas câmaras e posicionadas para a montagem da lâmina. A imagem da lâmina foi registrada por meio do microscópio invertido Zeiss LSM880 Airyscan (Carl Zeiss AG, Germany) e a quantificação dos núcleos celulares foi realizada no software Fiji-ImageJ.

### **3.3 Modelo ortotópico de formação de metástase espontânea por imfp (*intramammary fat pad*) *in vivo***

Para o modelo experimental *in vivo*, foram utilizadas 10 camundongas fêmeas (*Mus musculus*) da linhagem Balb/c, adquiridas no biotério central da USP Ribeirão Preto, com sete semanas de vida. A utilização dos camundongos no projeto foi previamente aprovada pelo CEUA - UFSCar, com proposta protocolada sob o CEUA no 9550180823. Previamente à submissão da proposta à CEUA -UFSCar, foi realizado o curso de “Princípios éticos e manejo de animais em pesquisa”, módulo Roedores, oferecido pela Central de Bioterismo do Instituto de Ciências Biomédicas em parceria com a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Os animais foram alojados em duas gaiolas apropriadas para camundongos, com cinco animais cada e ambientados em sala isolada, com temperatura e iluminação adequada. O aporte de ração e água foi de maneira *ad libitum*. O monitoramento do crescimento dos animais foi realizado por meio de pesagens três vezes por semana, até que completassem 12 semanas e atingissem massa corporal média de 20 gramas.

A preparação das células utilizadas nas injeções para formação do modelo tumoral *in vivo* foi conduzida seguindo o mesmo processo do subcultivo, salvo que o pellet resultante da centrifugação foi ressuspendido em 3 ml de PBS 1X. Após duas contagens celulares de amostras distintas, a média de ambas foi utilizada para realização do cálculo do volume necessário para introdução de  $1 \times 10^5$  células na 4ª mama direita de cada animal. O volume de 20  $\mu$ l foi administrado por meio de injeção na gordura intramamária, com o auxílio de uma seringa Hamilton.

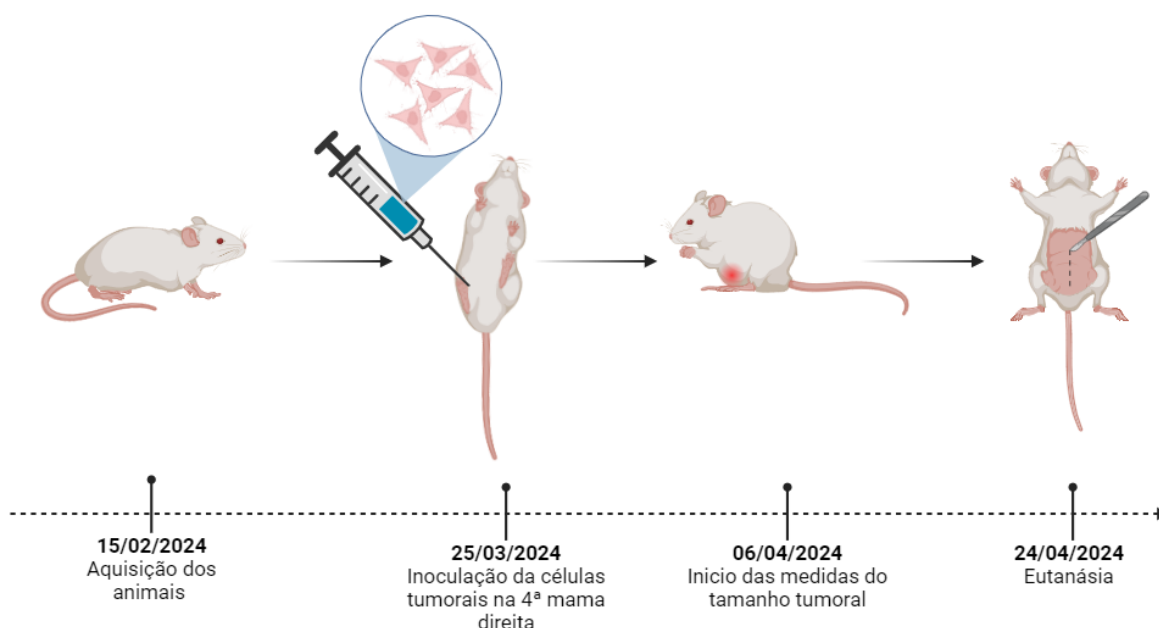
Cada animal foi previamente sedado e individualmente exposto à inalação de Isoflurano por breve período de tempo para que ficassem inconscientes. Logo

após a aplicação das injeções, todos os animais já se encontravam acordados e sem alterações significativas em seus comportamentos.

Decorridos 12 dias após a injeção, o crescimento do tumor primário passou a ser acompanhado com o auxílio de um paquímetro analógico a cada três dias. A evolução da massa corporal dos animais continuou sendo monitorada e avaliações quanto ao comportamento e aparência dos animais passaram a ser realizadas.

A eutanásia dos animais foi efetuada 30 dias após a injeção de células tumorais, por meio da administração de uma overdose de Isoflurano inalado. Os tecidos coletados, incluindo tumor, fígado, baço, fêmur esquerdo e cérebro, foram pesados, medidos, fotografados e armazenados em tubos contendo formalina 10% para análises histológicas subsequentes.

Figura 6: Desenho experimental do Modelo *in vivo*



Fonte: Autoria própria. Criada através do BioRender

### 3.4 Histologia

As lâminas contendo cortes do tumor primário, previamente montadas, foram inicialmente coradas pelo método Hematoxilina/Eosina, sob supervisão da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cynthia Aparecida de Castro e do técnico Dr. Paulo, no Laboratório de

Morfologia e Patologia (DMP, UFSCar). O processo de desparafinização incluiu dois banhos consecutivos em xilol, com duração total de 20 minutos. Em seguida, as lâminas foram submetidas a banhos sucessivos de cinco minutos em álcool com concentrações decrescentes (100%, 80%, 70% e 50%) para reidratação, seguidos de lavagem em água corrente por sete minutos.

O protocolo de coloração por HE iniciou-se com a imersão das lâminas em hematoxilina por 10 minutos, seguida por uma lavagem em água corrente por cinco minutos, e dois mergulhos em álcool ácido, com posterior lavagem em água corrente. As lâminas foram, então, banhadas em água amoniacal até que os cortes adquirissem uma coloração azulada e, posteriormente, lavadas em água corrente por mais três minutos. Após isso, foram submetidas a banhos de etanol 80% e eosina, por aproximadamente um minuto cada. Para finalizar, as lâminas passaram por dois banhos em etanol 100% por cinco minutos cada, seguidos por dois banhos consecutivos em xilol, totalizando 15 minutos.

Imediatamente após o término desse processo, os cortes corados nas lâminas foram cobertos por uma fina camada de resina, finalizando com a colocação da lamínula sobre eles.

Para a coloração com tricrômico de Masson foi utilizado o Kit Tricrômico Masson (7x100ml, KT077700SO), adquirido da empresa Êxodo Científica. O método da coloração foi realizado de acordo com as instruções disponibilizadas pela própria empresa.

As lâminas devidamente processadas foram digitalizadas em scanner de lâminas automático (Grundium Ocus®) e as imagens armazenadas em HD externo. A visualização para análise das imagens foi feita por meio do software QuPath.

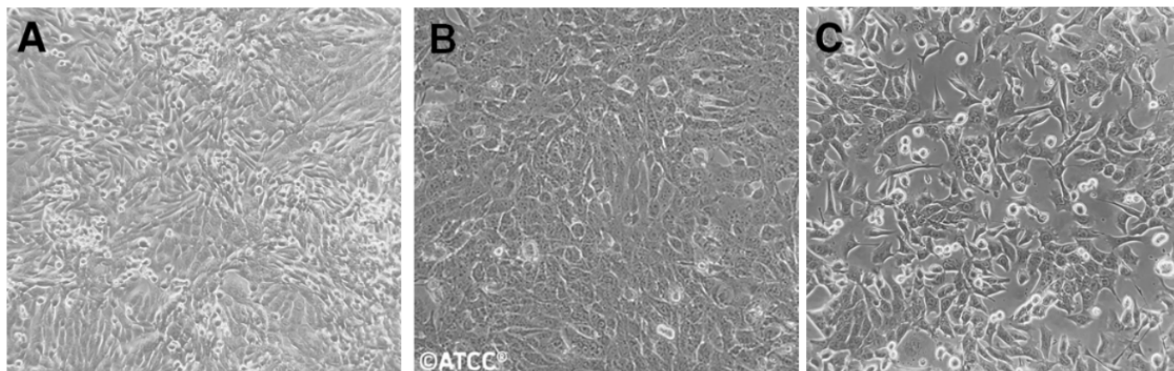
## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Cultivo celular**

O cultivo da linhagem 4T1 foi bem sucedido, com células apresentando alta capacidade proliferativa, expandindo de forma exponencial e mantendo alta viabilidade. Desse modo, foi possível iniciar e expandir o estoque da linhagem em nosso laboratório. As imagens representadas a seguir ilustram a morfologia celular

da linhagem 4T1 em média e alta confluência, duas obtidas durante o cultivo celular em nosso laboratório e uma comparativa retirada da página oficial da ATCC.

Figura 7: 4T1 em cultivo em média e alta confluência



A imagem à esquerda (A) foi obtida pela autora, por microscopia óptica (100X), durante o cultivo celular em nosso laboratório e mostra alta confluência das células 4T1. A imagem central (B) foi retirada da ATCC e também mostra células 4T1 em alta confluência. A imagem à direita (C), também obtida pela autora durante o cultivo celular (100X), mostra células 4T1 com média confluência.

Ambas as imagens (A e B) da figura 7 representam elevada confluência (>95%) das células 4T1. Com o aumento da confluência, as células tumorais cultivadas in vitro tendem a apresentar uma diminuição na taxa de proliferação, refletindo um estágio de saturação do crescimento celular, visto que o espaço e nutrientes disponíveis nesse modelo são limitados. A alta capacidade proliferativa é facilmente observada quando o tempo para duplicação do volume celular em cultivo é levado em consideração (aproximadamente 12 – 14 horas). Ao atingirem confluência máxima, a depleção de nutrientes e redução do espaço disponível leva à morte celular.

A confluência média (60% - 80%), apresentada na imagem C, é frequentemente considerada a mais adequada para realização de diversos ensaios funcionais como, por exemplo, ensaio de migração celular, visto que nesse estágio as células apresentam uma alta capacidade proliferativa, com crescimento exponencial, morfologia e bordas bem definidas.

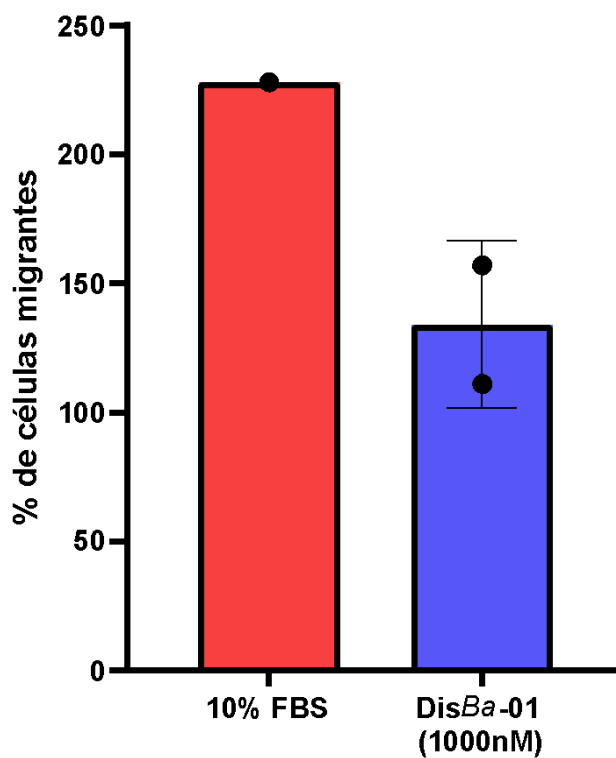
As imagens auxiliam na compreensão de como os diferentes estágios de confluência podem influenciar no comportamento celular, corroborando com as sugestões presentes na literatura para que os ensaios e repiques sejam realizados nas confluências entre 70% - 80%, que corresponde a fase mais ativa das células em cultura.

Além disso, as imagens obtidas durante o cultivo celular em nosso laboratório são consistentes com as imagens encontradas na literatura em trabalhos que utilizaram a mesma linhagem celular (4T1), indicando que o protocolo de cultivo utilizado neste estudo reproduz de forma adequada as condições de cultivo para esse tipo de célula. No dia da injeção, a média de ambas as contagens realizadas com Trypan Blue em contador digital foi de  $4,91 \times 10^6$ .

#### **4.2 Ensaio de Migração Celular Transwell**

O ensaio de migração transwell com as células 4T1, apesar de ter sido realizado apenas uma vez, foi considerado nesse trabalho a fim de ilustrar a possível atividade da desintegrina DisBa-01 na migração celular. Com base no gráfico 1, que compara a quantidade de células migratórias em cada um dos grupos, é possível observar uma redução de aproximadamente 45% de células migratórias no grupo tratado com DisBa-01 a 1.000nm em relação ao grupo de controle positivo contendo 10% de SFB. Ambas as taxas de migração foram realizadas em comparação à um controle negativo, sem SFB, para que fosse levada em consideração a taxa de migração basal das células tumorais. Isso explica o motivo pelo qual ambos os grupos comparados apresentam taxas de migração maiores que 100%.

**Gráfico 1: Ensaio de Migração Transwell 4T1**  
**n = 1**



O eixo Y representa a porcentagem de células migratórias, enquanto o eixo X representa os dois grupos trabalhados em comparação ao controle de migração basal. A coluna vermelha refere-se ao controle positivo, com 10% de SFB, e a coluna azul refere-se ao grupo tratado com DisBa-01 a 1.000nm. Fonte: autoria própria. Criada a partir do software GraphPad Prism.

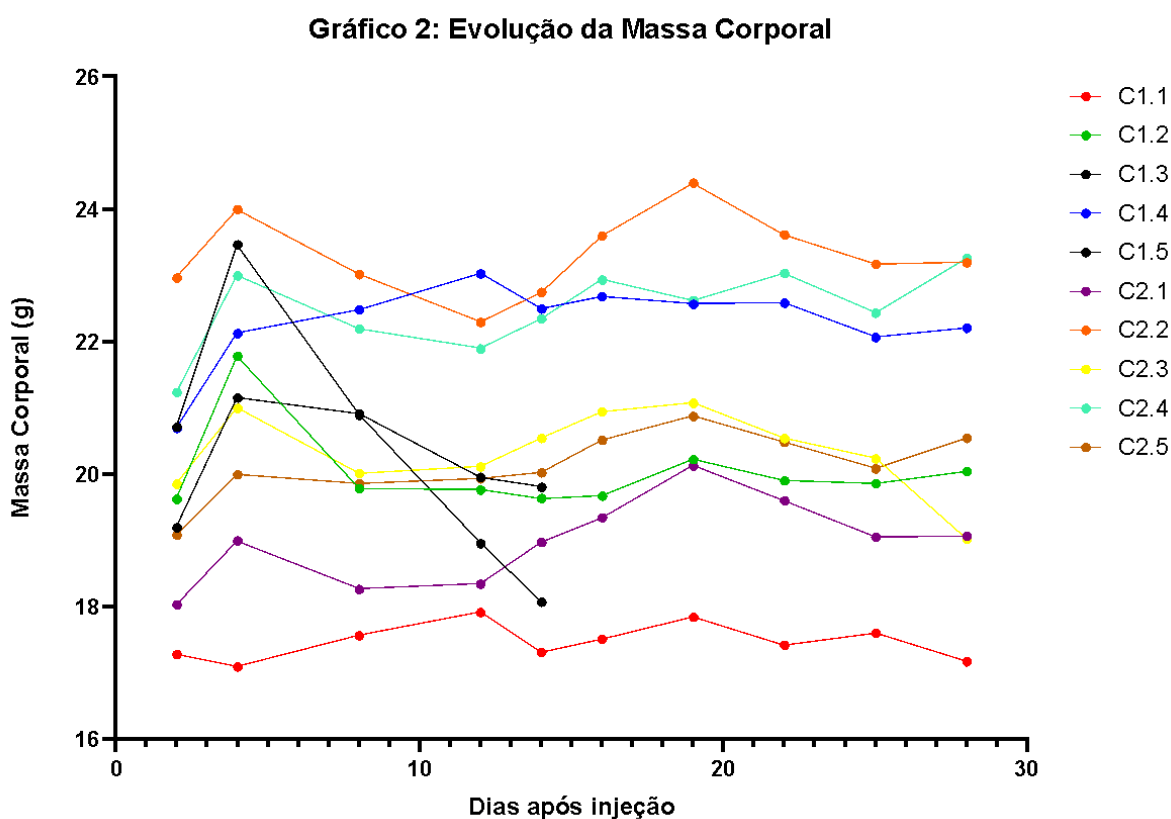
#### **4.3 Modelo ortotópico de formação de metástase espontânea por imfp (*intramammary fat pad*) *in vivo***

A aplicação das injeções contendo  $1 \times 10^5$  células tumorais 4T1 na 4ª mama direita de cada animal ocorreu conforme o programado, sem intercorrências, seguindo as condições para manter o bem estar dos animais e de forma a minimizar qualquer eventual estresse durante o procedimento. Logo após as injeções, os animais já se encontravam em condições normais de comportamento, sem apresentarem alterações significativas.

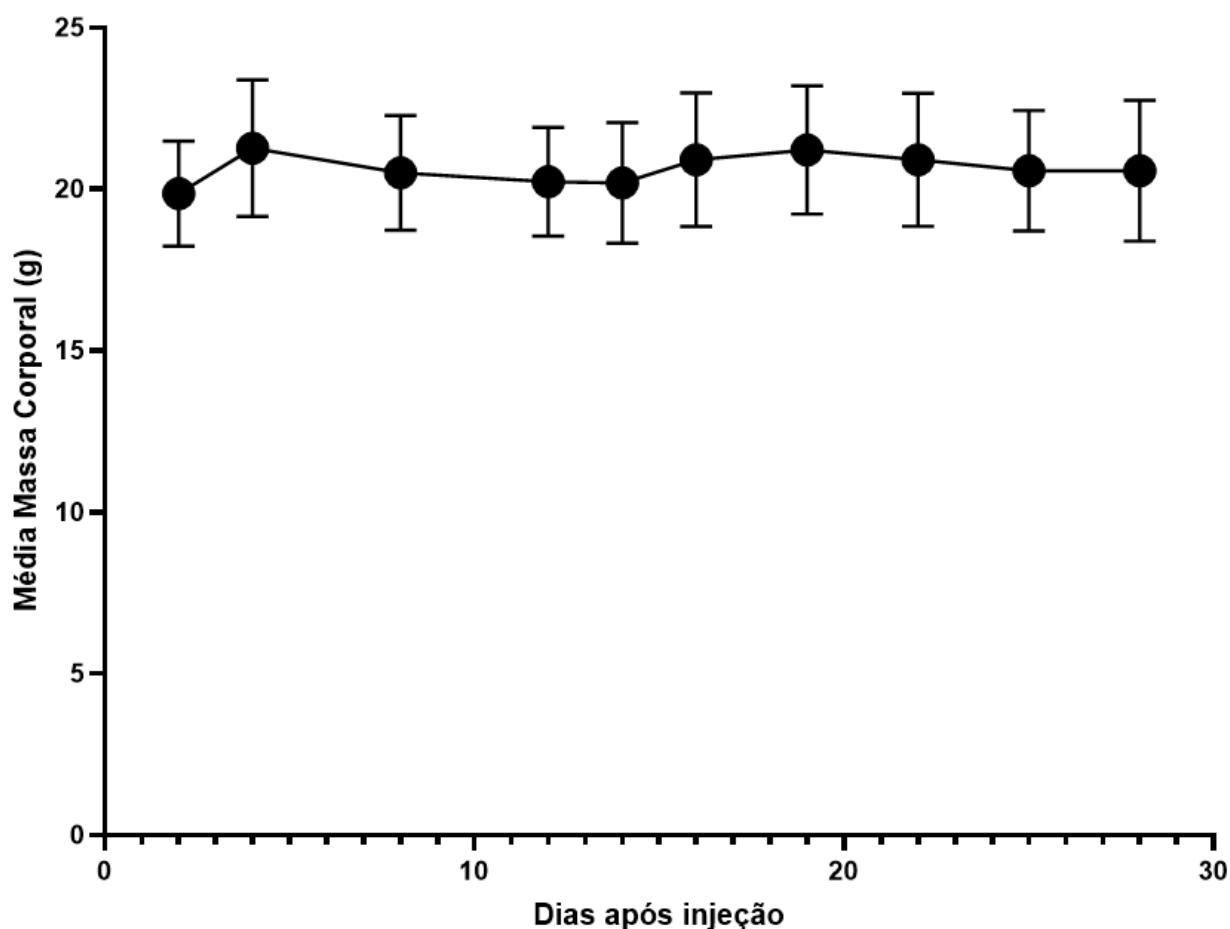
Os animais apresentaram, de modo geral, comportamento estável durante todo o procedimento, com ausência de sinais que indicassem possível sofrimento e/ou estresse. Nos dias subsequentes, todos se mantiveram com boa integridade física e sem apresentar alterações nos padrões alimentares e comportamentais. O crescimento dos animais continuou sendo monitorado através de medidas da massa corporal. Decorridos 16 dias após a injeção das células tumorais na mama dos

animais, dois deles foram a óbito. A causa da morte não é completamente conhecida, mas devido ao fato de terem apresentado coloração mais escura e inchaço na região abdominal no dia anterior à morte, acredita-se que tenha ocorrido uma hemorragia interna em decorrência do próprio tumor, da injeção ou ainda de outras razões não claras. Os demais animais seguiram sem alterações que indicassem dor ou sofrimento.

A evolução da massa corporal dos animais nos dias após a inoculação das células 4T1 até os dias que antecederam a eutanásia está representada no gráfico 2. Também foi realizada uma comparação das médias dos valores obtidos em cada dia de pesagem, como ilustrado no gráfico 3.



Cada linha do gráfico representa um animal do modelo experimental. No eixo X está o número de dias decorridos após a injeção das células tumorais e no eixo Y estão os valores correspondentes de cada pesagem. Fonte: autoria própria. Criada a partir do software GraphPad Prism.

**Gráfico 3: Evolução da Média da Massa Corporal**

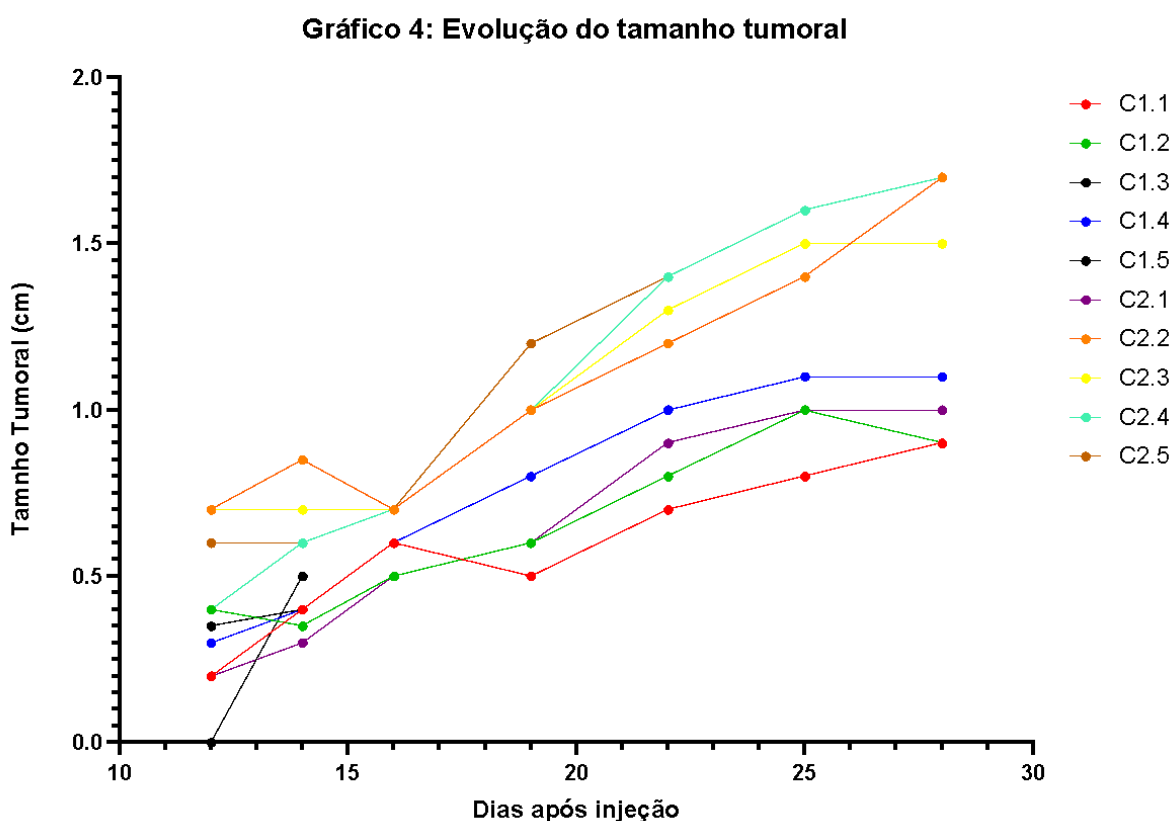
Representa a evolução das médias de massa corporal dos animais obtidas em cada dia de pesagem após a injeção das células tumorais. No eixo X estão os dias decorridos após a injeção e no eixo Y, os valores médios correspondentes. O gráfico também apresenta o desvio padrão de cada média representada. Fonte: autoria própria. Criada a partir do software GraphPad Prism.

Ao observar os gráficos, é possível notar que a maioria dos animais apresentou um aumento nos valores da massa corporal logo nos primeiros dias após a injeção, seguido por uma diminuição desses valores nos dias subsequentes. Apesar das oscilações observadas, a massa corporal da maioria dos indivíduos ao final do período de monitoramento era similar à massa corporal inicial.

A perda de peso após as primeiras fases do desenvolvimento tumoral pode estar associada à uma condição de caquexia relacionada ao câncer, na qual há perda de massa muscular esquelética que leva ao comprometimento funcional (Fearon, Kenneth et al., 2011) e está relacionada à taxa de sobrevida (Blum, D et al., 2014)

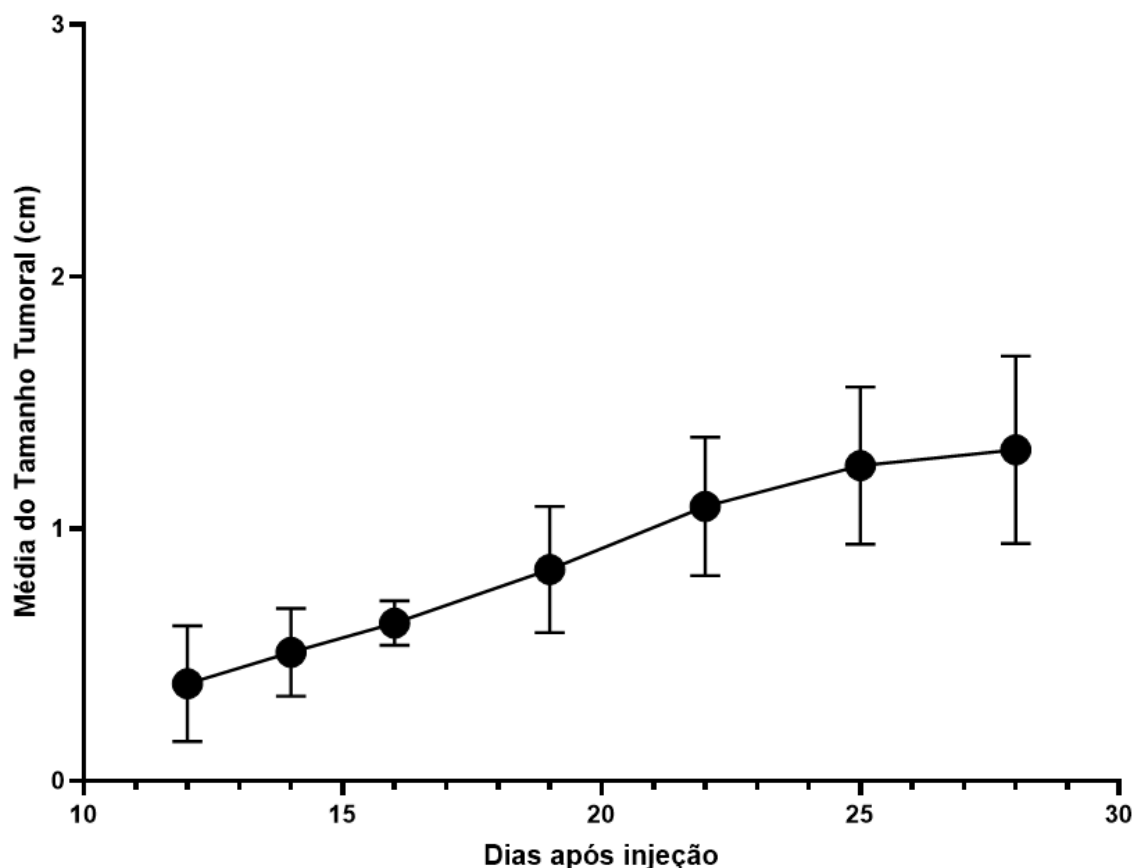
As informações encontradas na literatura corroboram para relacionar a queda contínua nos valores de massa corporal dos animais C1.3 e C1.5, observados após o estabelecimento tumoral, com o óbito dos mesmos.

Os tumores desenvolvidos passaram a ser medidos 12 dias após a inoculação das células 4T1 na mama dos animais e acompanhados a cada três dias, aproximadamente, por meio da realização de medidas do tamanho tumoral com auxílio de paquímetro analógico. A evolução do crescimento tumoral de cada indivíduo (gráfico 4), bem como a evolução das médias do tamanho tumoral em cada dia de monitoramento (gráfico 5), estão representadas a seguir.



Evolução do tamanho tumoral em cada animal modelo. No eixo X estão representados os dias decorridos após a inoculação das células 4T1 na mama dos animais e no eixo Y estão representadas suas respectivas medidas em centímetros. Fonte: autoria própria. Criada a partir do software GraphPad Prism.

Gráfico 5: Evolução da Média do Tamanho Tumoral



Evolução das médias do tamanho tumoral durante os dias de monitoramento. No eixo X estão representados os dias decorridos após a inoculação das células 4T1 na mama dos animais e no eixo Y estão representadas suas respectivas medidas em centímetros. O gráfico também apresenta o desvio padrão de cada média representada. Fonte: autoria própria. Criada a partir do software GraphPad Prism.

É possível observar um crescimento progressivo dos tumores ao longo do tempo, com alguns animais apresentando crescimento mais acentuado e outros com crescimento mais lento, justificando a amplitude dos desvios padrão representado no gráfico.

A literatura existente relaciona o progressivo crescimento tumoral a uma gama de fatores capazes de influenciarem esse processo. Entre esses fatores, destacam-se a elevada capacidade proliferativa das células, angiogênese e a resposta imune (Hanahan, Douglas et al., 2011 ;Kim, H.J., Ji, Y.R. & Lee, Y.M., 2022).

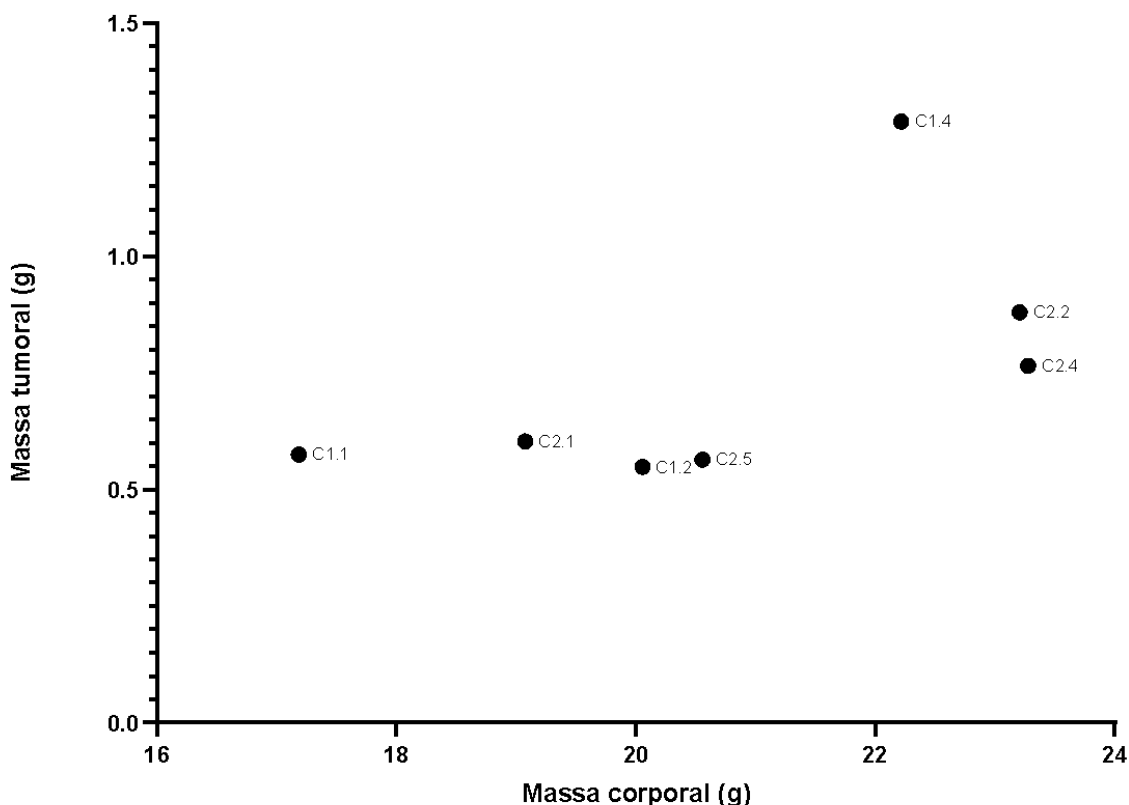
Nos modelos desenvolvidos a partir de células 4T1, esse crescimento progressivo rápido e elevado está intimamente associado a formação de metástase (Tao, K., Fang, M., Alroy, J. et al., 2008 ;Yang, L., Yong, L., Zhu, X. et al.). A inclusão

dos erros padrão no gráfico também permite observar a variação do crescimento tumoral entre os animais, o que é comum em experimentos biológicos.

A eutanásia foi realizada 30 dias após a injeção das células tumorais, de forma bem sucedida e sem nenhuma intercorrência. No dia da eutanásia, apesar do comportamento inalterado dos animais desde o início dos trabalhos, todos os indivíduos apresentavam ulceração local na mama onde se desenvolveu o tumor primário. Ao realizar a dissecação, foi possível observar a vascularização que irrigava o tumor primário, bem como possíveis pontos de metástase em alguns animais (Figura 9).

A coloração e morfologia de todos os órgãos estavam, em sua maioria, em condições normais, exceto por alguns nódulos encontrados no intestino e região torácica de alguns dos animais. O tumor primário, assim como os demais tecidos de interesse que serão utilizados em análises futuras, foram cuidadosamente coletados, pesados e fotografados em escala antes de serem devidamente acondicionados em tubo contendo formalina 10%.

O gráfico 6 mostra a relação entre a massa tumoral, obtida após a pesagem dos tumores no dia da eutanásia, e a massa corporal dos animais.

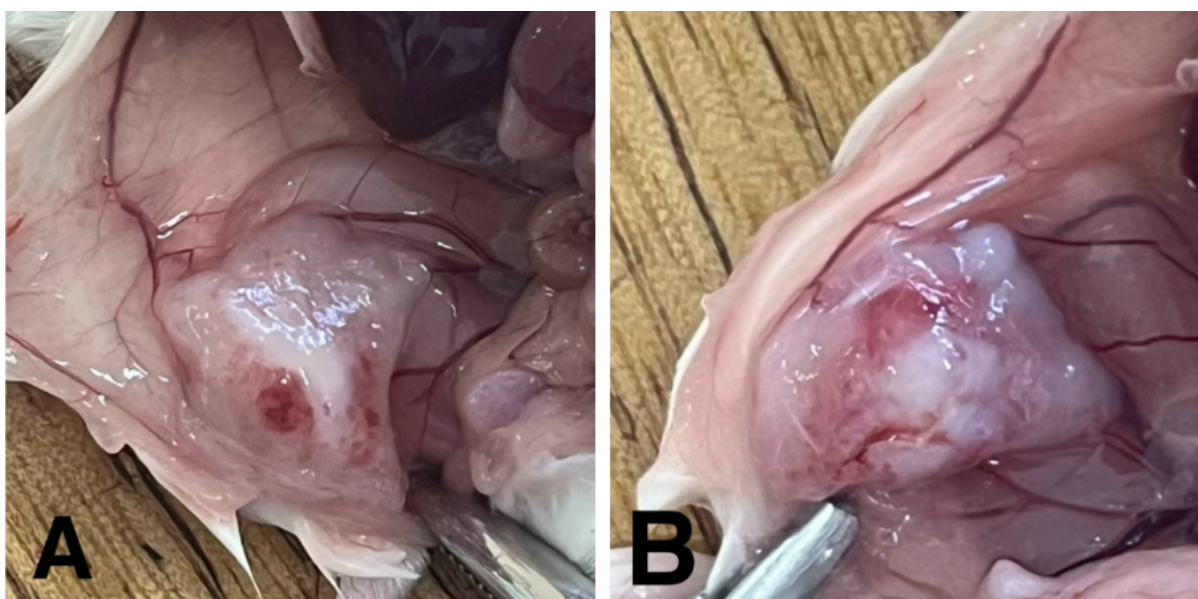
**Gráfico 6: Relação entre Massa Tumoral e Massa Corporal**

Relação entre a massa tumoral, obtida após a pesagem dos tumores no dia da eutanásia, e a massa corporal dos animais. Fonte: autoria própria. Criada a partir do software BioRender.

Apesar de ser possível estabelecer uma relação positiva entre a massa tumoral e a massa corporal de alguns animais, como no caso dos animais C1.4, C2.2 e C2.4, essa relação não pode ser generalizada, visto que há grande variabilidade entre os valores representados, não sendo possível estabelecer uma relação de progressão linear para o modelo como um todo. Essa variação pode ser explicada por fatores intrínsecos ligados tanto ao comportamento das células tumorais quanto aos fatores fisiológicos ligados a resposta imune específica de cada animal, capazes de modular o crescimento tumoral.

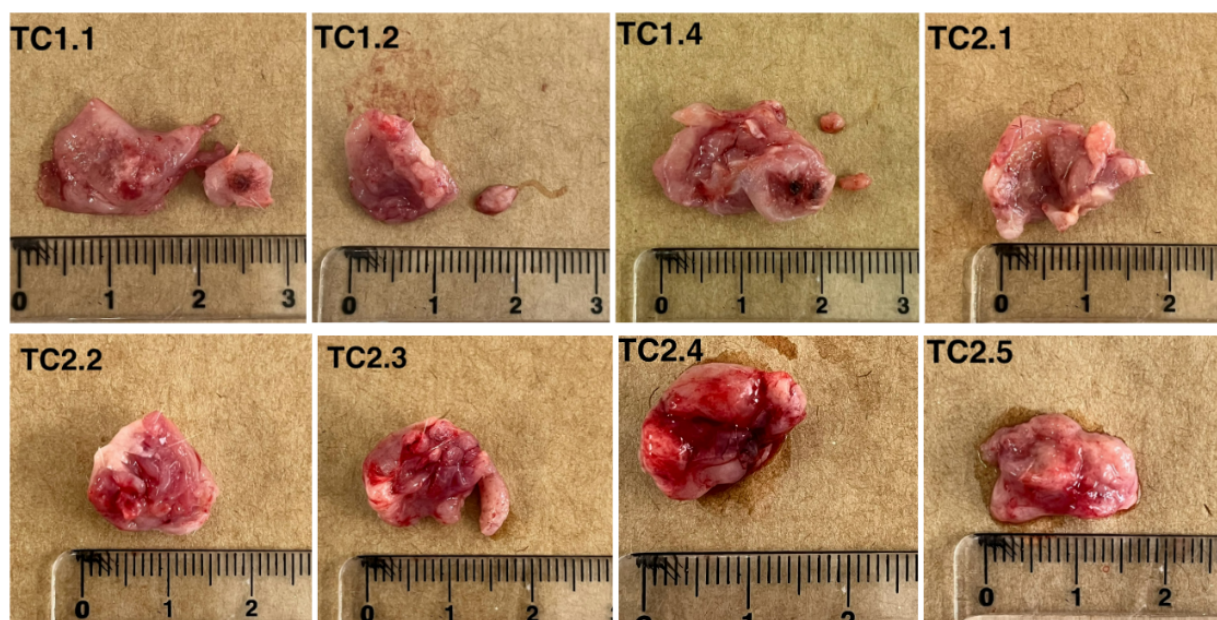
Abaixo seguem algumas imagens representativas do tumor primário *in situ* e *ex situ*, além de possíveis metástases encontradas em regiões secundárias. A coleção completa das imagens documentadas no dia da eutanásia segue armazenada em nuvem “Google Drive”, com acesso de apenas pessoas devidamente autorizadas. O acesso a elas poderá ser concedido mediante solicitação.

Figura 8: Imagem do tumor primário *in situ*



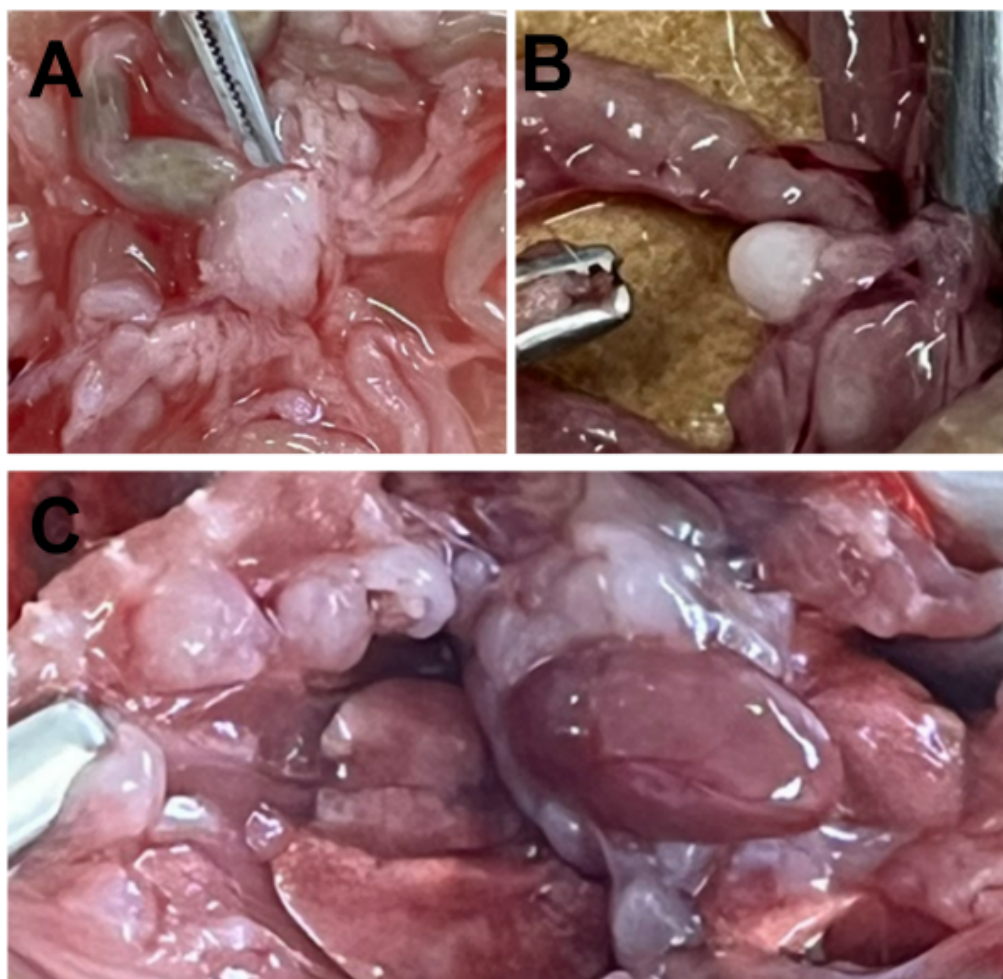
Tumor primário fotografado *in situ* de dois dos animais (C1.1 e C1.2, respectivamente) eutanasiados. Nessa imagem, é possível observar os vasos sanguíneos que irrigam o tumor. Fonte: autoria própria.

Figura 9: Imagens do tumor primário *ex situ*



Tumores primários fotografados *ex situ* no dia da eutanásia. Cada imagem corresponde ao tumor primário de um animal modelo, devidamente identificado no canto superior esquerdo de cada imagem. Fonte: autoria própria

Figura 10: Possíveis metástases encontradas



A: Nódulo de possível metástase encontrado no intestino do animal C2.1; B: Nódulo de possível metástase encontrado no intestino do animal C2.4; C: Nódulos de possível metástase encontrados na região torácica do animal C1.4. Fonte: autoria própria.

#### 4.4 Análises histológicas

Como os tumores formados a partir de células 4T1 possuem características muito particulares em relação aos demais tecidos comumente estudados, foi necessário adaptar o protocolo de coloração por Hematoxilina/Eosina existente no laboratório. Esse processo foi realizado no laboratório sob a supervisão da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cynthia Aparecida de Castro, com acompanhamento do técnico Paulo Henrique de Andrade, no Departamento de Morfologia e Patologia. Foi necessária a realização alguns testes prévios de coloração até que houvesse uma padronização específica para os cortes dos tumores originados a partir das células 4T1 que permitissem a melhor visualização dos seus componentes. O método descrito na secção “Métodos - Histologia” foi estabelecido como oficial após os testes. O mesmo

é válido para a coloração dos cortes com Tricrômico de Masson. As análises qualitativas dos cortes histológicos corados em HE foram realizadas a partir das imagens digitalizadas em scanner automático (Grundium Ocus®), no Laboratório de Biofotônica do Instituto de Física de São Carlos.

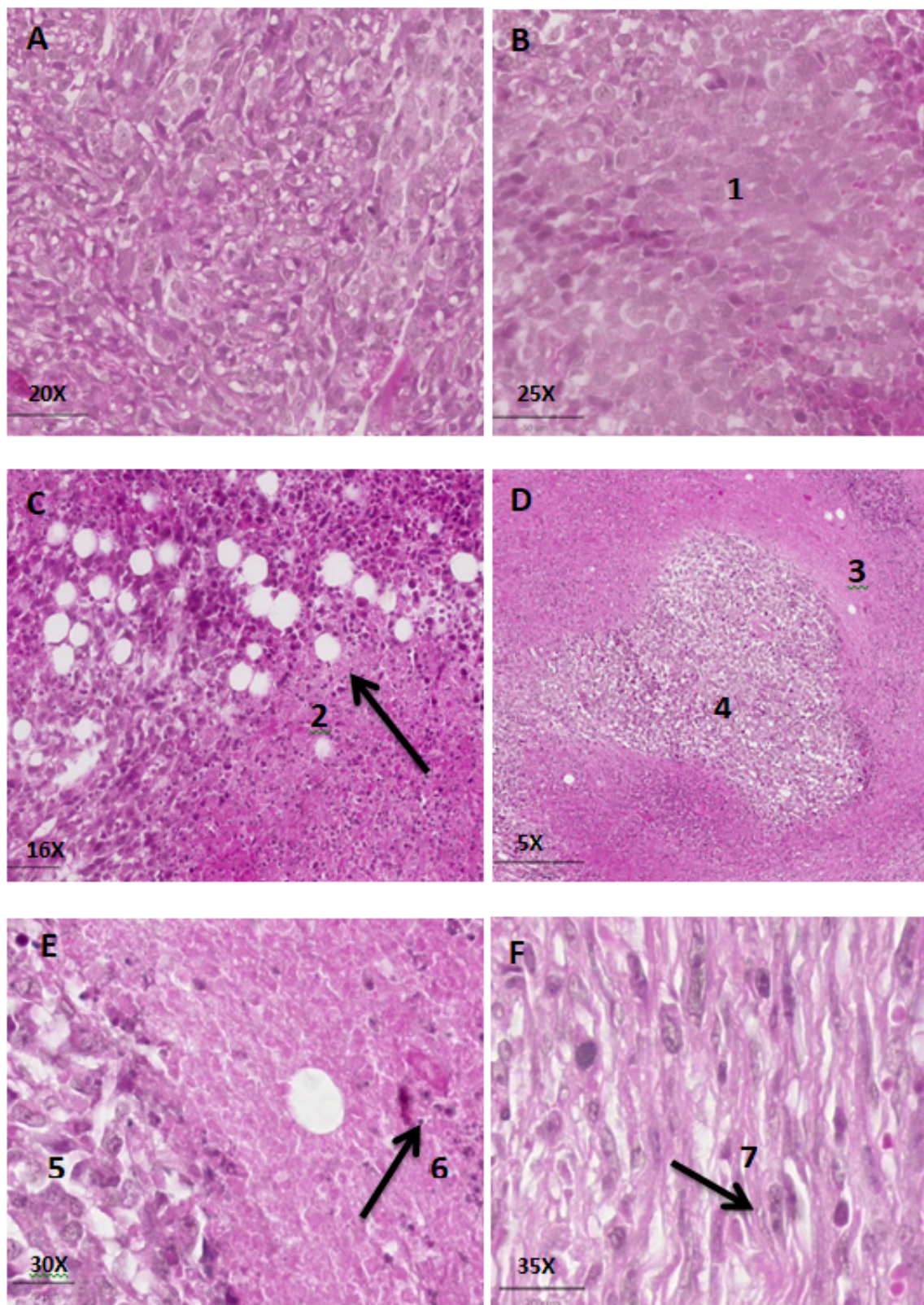
Histopatologicamente, os tumores se encaixam na categoria de tumores anaplásicos malignos com células não especializadas. A partir das imagens histológicas dos cortes tumorais, é possível observar uma alta densidade celular, que corrobora com as informações da elevada capacidade proliferativa das células 4T1 encontradas na literatura, já mencionadas anteriormente neste trabalho. Além disso, outra condição característica de malignidade tumoral, notável nas imagens, é o pleomorfismo celular e a ausência de organização estrutural, evidenciando a ocorrência de um crescimento celular desordenado e invasivo. Os núcleos das células tumorais apresentam aparência hipercromática, além de grandes, em sua maioria. Também foram observadas mitoses típicas e atípicas, que também corroboram para uma alta atividade proliferativa.

A inflamação foi esparsa no modelo, com presença de infiltrado inflamatório, típico de tumores malignos, também é observada nos cortes histológicos e indica uma tentativa do sistema imunológico de conter o crescimento tumoral. A presença de infiltrado inflamatório no tecido tumoral é coerente com o modelo animal utilizado (BALB/c), visto que essa linhagem isogênica é imunocompetente, compatível com o observado em tumores TNBC em humanos. Apesar de ser possível observar alguns pequenos espaços vasculares nos cortes, a densidade vascular não é muito evidente, sugerindo um rápido crescimento tumoral que excede a capacidade do processo angiogênico, resultando em regiões de hipóxia e possível necrose devido à insuficiência no suprimento de oxigênio e nutrientes.

Em algumas regiões dos cortes histológicos, fica clara a presença de áreas de transição entre regiões com diferentes densidades celulares. As regiões com mais núcleos evidentes representam áreas com maior densidade e, possivelmente, maior taxa de proliferação celular. As regiões mais claras, com núcleos menos evidentes, células com coloração mais eosinófilas e menor densidade celular, indicam um possível processo de degeneração tecidual. Em algumas regiões observa-se reação desmoplásica do tecido infiltrado, ou seja, proliferação fibroblástica e produção de colágeno, o que dá ao tumor consistência dura na macroscopia.

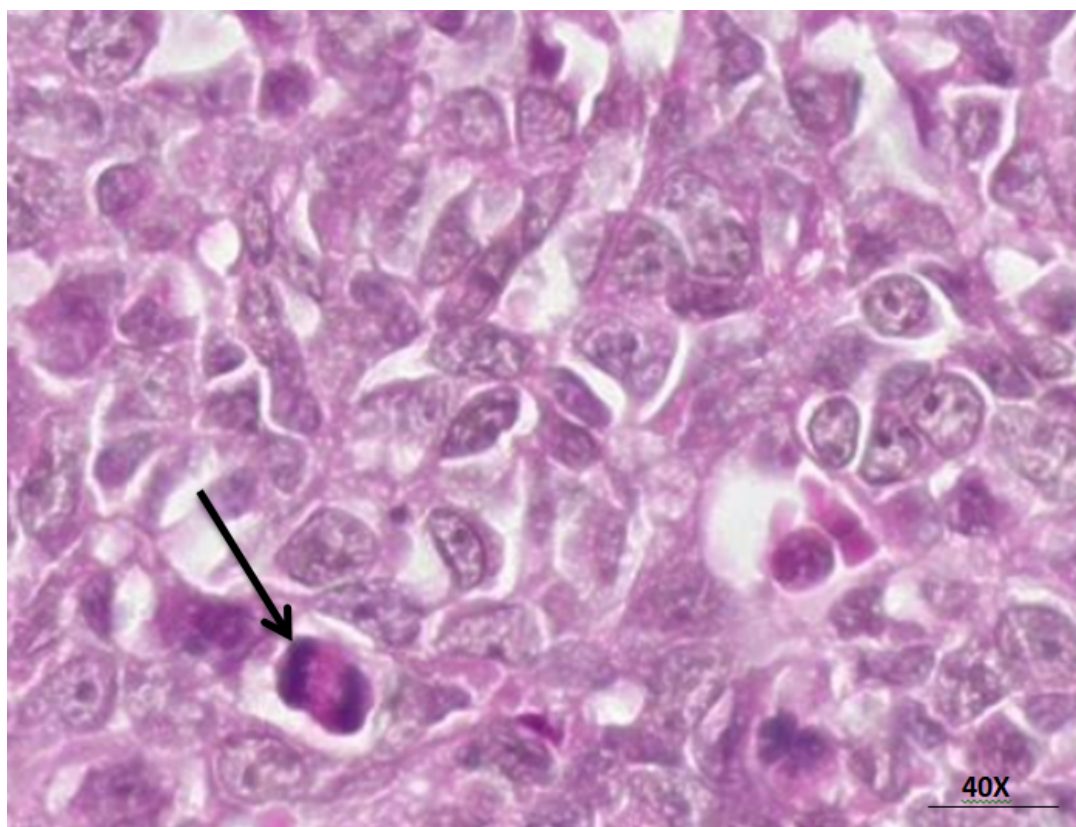
A figura 11 representa algumas características principais que foram encontradas nos cortes tumorais corados em HE. A figura 12 representa uma mitose encontrada no mesmo tipo de corte e coloração.

Figura 11: Regiões dos cortes tumorais corados em HE



É possível observar grande heterogeneidade celular e alterações morfológicas, como perda de polaridade devido a células pleomórficas (A. 20X/50µm). Há regiões de necrose coagulativa (1) com detritos celulares desorganizados com limites indistintos, núcleos picnóticos e citoplasma eosinofílico, formando um tecido amorfo heterogêneo (B. 25X/50µm). Em alguns tumores foi possível observar células adiposas (2) incorporadas ao tumor (C. 16X/50µm). Regiões de baixa (3) e alta (4) densidade celular (D. 5X/200µm). Região concentrada de células tumorais (5) ao redor da qual observa-se possível reação desmoplásica do tecido infiltrado e presença de células inflamatórias (6) (E. 30X/20µm). células tumorais fusiformes (7) e infiltração de leucócitos (F. 35X/20µm).

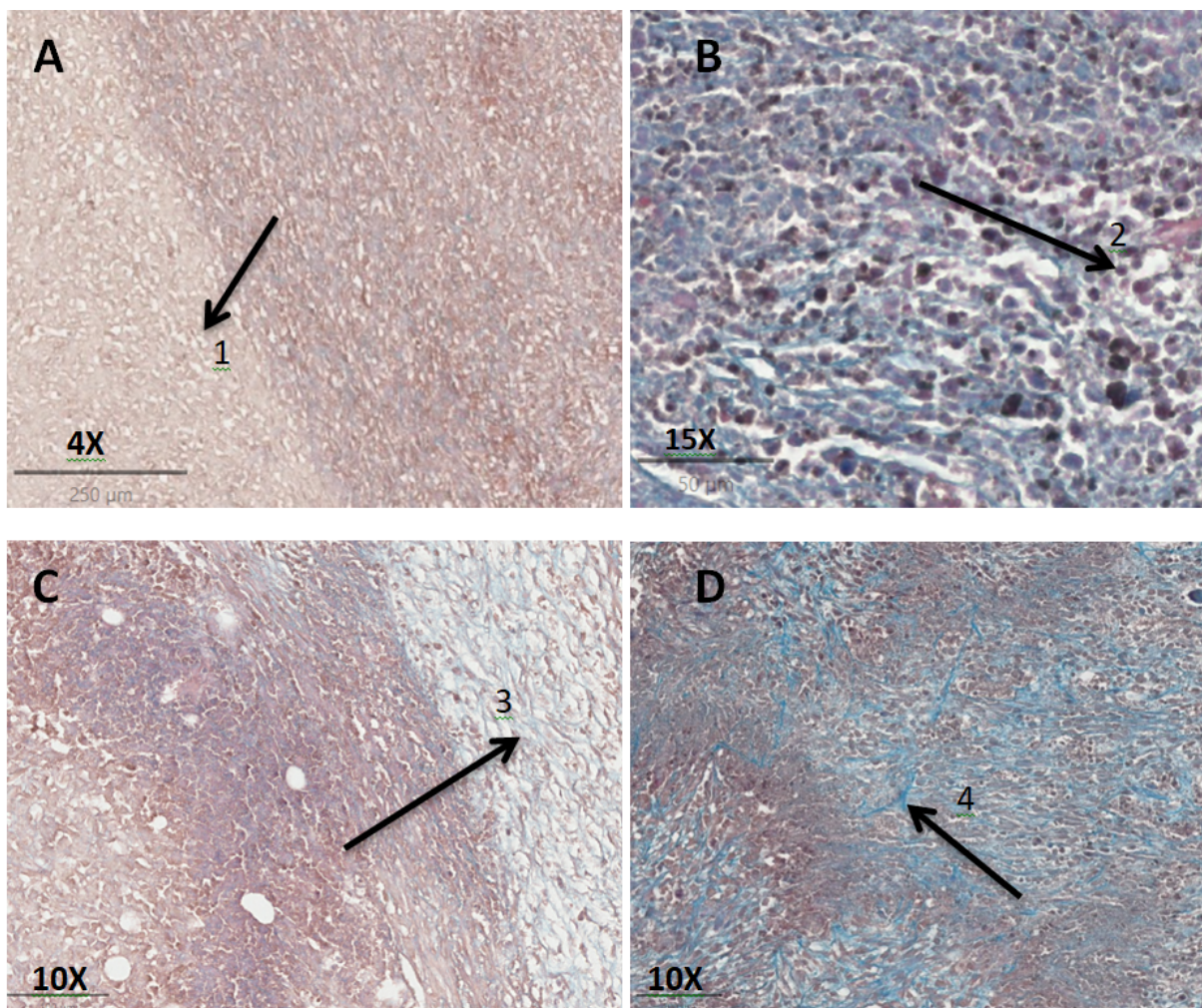
Figura 12: Mitose



Ocorrência de mitose. Fonte: autoria própria. Criada com o auxílio do software QuPath.

Nos cortes histológicos corados com tricrômico de Masson, fica evidente a deposição de fibras colágenas, indicando regiões de fibrose ou reação desmoplásica, comum em tumores invasivos. A coloração tricrômica revelou intensa região de fibrose, e invasão muscular adjacente além de regiões de necrose com infiltração de células imunes, como já observados na coloração por HE.

Figura 13: Regiões dos cortes tumorais corados com Tricrômico de Masson



A coloração tricrômica revelou intensas regiões de fibrose, com fibras de colágeno coradas em azul (3 e 4) (C e D. 10X/100μm), além de regiões de necrose (1) (A. 4X/250μm) com infiltrado de células imunes (2) (B. 15X/50μm), como já observado na coloração por HE. Fonte: autoria própria. Criada com auxílio do software QuPath.

O colágeno, corado em azul, desempenha um papel crucial no tanto no que diz respeito ao suporte estrutural do tumor e na interação entre as células e o microambiente tumoral, explicando sua presença abundante nos cortes tumorais (HAGIOS; LOCHTER; BISSELL, 1998; FATA; WERB; BISSELL, 2004). Além disso, a disposição do colágeno nos tecidos, organizados em faixas e redes, indica que, além do papel estrutural, possa estar desempenhando um papel como guia para a migração tumoral (WANG et al., 2002).

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados do trabalho indicaram sucesso no desenvolvimento de um modelo experimental *in vivo* para câncer de mama triplo-negativo gerado a partir de células 4T1. As análises histológicas permitiram caracterizar qualitativamente os componentes tumorais, bem como a estrutura do tumor primário. Além disso, o comportamento celular agressivo da linhagem 4T1, associada ao modelo *in vivo* imunocompetente, permite o estudo do câncer de mama correspondente a estágios avançados em humanos. As análises histológicas também permitiram observar as características típicas de alta malignidade desse tipo de tumor, como células polimórficas e indiferenciadas, com núcleos grandes e mitoses típicas e atípicas. A ausência de bordas delimitadas e a infiltração em tecidos adjacentes corroboram com a capacidade metastática do tumor descrita na literatura.

Estudos futuros serão realizados visando a comparação entre o modelo de desenvolvimento tumoral descrito neste trabalho com modelo tumoral desenvolvido a partir de células 4T1 silenciadas para a subunidade  $\beta 3$  da integrina  $\alpha v\beta 3$ . Para isso, também serão analisados histologicamente os demais tecidos alvos de metástase. Também serão realizadas análises imuno-histoquímicas para detecção de células endoteliais e consequentemente, a angiogênese.

## REFERÊNCIAS

- ALBY, L.; AUERBACH, R. *Differential adhesion of tumor cells to capillary endothelial cells in vitro. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 81, p. 5739-5743, 1984. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.81.18.5739>.
- ALTEI, W. F. et al. New insights into the discovery of drugs for triple-negative breast cancer metastasis. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2022.
- ARNETH, Borros. *Tumor microenvironment. University Hospital of the Universities of Giessen and Marburg UKGM, Justus Liebig University Giessen*, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers12010001>.
- BALIU-PIQUÉ, M.; PANDIELLA, A.; OCANA, A. Breast Cancer Heterogeneity and Response to Novel Therapeutics. *Cancers*, v. 12, n. 11, p. 3271, 5 nov. 2020.
- BALKWILL, Frances R.; CAPASSO, Melania; HAGEMANN, Thorsten. *The tumor microenvironment at a glance. Journal of Cell Science*, v. 125, n. 23, p. 5591-5596, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1242/jcs.116392>.
- BERGERS, G.; HANAHAN, D. *Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. Nature Reviews Cancer*, v. 8, n. 8, p. 592-603, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrc2442>.
- BELLONI, P. N.; NICOLSON, G. L. *Differential expression of cell-surface glycoproteins on various organ-derived microvascular endothelia and endothelial-cell cultures. Journal of Cell Physiology*, v. 136, p. 398-410, 1988. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcp.1041360306>.
- BEŇAČKA, R. et al. Classic and New Markers in Diagnostics and Classification of Breast Cancer. *Cancers*, v. 14, n. 21, p. 5444, jan. 2022.
- BRIGGS, K. J.; et al. *Paracrine induction of HIF by glutamate in breast cancer: EglN1 senses cysteine. Cell*, v. 166, n. 1, p. 126-139, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.042>.
- CARMELIET, P. *VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. Oncology*, v. 69, Supl. 3, p. 4-10, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1159/000088478>.
- COMOGLIO, P. M.; BOCCACCIO, C.; TRUSOLINO, L. Interactions between growth factor receptors and adhesion molecules: breaking the rules. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 15, n. 5, p. 565-571, out. 2003.
- CRUZ DA SILVA, E.; DONTENWILL, M.; CHOULIER, L.; LEHMANN, M. Role of Integrins in Resistance to Therapies Targeting Growth Factor Receptors in Cancer.

Cancers 2019, 11, 692. 17 mai. 2019

*CANCER GENOME ATLAS NETWORK. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. Nature, v. 490, n. 7418, p. 61-70, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature11412>.*

DANA, H. et al. Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA. International Journal of Biomedical Science : IJBS, v. 13, n. 2, p. 48–57, jun. 2017.

DANILUCCI, T. M. et al. Recombinant RGD-disintegrin DisBa-01 blocks integrin  $\alpha\beta 3$  and impairs VEGF signaling in endothelial cells. Cell Communication and Signaling, v. 17, n. 1, p. 27, 20 dez. 2019.

DANNY R. WELCH; Tumor Heterogeneity—A ‘Contemporary Concept’ Founded on Historical Insights and Predictions. *Cancer Res* 1 January 2016; 76 (1): 4–6. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-3024>.

DE HEER, Ellen C.; JALVING, Mathilde; HARRIS, Adrian L. HIFs, angiogenesis, and metabolism: elusive enemies in breast cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 130, n. 12, p. 5074-5087, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI137552>.

DERAKHSHAN, Fatemeh; REIS-FILHO, Jorge S. Pathogenesis of triple-negative breast cancer. *Annual Review of Pathology*, v. 17, p. 181-204, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-042420-093238>.

DESGROSELLIER, J.; CHERESH, D. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Cancer*, v. 10, p. 9-22, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrc2748>.

DE VISSER, Karin E.; JOYCE, Johanna A. The evolving tumor microenvironment: from cancer initiation to metastatic outgrowth. *Cancer Cell*, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.02.016>.

ERDOGAN, B.; AO, M.; WHITE, L. M.; MEANS, A. L.; BREWER, B. M.; YANG, L. et al. Cancer-associated fibroblasts promote directional cancer cell migration by aligning fibronectin. *Journal of Cell Biology*, v. 216, p. 3799-3816, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.201704053>.

FATA, J. E.; WERB, Z.; BISSELL, M. J. Regulation of mammary gland branching morphogenesis by the extracellular matrix and its remodeling enzymes. *Breast Cancer Research*, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2004.

FERRARA, N. The role of VEGF in the regulation of physiological and pathological angiogenesis. *EXS*, v. 94, p. 209-231, 2005. DOI: [https://doi.org/10.1007/3-7643-7357-2\\_15](https://doi.org/10.1007/3-7643-7357-2_15).

FERRARA, N.; KERBEL, R. S. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*, v. 438, n. 7070, p. 967-974, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature04483>.

FOLKMAN, J. Tumour angiogenesis: therapeutic implications. *The New England Journal of Medicine*, v. 285, n. 21, p. 1182-1186, 1971. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJM197111182852108>.

FOULKES, William D.; SMITH, Ian E.; REIS-FILHO, Jorge S. Triple-negative breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, v. 363, n. 20, p. 1938-1948, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMra1001389>.

FUMAGALLI, C.; BARBERIS, M. Breast Cancer Heterogeneity. *Diagnostics*, v. 11, n. 9, p. 1555, 27 ago. 2021.

GLADSON, C. L.; CHERESH, D. A. Glioblastoma expression of vitronectin and the alpha v beta 3 integrin. Adhesion mechanism for transformed glial cells. *Journal of Clinical Investigation*, v. 88, n. 6, p. 1924-1932, 1 dez. 1991.

GOLDHIRSCH, A.; ALBAIN, K. S.; et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Annals of Oncology*, v. 24, n. 9, p. 2206-2223, 2013.

GREENWELL, John C. et al. Interplay between aging, lung inflammation/remodeling, and fibronectin EDA in lung cancer progression. *Cancer Biology & Therapy*, v. 21, n. 12, p. 1109-1118, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/15384047.2020.1831372>.

HAAKENSEN, V. D. et al. Gene expression profiles of breast biopsies from healthy women identify a group with claudin-low features. *BMC Medical Genomics*, v. 4, n. 1, p. 77, 1 nov. 2011.

HAGIOS, C.; LOCHTER, A.; BISSELL, M. J. Tissue architecture: the ultimate regulator of epithelial function?. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, v. 353, n. 1370, p. 857-870, 1998. DOI: 10.1098/rstb.1998.0250.

HAMIDI, H.; IVASKA, J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nature Reviews Cancer*, v. 18, n. 9, p. 533-548, 12 set. 2018.

HANAHAN, Douglas et al. *Cancer Cell*, v. 21, n. 3, p. 309-322, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.024>.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer discovery*, v. 12, n. 1, p. 31-46, jan. 2022.

HANAHAN, D.; FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, v. 86, n. 3, p. 353-364, 1996. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80108-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80108-7).

HINSHAW, Dominique C.; SHEVDE, Lalita A. The tumor microenvironment innately modulates cancer progression. *Cancer Research*, v. 79, p. 4557-4566, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3962>.

HIROHASHI, S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *The American Journal of Pathology*, v. 153, n. 2, p. 333-339, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65575-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65575-7).

HUNTER, KENT W et al. "Genetic insights into the morass of metastatic heterogeneity." *Nature reviews. Cancer* vol. 18,4 (2018): 211-223. doi:10.1038/nrc.2017.126

HYNES, Richard O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, v. 110, p. 673-687, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00971-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00971-6).

INCA. Estimativa 2023: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: [s.n.].

JAIN, R. K. Normalization of tumour vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*, v. 307, n. 5706, p. 58-62, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1104819>.

KAPLAN, R. N.; RIBA, R. D.; ZACHAROULIS, S.; BRAMLEY, A. H.; VINCENT, L.; COSTA, C. et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*, v. 438, p. 820-827, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature04186>.

KECHAGIA, J. Z.; IVASKA, J.; ROCA-CUSACHS, P. Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 20, n. 8, p. 457–473, 10 ago. 2019.

KEELY, Patricia J. Mechanisms by which the extracellular matrix and integrin signaling act to regulate the switch between tumor suppression and tumor promotion. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, v. 16, n. 3, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10911-011-9226-0>.

LINO, R. L. B. et al. Alphavbeta3 integrin blocking inhibits apoptosis and induces autophagy in murine breast tumor cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, v. 1866, n. 12, p. 118536, 2019.

MAJIDPOOR, Jamal; MORTEZAEI, Keywan. Steps in metastasis: an updated review. *Medical Oncology*, v. 38, n. 3, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12032-020-01447-w>.

MARTIN, K. A.; ABBOTT, B. L.; RIDDELL, M. D.; AZAM, S. A.; GATES, K. L. The contribution of CD44 to the aggressive phenotype of murine breast cancer. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, v. 321, n. 4, p. C618-C630, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00109.2021>.

MITRA, S. K.; SCHLAEPFER, D. D. Integrin-regulated FAK–Src signaling in normal and cancer cells. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 18, n. 5, p. 516–523, out. 2006.

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

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

ORRANTIA-BORUNDA, E. et al. Subtypes of breast cancer. In: MAYROVITZ, H. N. (Ed.). *Breast cancer*. Brisbane (AU): Exon Publications, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.36255/exon-publications-breast-cancer-subtypes>. Acesso em: 13 set. 2024.

PACHANE, B. C.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. 2 The role of  $\alpha\beta 3$  integrin in cancer therapy resistance. 2023.

PASQUALINI, R.; ARAP, W.; McDONALD, D. M. Probing the structural and molecular diversity of tumor vasculature. *Trends in Molecular Medicine*, v. 8, p. 563-571, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(02\)02416-9](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(02)02416-9).

PASQUALINI, R.; RUOSLAHTI, E. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature*, v. 380, p. 364-366, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1038/380364a0>.

PECHEUR, I. et al. Integrin  $\alpha\beta 3$  expression confers on tumor cells a greater propensity to metastasize to bone. *The {FASEB} Journal*, v. 16, n. 10, p. 1266–1268, 2002.

RAMOS, O. H. P. et al. A novel  $\alpha\beta 3$ -blocking disintegrin containing the RGD motive, DisBa-01, inhibits bFGF-induced angiogenesis and melanoma metastasis. *Clinical and Experimental Metastasis*, v. 25, n. 1, p. 53–64, 2008.

SCHAU, D.; MCBRIDE, W. H. Opportunities and challenges of radiotherapy for treating cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, v. 12, n. 9, p. 527–540, 30 set. 2015.

ROSS, M. H. et al. Bone-Induced Expression of Integrin  $\beta 3$  Enables Targeted

Nanotherapy of Breast Cancer Metastases. *Cancer Research*, v. 77, n. 22, p. 6299–6312, 15 nov. 2017.

SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. et al. Snake venom disintegrins and cell migration. *Toxins*, v. 2, n. 11, p. 2606–2621, 2010.

SHIEN, T.; IWATA, H. Adjuvant and neoadjuvant therapy for breast cancer. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, v. 50, n. 3, p. 225–229, 9 mar. 2020.

STEEG, P. S. Targeting metastasis. *Nature Reviews Cancer* Nature Publishing Group, 24 mar. 2016.

TSAI, C.-C.; YANG, Y.-C. S. H.; CHEN, Y.-F.; HUANG, L.-Y.; YANG, Y.-N.; LEE, S.-Y.; WANG, W.-L.; LEE, H.-L.; WHANG-PENG, J.; LIN, H.-Y.; et al. *Integrins and actions of androgen in breast cancer*. *Cells*, v. 12, n. 17, p. 2126, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells12172126>.

TURNER, Kevin M. et al. *Heterogeneity within molecular subtypes of breast cancer*. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, v. 321, n. 2, p. C343-C354, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00109.2021>.

WANG, W. et al. *Single cell behavior in metastatic primary mammary tumors correlated with gene expression patterns revealed by molecular profiling*. *Cancer Research*, v. 62, n. 21, p. 6278-6288, 2002.

WARBURG, O. *On the origin of cancer cells*. *Science*, v. 123, n. 3191, p. 309-314, 1956.

WELCH, D. R.; HURST, D. R. Defining the Hallmarks of Metastasis. *Cancer Research* American Association for Cancer Research Inc., , 15 jun. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Breast cancer. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>. Acesso em: 25 set. 2024.

YIN, L.; DUAN, J.-J.; BIAO, Z.-H.; FAN, C.; KAI, G.-H.; WANG, J.-X. Breast cancer research. *Breast Cancer Research*, v. 22, n. 61, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01296-5>.