

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR

ALINE MARIA MACHADO

**ESTUDO DO EFEITO DE DOXORRUBICINA
COMBINADA COM DISBA-01 SOBRE A MIGRAÇÃO E
TRANSIÇÃO EPITELIAL-MESENQUIMAL EM
CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA**

SÃO CARLOS – SP
2025

ALINE MARIA MACHADO

**ESTUDO DO EFEITO DE DOXORRUBICINA COMBINADA COM DISBA-01
SOBRE A MIGRAÇÃO E TRANSIÇÃO EPITELIAL-MESENQUIMAL EM CÉLULAS
TUMORAIS DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Orientadora: Prof.^a Dra. Heloísa Sobreiro
Selistre de Araújo

SÃO CARLOS-SP
2025

[RESERVADO PARA FICHA CATALOGRÁFICA]



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Aline Maria Machado, realizada em 25/03/2025.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo (UFSCar)

Profa. Dra. Cynthia Aparecida de Castro (UFSCar)

Profa. Dra. Mônica Rosas da Costa Iemma (UNIARA)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

DEDICATÓRIA

“Dedico este trabalho a todas as meninas e mulheres que almejam e se dedicam a fazer ciência no Brasil e na América Latina.”

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a minha família, que sempre me apoiou em todas as decisões que tomei, em especial minha mãe, que em todos os momentos da minha vida sempre esteve ao meu lado. Amo muito a senhora, mãe. Agradeço imensamente ao Lucas, meu companheiro de vida, por todo apoio incondicional e por sempre me colocar para cima em todos os momentos em que não acreditei em mim mesma. A convivência diária com você e com o Bento é o que me fazem continuar, amo muito vocês. Não poderia deixar de agradecer à Lola, que virou estrelinha ano passado, mas que esteve presente em momentos muito importantes da minha vida e nunca será esquecida. Agradeço também aos melhores amigos que a vida poderia ter me dado: Ariane, Danilo, Gil e Weberton (Two dee), obrigada por toda a força, toda parceria e por todos os momentos felizes que compartilhamos.

Um agradecimento especial para a professora Heloísa, por ter me dado a oportunidade de participar do seu laboratório de pesquisa desde a iniciação científica. Obrigada por todo conhecimento e por todas as experiências que tive no laboratório que se tornou meu segundo lar e que tenho grande apreço. Também gostaria de agradecer à técnica Grá por sua companhia diária e por compartilhar sua vida comigo, os dias com você são muito mais leves. Agradeço a todos os queridos que fazem parte do LM BBM e os que por lá já passaram, principalmente as pessoas que criei mais laços sendo elas Ana Nunes, Bruna Casali, Bete Irene, Kelli e Mônica. Aprendi e continuo aprendendo muito com vocês. Agradeço a todos os melhores amigos que o laboratório me deu. Um grande agradecimento para a Gabi, por ter se tornado muito especial em pouquíssimo tempo e que agora já não imagino minha vida sem sua presença. Obrigada por tudo, amiga! Gostaria muito de agradecer também a Ana e Lívia por serem pessoas maravilhosas que entraram na minha vida durante o mestrado e que se tornaram amigas que sei que posso contar e saibam que eu também estarei sempre aqui. À Bianca, agradeço imensamente por toda parceria e auxílio nesses últimos anos, por ter vivido comigo essa experiência intensa e por ter sempre sacadas impressionantes. Obrigada por todo o aprendizado no decorrer de todos esses anos.

Aos parceiros do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, principalmente ao professor Gerson Jhonatan Rodrigues e ao meu grande amigo Luis, agradeço

imensamente por terem cedido o laboratório e cultura celular para que fosse possível a conclusão dos meus experimentos e a finalização deste trabalho. Obrigada, Luis, por sua amizade, por todo o apoio e por me ajudar a suportar este ano com muito café e pizza. Conte comigo sempre!

Gostaria de agradecer à Márcia Cominetti e os parceiros do LABEN, principalmente ao Arthur, Angelina e Marina, que sempre foram muito receptivos e me auxiliaram durante os períodos de mudanças e no fornecimento de uma das linhagens celulares utilizadas nesse trabalho. Vocês três são sensacionais!

Agradeço também ao pessoal do INFABIC, em especial ao Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho por cederem sua infraestrutura para que as imagens de confocal pudessem ser adquiridas.

E também não poderia deixar de agradecer às agências de fomento CAPES e FAPESP que permitiram a execução e funcionalidade dos ensaios que foram efetuados neste trabalho.

"A ciência e a vida cotidiana não podem e não devem ser separadas."

Rosalind Franklin

RESUMO

No câncer de mama, as integrinas $\alpha\beta 3$ estão envolvidas na progressão tumoral e desenvolvimento de metástases, além de atuarem na aquisição de resistência a terapias antineoplásicas. Propomos avaliar os efeitos do tratamento combinado de doxorubicina e DisBa-01, uma desintegrina recombinante obtida de *Bothrops alternatus*, na capacidade migratória, invasiva e na transição epitelial-mesenquimal de células tumorais de mama. Supomos que a o tratamento combinado pudesse potencializar os efeitos do quimioterápico mediante modulações nas interações célula-matriz. Foi realizada a expressão e purificação de DisBa-01, acompanhadas da avaliação de expressão das integrinas αv e $\beta 3$ nos subtipos celulares ER⁺PR⁺ e TNBC. O IC₅₀ de doxorubicina foi determinado, seguido pela avaliação da viabilidade celular mediante tratamento combinado. A análise da migração celular coletiva e individualizada foi conduzida juntamente com a avaliação da transição epitelial-mesenquimal, considerando a atividade de metaloproteinases de matriz (MMPs) e a invasão em matriz de gelatina fluorescente. Para comparar os modelos 2D e 3D de cultivo, foram executados ensaios de internalização de DisBa-01, análises de morfologia e viabilidade celular. Os resultados demonstraram que as células MCF-7 (ER⁺PR⁺) e MDA-MB-231 (TNBC) exibiram perfis distintos de expressão de integrinas αv e $\beta 3$ e respostas diferenciadas à doxorubicina. Em células MCF-7, o tratamento combinado promoveu redução na invasão celular, viabilidade celular e circularidade em modelos bidimensionais. Nos modelos tridimensionais, o mesmo tratamento resultou em esferoides mais coesos para essa mesma linhagem. Em relação às células MDA-MB-231, observou-se redução da invasão, viabilidade celular e circularidade em modelo 2D, além de diminuição da migração celular, tanto individual, como coletiva. Em conclusão, propõem-se que o tratamento combinado de DisBa-01 e doxorubicina apresente efeito aditivo, possibilitando a redução da dosagem do quimioterápico quando em combinação com a desintegrina, o que pode diminuir os efeitos citotóxicos em estudos futuros.

Palavras-chave: câncer de mama; integrinas; transição epitelial-mesenquimal.

ABSTRACT

In breast cancer, $\alpha\beta3$ integrins are involved in tumor progression and the development of metastases, as well as acting in the acquisition of resistance to antineoplastic therapies. We propose to evaluate the effects of the combined treatment of doxorubicin and DisBa-01, a recombinant disintegrin obtained from *Bothrops alternatus*, on the migratory and invasive capacity and epithelial-mesenchymal transition of breast tumor cells. We hypothesized that the combined treatment could potentiate the effects of chemotherapy by modulating cell-matrix interactions. The expression and purification of DisBa-01 was carried out, along with the evaluation of the expression of integrins α and $\beta3$ in ER⁺PR⁺ and TNBC cell subtypes. The IC₅₀ of doxorubicin was determined, followed by assessment of cell viability by combined treatment. The analysis of collective and individualized cell migration was conducted along with the evaluation of epithelial-mesenchymal transition, considering the activity of matrix metalloproteinases (MMPs) and invasion into fluorescent gelatin matrix. To compare the 2D and 3D culture models, DisBa-01 internalization assays, morphology and cell viability analyses were carried out. The results showed that MCF-7 (ER⁺PR⁺) and MDA-MB-231 (TNBC) cells exhibited distinct α and $\beta3$ integrin expression profiles and differentiated responses to doxorubicin. In MCF-7 cells, the combined treatment promoted a reduction in cell invasion, cell viability and circularity in two-dimensional models. In three-dimensional models, the same treatment resulted in more cohesive spheroids for this same lineage. With regard to MDA-MB-231 cells, there was a reduction in invasion, cell viability and circularity in 2D models, as well as a reduction in cell migration, both individually and collectively. In conclusion, it is proposed that the combined treatment of DisBa-01 and doxorubicin has an additive effect, making it possible to reduce the dosage of chemotherapy when combined with disintegrin, which may reduce cytotoxic effects in future studies.

Keywords: breast cancer; integrins; epithelial-mesenchymal transition.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Marcas registradas do câncer	18
Figura 2 - Estatística global da mortalidade feminina decorrente de câncer	20
Figura 3 - Taxa de incidência do câncer de mama no Brasil	21
Figura 4 - Caracterização imunohistoquímica dos subtipos de câncer de mama	22
Figura 5 - Cascata metastática	26
Figura 6 - Microambiente tumoral	28
Figura 7 - Composição da matriz extracelular e suas interações	30
Figura 8 - Cultivo celular 2D e 3D	32
Figura 9 - Família de integrinas	34
Figura 10 - Conformações e sinalização bidirecionais de integrinas.	35
Figura 11 - Desintegrina recombinante DisBa-01	37
Figura 12 - Confirmação da expressão de DisBa-01 durante as etapas de expressão e purificação	53
Figura 13 - Teste de atividade de DisBa-01 mediante ensaio de migração <i>transwell</i>	54
Figura 14 - Etapas da obtenção de DisBa-01 marcada com Alexa Fluor™	56
Figura 15 - Histogramas obtidos por meio da análise da citometria de fluxo	57
Figura 16 - Determinação do IC ₅₀ de doxorrubicina em células MCF-7	59
Figura 17 - Determinação do IC ₅₀ de doxorrubicina em células MDA-MB-231	60
Figura 18 - Ensaio de viabilidade para avaliação do tratamento combinado de doxorrubicina e DisBa-01 em MCF-7	61
Figura 19 - Ensaio de viabilidade para avaliação do tratamento combinado de doxorrubicina e DisBa-01 em MDA-MB-231	62
Figura 20 - Migração <i>transwell</i> em células MCF-7 e MDA-MB-231	63
Figura 21 - Migração <i>wound healing</i> das células MCF-7 e MDA-MB-231	64

Figura 22 - Detecção de atividade de MMPs em ensaio de zimografia em sobrenadantes de MCF-7	65
Figura 23 - Detecção de atividade de MMPs em ensaio de zimografia em sobrenadantes de MDA-MB-231	66
Figura 24 - Ensaio de degradação de gelatina fluorescente em células MCF-7	68
Figura 25 - Ensaio de degradação de gelatina fluorescente em células MDA-MB-231	69
Figura 26 - Registro da formação de esferoides em células MCF-7 e MDA-MB-231	70
Figura 27 - Ensaio de <i>live/dead</i> para a linhagem celular MCF-7 em modelo 2D e 3D	71
Figura 28 - Ensaio de <i>live/dead</i> para linhagem celular MDA-MB-231 em modelo 2D	72
Figura 29 - Morfologia das células MCF-7 em modelos de cultivo 2D e 3D	73
Figura 30 - Morfologia das células MDA-MB-231 em modelos de cultivo 2D e 3D	74
Figura 31 - Ensaio de <i>uptake</i> de DisBa-01 marcada com Alexa Fluor™ 546 em células MCF-7	75
Figura 32 - Ensaio de <i>uptake</i> de DisBa-01 marcada com Alexa Fluor™ 546 em esferoides de MCF-7	76
Figura 33 - Ensaio de <i>uptake</i> de DisBa-01 marcada com Alexa Fluor™ 546 em células MDA-MB-231	77
Figura 34 - Ensaio de <i>uptake</i> de DisBa-01 marcada com Alexa Fluor™ 546 em esferoides de MDA-MB-231	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Anticorpos utilizados nos ensaios de citometria de fluxo e suas especificações.	45
Tabela 2 - Composição do meio de cultivo base para esferoides.	50

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT	proteína quinase B
ANOVA	análise de variância (do inglês: <i>analysis of variance</i>)
ATCC	<i>American Type Cell Culture</i>
ATP	adenosina trifosfato (do inglês: <i>adenosine triphosphate</i>)
BCA	ácido bicinconínico (do inglês: <i>bicinchoninic acid</i>)
BL1	subtipo celular basal 1
BL2	subtipo celular basal 2
BL21 (DE3)	cepa da espécie <i>Escherichia coli</i>
BRCA1	(do inglês: <i>breast cancer gene 1</i>)
BRCA2	(do inglês: <i>breast cancer gene 2</i>)
BSA	soro albumina bovina (do inglês: <i>bovine soroalbumine</i>)
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
CTC	células tumorais circulantes
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DisBa-01	desintegrina obtida de <i>Brothrops alternatus</i>
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco (do inglês: <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>)
DNA	ácido desoxirribonucleico (do inglês: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DO	densidade óptica
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês: <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
EGF	fator de crescimento epidermal (do inglês: <i>epidermal growth factor</i>)
ER	receptor de estrogênio (do inglês: <i>estrogen receptor</i>)
EV	vesículas extracelulares (do inglês: <i>extracellular vesicles</i>)
FAK	quinase de adesão focal (do inglês: <i>focal adhesion kinase</i>)
FBS	soro fetal bovino (do inglês: <i>fetal bovine serum</i>)
FITC	do inglês: <i>fluorescein isothiocyanate</i>
HER2	Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidermal humano (do inglês: <i>human epidermal factor 2</i>)
HIF1 e HIF2	fatores induzidos por hipóxia 1 e 2
IGF-1R	receptor do fator de crescimento 1 semelhante à insulina

ILK	quinase ligada à integrina (do inglês: <i>integrin-linked kinase</i>)
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPTG	do inglês: <i>isopropylthio-β-galactoside</i>
ITGB3	gene que codifica a integrina β3
LAR	receptor de andrógeno luminal
LB	Luria-Bertani
MAPK	proteína quinase ativada por mitógeno
MSL	subtipo celular tronco-mesenquimal (MSL)
PDL	poli-D-lisina
PI	iodeto de propídeo (do inglês: propidium iodide)
PI3K	fosfoinosítido 3-quinase
RTKi	inibidores de tirosina quinases
SDS	dodecil sulfato de sódio (do inglês: <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (do inglês: <i>sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis</i>)
SNAIL	(do inglês: snail family transcriptional repressor 1)
STAT3	Proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 3 (do inglês: <i>signal transducer and activator of transcription 3</i>)
TEM	transição epitelial-mesenquimal
TGF-β	fator de crescimento transformante beta
TME	Microambiente tumoral (do inglês: <i>tumor microenvironment</i>)
TNBC	câncer de mama triplo-negativo (do inglês: <i>triple negative breast cancer</i>)
UNS	subtipo celular instável
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular (do inglês: <i>vascular endothelial growth factor receptor</i>)
VEGFR	receptor de fator de crescimento endotelial vascular (do inglês: <i>vascular endothelial growth factor receptor</i>).

LISTA DE SÍMBOLOS

λ	comprimento de onda
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
%	porcentagem
A.U.	unidade arbitrária
g	grama
IC ₅₀	Concentração Inibitória Média
Kd	constante de dissociação
kDa	quilo-Dalton (10^3 Da)
L	litro
m	metro
M	molar
mg	miligrama (= 10^{-3} g)
mL	mililitro
nM	nanomolar
p	probabilidade estatística
pH	potencial hidrogeniônico
R ²	coeficiente de determinação
rpm	rotação por minuto
V	volt
μg	micrograma (10^{-6} g)
μL	microlitro (10^{-6} L)
μm	micrômetro (10^{-6} m)
μM	micromolar (10^{-6})

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Câncer: compreendendo a doença.....	17
1.2 Câncer de mama.....	19
1.3 Tratamentos para o câncer de mama	24
1.4 Metástase	25
1.5 Microambiente tumoral.....	27
1.6 Matriz extracelular	29
1.8 Integrinas	33
1.9 Desintegrina DisBa-01	36
2 OBJETIVOS	39
2.1 Objetivo Geral.....	39
2.2 Objetivos Específicos	39
3 MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1 Produção recombinante de DisBa-01	40
3.1.1 Transformação e crescimento bacteriano.....	40
3.1.2 Indução da expressão de DisBa-01	41
3.1.3 Purificação por coluna de afinidade e cromatografia líquida	41
3.1.4 Teste de atividade de DisBa-01.....	42
3.1.5 Marcação de DisBa-01 com Alexa Fluor™ 546.....	43
3.2 Cultivo celular.....	44
3.3 Imunofenotipagem celular por citometria de fluxo	44
3.4 Determinação da Concentração Inibitória Média (IC ₅₀) de doxorubicina por ensaio de viabilidade celular.....	45
3.5 Avaliação da viabilidade celular mediante tratamento combinado de doxorubicina e DisBa-01	45
3.6 Ensaios de migração celular.....	46
3.6.1 Migração celular por wound healing.....	46
3.6.2 Migração celular transwell.....	46
3.7 Detecção da atividade de metaloproteinasas de matriz por ensaio de zimografia	47
3.8 Ensaio de morfologia celular	47
3.9 Ensaio de invasão celular em coating de gelatina fluorescente.....	48
3.10 Ensaio de internalização com DisBa-01 marcada com Alexa Fluor™ 546	48
3.11 Verificação da viabilidade celular mediante ensaio <i>live/dead</i>	49

3.12 Cultivo celular 3D	49
3.12.1 <i>Formação dos esferoides de células MCF-7 em moldes de agarose</i>	50
3.12.2 <i>Formação dos esferoides de células MDA-MB-231 pelo método embedded</i>	51
3.12.3 <i>Avaliação morfológica dos esferoides</i>	51
3.12.4 <i>Verificação da viabilidade do cultivo 3D mediante ensaio live/dead</i>	51
3.12.5 <i>Ensaio de internalização de DisBa-01 marcada com Alexa Fluor™ 546 em esferoides</i>	52
3.13 Análise estatística	52
4 RESULTADOS	53
4.1 Obtenção de DisBa-01 purificada e ativa	53
4.2 Marcação efetiva de DisBa-01 com Alexa Fluor™ 546	55
4.3 Células MCF-7 e MDA-MB-231 expressam diferentes níveis de integrinas α e β3	57
4.4 Células MCF-7 e MDA-MB-231 apresentam respostas distintas ao tratamento com doxorrubicina	58
4.5 O tratamento combinado de DisBa-01 e doxorrubicina reduziu a proliferação celular em células ER⁺PR⁺	60
4.6 DisBa-01 reduziu migração celular transwell em ambas as linhagens celulares e o tratamento combinado foi efetivo em células TNBC	62
4.7 DisBa-01 reduziu atividade gelatinase de MMP-2 em células TNBC	65
4.8 Tratamento combinado entre DisBa-01 e doxorrubicina reduziu degradação em gelatina fluorescente para ambas as linhagens celulares	67
4.9 Padronização efetiva no cultivo celular 3D	69
4.10 Aumento de viabilidade em ensaio <i>live/dead</i> mediante tratamento combinado e com DisBa-01 isolada	70
4.11 Modificações morfológicas promovidas por tratamento com doxorrubicina e DisBa-01	72
4.12 Rápida internalização de DisBa-01 em monocamada e cultivo 3D	75
5 DISCUSSÃO	79
6 CONCLUSÃO	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer: compreendendo a doença

Câncer é o nome dado a um vasto grupo de doenças caracterizadas pela proliferação exacerbada de células modificadas, as quais estão sujeitas à evolução por seleção natural, segundo definição proposta por Brown e colaboradores em 2023. As células do organismo podem sofrer mutações e perder o controle sobre a divisão celular, acarretando crescimento descoordenado denominado 'neoplasia' (do grego *neo* = novo, *plasia*= crescimento). Essa proliferação aberrante origina uma massa de células que também pode ser designada como tumor, que pode ser classificado como benigno ou maligno, dependendo de suas características. Quando maligno, o tumor pode ser definido como câncer *in situ* ou câncer invasivo (INCA, 2022).

No câncer *in situ* ou câncer não invasivo, as células anormais estão restritas à camada de tecido de origem a partir da qual se desenvolveu, sem que tenham migrado para outras camadas ou estruturas adjacentes. Durante o estágio em que as células tumorais ainda estão confinadas no local de origem, recebendo a classificação de tumor primário, há a possibilidade de cura se o tratamento ou intervenção cirúrgica forem realizados antes da progressão para o estágio de câncer invasivo (INCA, 2022).

O câncer invasivo, por sua vez, é caracterizado pela proliferação celular aumentada, possibilidade de desprendimento das células e disseminação para outros órgãos e tecidos. Isso ocorre por meio da invasão de tecidos subjacentes e infiltração em vasos sanguíneos e linfáticos. A capacidade invasiva do tumor metastático torna difícil sua erradicação cirúrgica, conferindo maior malignidade e baixas taxas de sobrevida (Massagué; Obenauf, 2016; Fares *et al.*, 2020).

As células cancerosas são resultado da instabilidade genômica, mutacional e reprogramação metabólica; suas características podem ser favoráveis para sua sobrevivência e proliferação, o que prevalece de acordo com os princípios da seleção natural (Hanahan; Weinberg, 2011). Em 2000, Hanahan e Weinberg propuseram que essas vantagens adaptativas resultam em habilidades consideradas como as marcas registradas do câncer, do inglês *hallmarks of cancer* (Figura 1). Dentre estes marcadores, destacam-se a capacidade de evasão de sinais inibidores de

crescimento, manutenção de sinalizações proliferativas e potencial replicativo ilimitado, conjunto de características que contribuem para a progressão tumoral. As células tumorais são capazes de resistir à morte celular programada (apoptose) e induzirem a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes (neoangiogênese), garantindo a captação de nutrientes e propiciando um estado invasivo e metastático. Além disso, são descritas a capacidade de evasão do sistema imunológico e a promoção da inflamação do tumor, sugerindo a ocorrência de pressão seletiva mediada por um microambiente tumoral imunossupressor (Muenst *et al.*, 2016).

Figura 1 – Marcas registradas do câncer.



Marcas registradas ou características de células cancerosas. Fonte: adaptado de Hanahan, 2022.

Recentemente, as marcas registradas do câncer foram redefinidas com a inclusão de novas habilidades de destaque das células tumorais, como o desbloqueio da plasticidade fenotípica, que ocasiona mudanças na diferenciação celular, permitindo o escape do estado de diferenciação terminal e a influência do estado de senescência celular na modulação de células tumorais (Hanahan, 2022). Ademais, é inegável que a progressão tumoral sofra influência de efeitos modulatórios do microbioma intestinal polimórfico e da regulação da expressão gênica por fatores

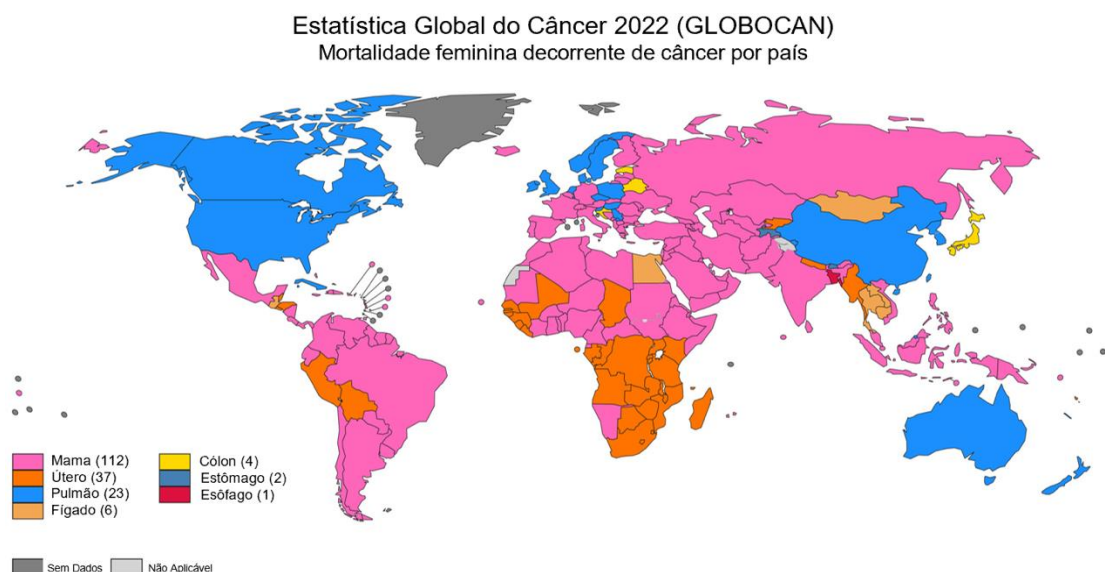
epigenéticos. Estes fatores induzem a reprogramação epigenética não mutacional, a qual confere capacidades funcionais às células transformadas (Helmink *et al.*, 2019; Lu *et al.*, 2020).

Segundo levantamento concluído em 2022 pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer, do inglês *International Agency for Research on Cancer* (IARC), uma em cada cinco pessoas estão sujeitas a desenvolver algum tipo de câncer durante a vida, sendo que 11,1% dos casos que acometem homens e 8,3% dos que acometem mulheres resultam em óbito. O tipo de câncer com maior incidência nos 185 países analisados nesse estudo foi o câncer de pulmão (12,4%), seguido pelo câncer de mama em mulheres (11,6%). Estimam-se novos 35 milhões de casos de câncer em 2050 a nível global, com base em previsões que avaliam o crescimento populacional paralelamente ao avanço da expectativa de vida (Bray *et al.*, 2024).

1.2 Câncer de mama

O câncer de mama possui elevada incidência global, sendo considerado o tipo de câncer mais recorrente e com a maior taxa de mortalidade entre mulheres no mundo, segundo dados acurados em 2022. Em escala mundial, representa o segundo tipo de câncer mais frequente, contando com 23 milhões de casos (11,6%), sendo a quarta maior causa de morte em decorrência de câncer, considerando indivíduos de ambos os sexos (Bray *et al.*, 2024).

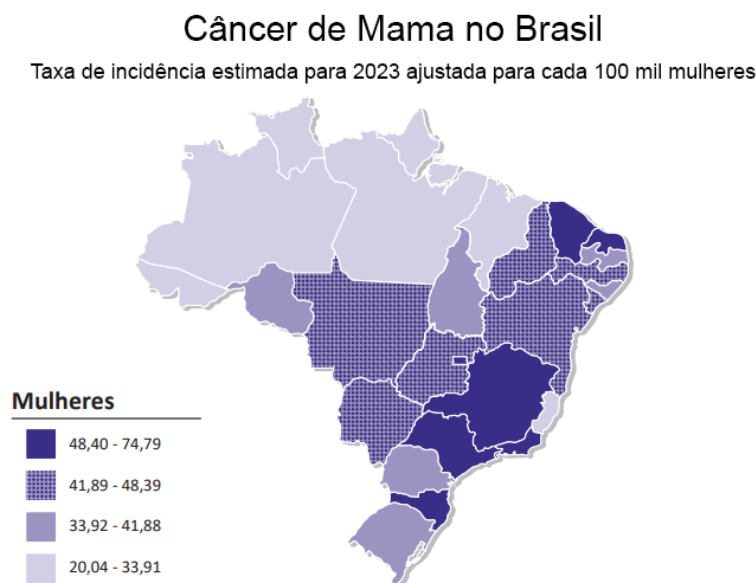
Figura 2 - Estatística global da mortalidade feminina decorrente de câncer.



Mapa evidencia a taxa de mortalidade feminina decorrente de câncer por país. Os países em coloração rosa demonstram locais em que mortalidade por câncer de mama é mais acentuada. Fonte: adaptado de Bray *et al.*, 2024.

A forma metastática da doença é a principal causa de morte por câncer em mulheres e o impacto da taxa de mortalidade acentuada que atinge o gênero feminino se reflete além da saúde pública, impactando em questões sociais. Em âmbito global, houve aumento de órfãos registrados em 2020, em que as causas das mortes maternas foram principalmente resultantes de câncer de mama e câncer cervical (Guida *et al.*, 2022). As taxas de incidência de câncer de mama, em geral, demonstram aumento de registros em países de médio e baixo desenvolvimento, devido às mudanças no comportamento e estilo de vida dos habitantes, aumento populacional e longevidade, assim como pelo diagnóstico precoce promovido pelos programas governamentais (Bray *et al.*, 2024; Duggan *et al.*, 2021) (Figura 2).

No Brasil, o câncer de mama feminino é o tipo de câncer mais recorrente em todas as regiões, sem considerar os tumores de pele não melanoma. A maior taxa de incidência se concentra na região Sudeste do país (Figura 3). Estima-se a ocorrência de cerca de 74 mil novos casos de câncer de mama na população feminina brasileira no triênio de 2023 a 2025 (INCA, 2022).

Figura 3 – Taxa de incidência do câncer de mama no Brasil.

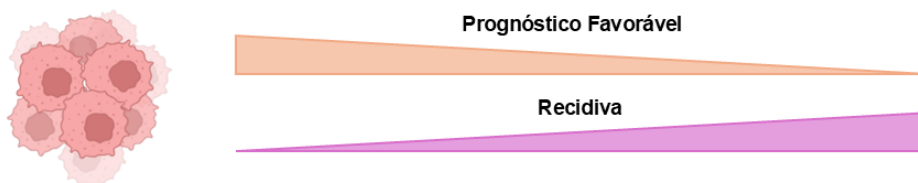
Mapa do Brasil representando as taxas de incidência de câncer de mama por estado. Fonte: adaptado de Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil (INCA, 2022).

O câncer de mama é uma doença heterogênea, sendo categorizada em subtipos moleculares, que se diferem conforme a expressão gênica, taxa de incidência e responsividade aos tratamentos aplicados (Feng *et al.*, 2018). Dentre os subtipos moleculares, classificados com base em técnicas de imunohistoquímica, tem-se o luminal A e luminal B, o fator de crescimento epidermal humano (do inglês, *human epidermal growth factor receptor 2* - HER2) positivo ou enriquecido (HER2+ ou Erb-B2) e o triplo-negativo (TNBC, do inglês *triple negative breast cancer*).

A distinção desses subtipos é realizada com base na expressão de receptores hormonais (Figura 4), tais como receptores de estrogênio (ER), receptores de progesterona (PR) e receptores de fator de crescimento epidermal humano (HER2). Os subtipos também podem ser categorizados devido à presença de citoqueratinas (CK5/6, CK14, C19), índice de proliferação (Ki-67), níveis de claudinas 3/4/7 e grau histológico (Hsu & Hung, 2016; Waks & Winer, 2019; Tsang & Tse, 2020; Beňačka *et al.*, 2022).

Figura 4 - Caracterização imunohistoquímica dos subtipos de câncer de mama.

	Luminal A	Luminal B	HER2+	Triplo-Negativo
<u>ER</u>	+	+	-	-
<u>PR</u>	≥ 20%	≤20%	-	-
<u>HER2</u>	-	Pode ser positivo	+	-
<u>Ki-67</u>	< 14%	≥ 14%	-	-
<u>Grau Histológico</u>	1 a 2	3	3	3



Principais características imunohistoquímicas que diferem os subtipos moleculares de câncer de mama. Fonte: própria, inspirado em dados de (Johnson; Conant; Soo, 2021).

O subtipo luminal A é caracterizado pela presença de receptores ER e/ou PR e ausência de HER2. Apresentam baixa taxa de expressão de Ki-67, marcador de proliferação celular. Sua manifestação clínica é conhecida por apresentar crescimento lento da massa tumoral e melhor prognóstico (Orrantia-Borunda *et al.*, 2022). É o subtipo molecular mais comum, representa entre 30% e 45% dos casos de câncer de mama e possui maior incidência em regiões internas dos ductos mamários (Zerdes *et al.*, 2023). A recidiva desse subtipo de tumor é mais comum a nível ósseo, mas usualmente, é considerado como um subtipo de câncer com altas chances de remissão completa (Matro *et al.*, 2015). O tratamento inicial utilizado para esse subtipo é baseado em terapia endócrina, entretanto, é possível o desenvolvimento de resistência ao tratamento hormonal, sendo necessária a transição para um tratamento baseado em quimioterápicos (Waks; Winer, 2019).

Em contrapartida, o subtipo luminal B é menos comum que o luminal A, representando cerca de 10 a 20% de todos os subtipos luminais, sendo reconhecido por apresentar piores prognósticos e graus histológicos de intermediário a alto (Inic *et al.*, 2014). O luminal B pode ser dividido em dois subgrupos. O primeiro deles é caracterizado pela expressão de receptores ER, alta expressão de Ki-67, expressão de genes relacionados à proliferação e ciclo celular e, além disso, podem ser PR negativos. O segundo pode apresentar, além dos componentes citados, o receptor

HER2 (Cheang *et al.*, 2009). A terapia hormonal e quimioterapia são as mais indicadas nesse subtipo de câncer de mama (Sarhangi *et al.*, 2022).

O subtipo HER2 positivo representa cerca de 10 a 15% dos cânceres de mama e é o mais agressivo em comparação com os subtipos luminais. Pode ser distinguido em dois grupos. O primeiro deles, o luminal HER2, é positivo para ER e PR e apresenta cerca de 15-30% Ki-67. O outro grupo é HER2 enriquecido, o qual é negativo para os receptores ER e PR e apresenta Ki-67 > 30% (Krishnamurti; Silverman, 2014). É considerado altamente invasivo e recidivo, porém o desenvolvimento de terapias direcionadas, como inibidores de tirosina quinases e imunoterápicos, foram fundamentais para a melhora no prognóstico. Cabe ressaltar a possibilidade de realização de cirurgias e quimioterapia de precisão para este subtipo molecular (Wang; Xu, 2019).

O subtipo triplo-negativo, por sua vez, apresenta piores prognósticos em comparação com os subtipos anteriores e menos opções de tratamentos, visto que não há expressão de ER, PR e HER2. O TNBC pode ser dividido em subcategorias heterogêneas entre si, como o tipo basal 1 (BL1), tipo basal 2 (BL2), receptor de andrógeno luminal (LAR), imunomodulatório (IM), mesenquimal (M), tipo tronco-mesenquimal (MSL) e instável (UNS) (Kumar; Aggarwal, 2016).

Os subtipos *basal-like* são os mais comuns, caracterizados pela presença de mutação dos genes BRCA1 e BRCA2, ocorrência de instabilidade genômica e alto índice de proliferação (Deepak *et al.*, 2020). A média de sobrevida de pacientes com TNBC metastáticos ao diagnóstico é de aproximadamente um ano, enquanto para os outros subtipos e para o TNBC inicial a sobrevida é de cerca de cinco anos, a depender da avaliação (Waks; Winer, 2019).

A falta de um tratamento dirigido a um alvo específico limita o tratamento de TNBC à quimioterapia citotóxica, visando a inibição da replicação ou danos no ácido desoxirribonucleico (DNA) e, conseqüente, o impedimento da multiplicação das células malignas. O TNBC metastático em estágio inicial é associado à instabilidade genômica e cromossômica, o que resulta em mal prognóstico, evasão do sistema imune e resistência à quimioterapia (Wein; Loi, 2017).

1.3 Tratamentos para o câncer de mama

O tratamento contra o câncer de mama, de maneira geral, pode ser dividido em tratamento local ou sistêmico. O tratamento local diz respeito à realização de cirurgia e radioterapia para controle da doença no tecido mamário, linfonodos e tecidos circundantes, incluindo também a reconstrução mamária. O tratamento sistêmico, por sua vez, inclui terapias endócrinas ou hormonais, quimioterapia, imunoterapia, terapia gênica e terapia dirigida a um alvo (Mutebi *et al.*, 2020). O tratamento aplicado depende das características do tumor, avaliação da presença de marcadores moleculares e do estágio da doença, também denominado como estadiamento.

Nos estádios I e II, em que os tumores são localizados no tecido de origem e são geralmente pequenos, realiza-se a retirada apenas da massa tumoral ou, em caso de mastectomia, a retirada da mama seguida pela reconstrução mamária (INCA, 2022). O uso de radioterapia pode ser indicado em algumas situações após o procedimento cirúrgico, visando a destruição de células cancerosas remanescentes (Wang; Wu, 2023). O tratamento sistêmico é determinado com base no risco de recorrência do tumor e em características tumorais, como a mensuração de receptores hormonais. Quando presentes, esses receptores orientam a escolha de terapias endócrinas ou terapias biológicas (Pondé; Zardavas; Piccart, 2019).

No estágio III, tem-se tumores maiores e espalhamento para linfonodos próximos. A abordagem terapêutica inicial, é baseada no tratamento sistêmico com aplicação de quimioterápicos e continuidade do tratamento local (Gradishar *et al.*, 2024).

No estágio IV, o paciente apresenta quadro mais grave devido à forma invasiva da doença, caracterizada pela sua extensão para órgãos distantes do organismo e a modalidade terapêutica nesse caso é direcionada e, sobretudo, sistêmica. A escolha da abordagem terapêutica visa conciliar a resposta antitumoral com o prolongamento da sobrevivência do enfermo (O'Sullivan; Loprinzi; Haddad, 2018). Dentre os quimioterápicos utilizados, e principalmente aplicados no tratamento contra TNBC metastático, têm-se cisplatina, palitaxel, tamoxifen e antraciclinas (Bianchini *et al.*, 2022).

A doxorubicina é um fármaco da classe das antraciclinas que tem atuação intercalante no ácido desoxirribonucleico e é capaz de inibir a enzima Topoisomerase

II, impedindo a replicação do material genético, induzindo a formação de radicais livres e a morte celular (Tacar; Sriamornsak; Dass, 2013). Esta antraciclina é um dos agentes quimioterápicos utilizados como neoadjuvante ou adjuvante para complementação dos tratamentos principais contra o câncer de mama, assim como também é aplicada em tratamentos contra TNBC (Ge *et al.*, 2021). Apesar de seus efeitos colaterais, como a cardiotoxicidade, a doxorrubicina é utilizada na terapia contra o câncer, sendo apresentada em novas formulações e administrada em tratamentos combinados, visando redução de efeitos adversos.

A quimioterapia é capaz de induzir a morte de células tumorais e a redução da massa tumoral, mas a quimiorresistência é um obstáculo à eficácia do tratamento, resultando em remissão e óbito de pacientes. As células tumorais podem ser intrinsecamente resistentes antes da aplicação do quimioterápico ou podem ser previamente sensíveis e desenvolverem resistência no decorrer do tratamento (Indra *et al.*, 2021). Os mecanismos pelos quais a resistência se desenvolve são complexos e envolvem diversos fatores que afetam a sensibilidade às drogas, como o metabolismo, alterações em moléculas-alvo, metilação e reparo de DNA, eliminação do fármaco por transportadores e enzimas específicas, além da prevenção da apoptose e indução da transição epitélio-mesenquimal (TEM) (Prihantono; Faruk, 2021).

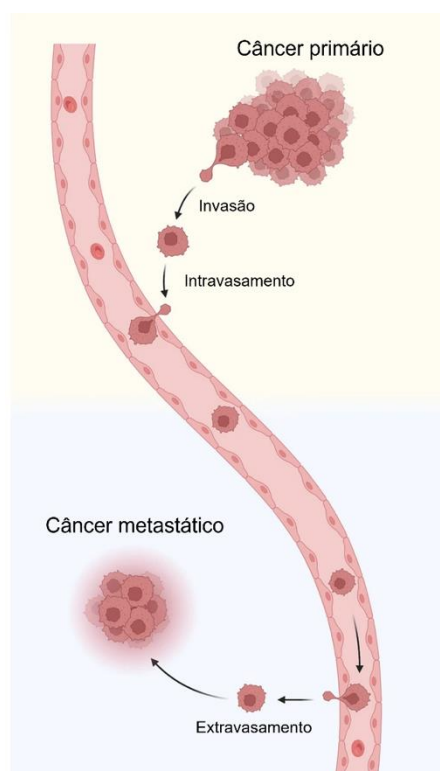
Ainda que a resistência adquirida pelas células tumorais limite a ação de doxorrubicina, é possível sua combinação com demais quimioterápicos e imunoterápicos (Hernandez-Aya; Gonzalez-Angulo, 2013). Estudos demonstram que as interações entre as células tumorais e a matriz extracelular (MEC) podem modular a atuação de drogas antitumorais, tais como a doxorrubicina, através da mediação dos níveis de proteínas pró-sobrevivência. Assim, confirma-se a importância da combinação de abordagens que possam bloquear tais interações somada à atuação do quimioterápico, para que assim, a resistência à terapia também possa ser modulada (Lovitt; Shelper; Avery, 2018)

1.4 Metástase

Metástase é o processo pelo qual as células se desprendem do tumor primário e migram através dos vasos (sanguíneo e linfáticos) para órgãos secundários, caracterizando o câncer metastático ou câncer em estágio IV. A cascata metastática é complexa e envolve uma série de etapas, tendo início com o desprendimento celular

a partir do tumor primário e invasão da lâmina basal (Figura 5) (Gerstberger; Jiang; Ganesh, 2023). Nessa etapa, muitas vias de sinalização são ativadas, há ocorrência de alterações genéticas e metabólicas e as células podem sofrer alterações fenotípicas, como é o caso da transição epitelial-mesenquimal (TEM) (Yang *et al.*, 2020). Durante essa transdiferenciação, as células perdem suas características epiteliais e o perfil de expressão de proteínas é alterado, ocorrendo a diminuição da expressão de E-caderina, relacionada com a promoção de contato célula-célula, e aumento da expressão de N-caderina e vimentina, ambas relacionadas a características mesenquimais. Estas células adquirem uma morfologia fusiforme, tornando-as mais hábeis à disseminação, invasão e migração por meio da matriz extracelular, características essenciais para a progressão tumoral e metástase (Pastushenko; Blanpain, 2019).

Figura 5 - Cascata metastática.



Principais etapas da cascata metastática. Fonte: adaptado de He *et al.*, 2023.

A etapa seguinte da cascata metastática consiste na dispersão e invasão das células tumorais na membrana basal adjacente aos vasos sanguíneos e linfáticos, seguida do intravasamento, em que há a penetração das células no lúmen dos vasos

(Vanharanta; Massagué, 2013). Estas células tumorais circulantes (CTCs) desenvolvem mecanismos de sobrevivência na corrente sanguínea ou linfática até se estabelecerem em um sítio de colonização. Nesse momento do processo, as células estão sujeitas à morte celular por *anoikis*, devido a alterações na hidrodinâmica e ataque de leucócitos. *Anoikis* é o nome dado a uma forma de morte programada que pode ocorrer com células que desancoram da MEC (Raeisi *et al.*, 2022). Além disso, CTCs podem aderir ao endotélio e iniciar seu crescimento no ambiente intraluminal, e assim, formar trombos que são capazes de romper a parede vascular, dando início ao processo de extravasamento.

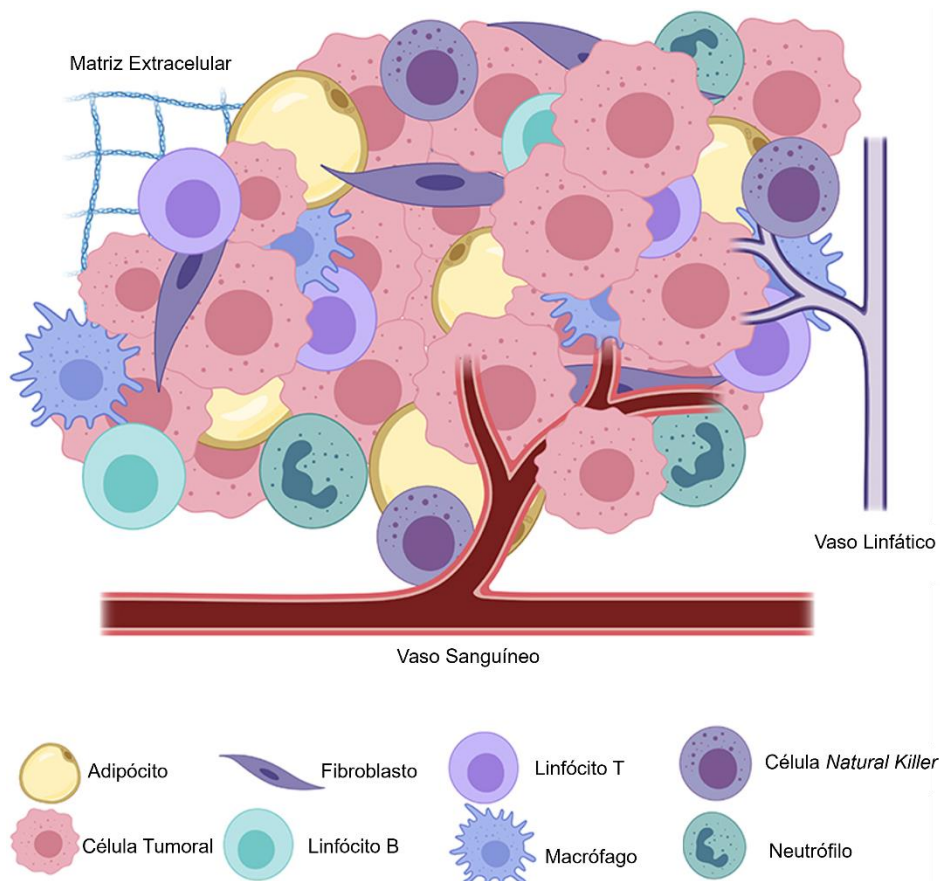
O extravasamento é caracterizado pela saída das células da vasculatura sanguínea e adentramento ao parênquima de um órgão secundário, onde irão formar um nicho pré-metastático. Nessa etapa, ocorrem diversos mecanismos (imunossupressão, ativação de fatores de transcrição, remodelamento da MEC, instauração de rede vascular) para a preparação de um ambiente favorável ao crescimento de células tumorais e constituição de uma micrometástase, propiciando o início da colonização e estabelecimento do tumor secundário (Welch; Hurst, 2019). No câncer de mama, a forma metastática da doença é a principal causa de morte em pacientes e os principais órgãos acometidos pela colonização das células são o pulmão, fígado, cérebro e ossos (Park *et al.*, 2022).

1.5 Microambiente tumoral

Apesar de apresentarem grande heterogeneidade genética e fenotípica, as células tumorais são capazes de se organizar e responder de forma coletiva aos estímulos de seu microambiente tumoral (TME do inglês: *tumor microenvironment*). O TME consiste em um ambiente dinâmico composto por um sistema físico-químico complexo que contém componentes celulares e não celulares (Carmona-Fontaine *et al.*, 2017). Dentre os componentes celulares, além das células cancerosas, fazem-se presentes as células estromais, como as células endoteliais, fibroblastos ou CAFs (do inglês: *cancer-associated fibroblasts*) e células do sistema imunológico, principalmente linfócitos e macrófagos. A matriz extracelular, o pH ácido e moléculas sinalizadoras, tais como citocinas, fatores de crescimento e hormônios, são elementos

não celulares do TME, assim como os vasos sanguíneos e vasos linfáticos circundantes (Figura 6) (Li *et al.*, 2020).

Figura 6 - Microambiente tumoral.



Representação dos constituintes do microambiente tumoral. Fonte: adaptado de Langsten *et al.*, 2019.

As interações que ocorrem no microambiente tumoral propiciam a ativação de fatores de transcrição, resultando na expressão de genes envolvidos na proliferação e migração celular, garantindo a sobrevivência das células cancerosas. Além disso, há a produção de um conjunto de moléculas sinalizadoras responsáveis por criarem um ambiente pró-inflamatório e favorável à progressão tumoral (Benboubker *et al.*, 2022). Dentre essas moléculas, pode-se citar os fatores de crescimento secretados por células do estroma, como fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento transformante beta (TGF- β), além de citocinas, quimiocinas e proteases, como as metaloproteinases de matriz (Wang *et al.*, 2021).

A proliferação acelerada das células malignas resulta em supressão de nutrientes, pH ácido e regiões com níveis de O₂ reduzidas, ocasionando um ambiente hipóxico. Este ambiente é capaz de modular a expressão gênica e o metabolismo celular, o que promove heterogeneidade no microambiente tumoral e direcionamento a um comportamento mais agressivo (Luo *et al.*, 2022).

Assim, as células periféricas possuem maior disponibilidade de gás oxigênio, nutrientes e fatores de crescimento, enquanto as células localizadas internamente são desprovidas das mesmas concentrações desses componentes, culminando em quiescência ou necrose (Forster *et al.*, 2017). Ainda assim, as células tumorais são capazes de se adaptarem ao ambiente hipóxico, promovendo a expressão de fatores induzidos por hipóxia 1 (HIF1- α) e 2 (HIF2- β), os quais induzem a transcrição de genes, tais como o gene de VEGF. Esses fatores estimulam a migração de células endoteliais para regiões com deficiência de O₂ e promovem a instauração da neoangiogênese (De Palma; Biziato; Petrova, 2017).

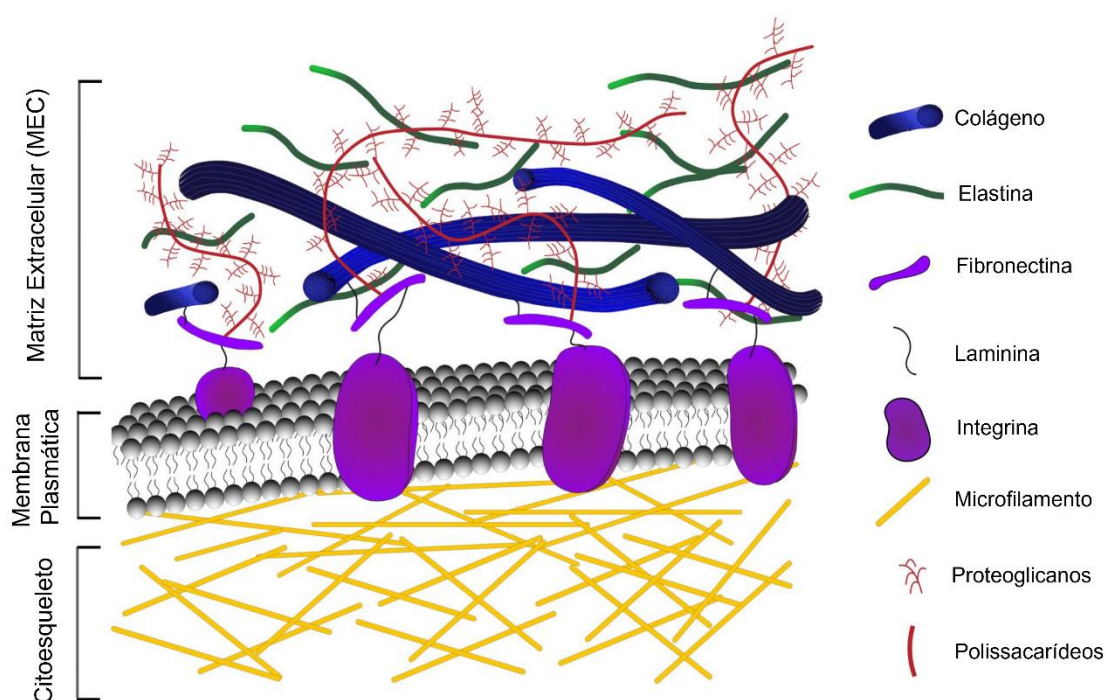
1.6 Matriz extracelular

A matriz extracelular, componente acelular do TME, é uma complexa rede formada por macromoléculas que confere suporte estrutural e bioquímico para as células e tecidos (Figura 7). A MEC é composta essencialmente por água, minerais, proteoglicanos, glicoproteínas e proteínas fibrosas, tais como colágeno, fibronectina, laminina e entactina. Além disso, é considerada um reservatório de fatores de crescimento, citocinas e demais moléculas sinalizadoras (Lepucki *et al.*, 2022).

Esta rede complexa apresenta grande dinamismo, sendo constantemente remodelada, depositada ou degradada durante o desenvolvimento tecidual, como forma de responder a estímulos fisiológicos ou patológicos, visando manter a homeostase do organismo (Cox, 2021). Para que ocorra esse dinamismo e sejam mantidas a composição e organização, a matriz extracelular é altamente regulada. Ademais, desempenha funções cruciais nos processos de adesão celular, migração, proliferação, além de permitir a interação célula-célula e célula-matriz (Huang *et al.*, 2021). Desordens estruturais ou funcionais na MEC perturbam sua dinâmica e podem ocasionar o desenvolvimento de doenças, incluindo o câncer (Walker; Mojares; del Río Hernández, 2018).

O remodelamento da matriz ocasiona novas propriedades mecânicas, funcionais e topológicas. Em contextos patológicos, pode promover o *cross-linking* exacerbado, ou seja, maior formação de ligações covalentes entre moléculas estruturais. O aumento dessas ligações covalentes resulta em maior rigidez da matriz extracelular em microambientes tumorais em comparação com regiões saudáveis, além de alterações em vias de sinalização mediadas por integrinas, proteínas transmembranares de adesão (Ricard-Blum, 2011).

Figura 7 - Composição da Matriz Extracelular.



Representação da composição da matriz extracelular e suas interações. Fonte: adaptado de Poole; Mostaço-Guidolin, 2021.

No câncer de mama, há a perda da polaridade entre células epiteliais mamárias, ocasionando alterações nas interações célula-célula e célula-matriz. Esta última propicia o remodelamento do citoesqueleto, que por sua vez, resulta em alteração na conformação de integrinas (Jayadev; Sherwood, 2017). Estas proteínas de adesão sofrem alterações no reconhecimento de ligantes da matriz, e o aumento na sinalização e clusterização desses receptores pode ocorrer devido um aumento na deposição de colágeno e densidade mamária, características relacionadas a um pior prognóstico. As células transformadas também podem ativar vias de sinalização levando à migração e invasão celular aberrantes, assim como ao aumento da síntese

de enzimas que degradam componentes de matriz, tais como elastases e metaloproteinases de matriz (MMPs), as quais são abundantes em tecidos tumorais e se destacam por favorecerem a cascata metastática (Naba, 2024).

As MMPs são grupos de endopeptidases que clivam ligações peptídicas não terminais e necessitam de íons zinco (Zn^{2+}) para desempenhar sua atividade enzimática, sendo capazes de degradar moléculas constituintes da membrana basal e da matriz extracelular (Gonzalez-Avila *et al.*, 2019). As MMP-2 e MMP-9 são exemplos de metaloproteinases do tipo gelatinases e estão associadas à capacidade de degradar gelatina e, principalmente, colágeno tipo IV. Devido a essas características, elas estão relacionadas à proliferação celular e favorecimento da metástase, devido seus níveis de expressão serem aumentados durante a transição epitelial-mesenquimal (Das; Amin; Jha, 2021). Ainda, essas gelatinases são capazes de degradar outras proteínas depositadas na MEC, como colágeno tipo V, tipo VIII, tipo X, tipo XI e tipo XIV; e liberar fatores de crescimento que promovem a angiogênese tumoral (Laronha; Caldeira, 2020).

1.7 Cultivo celular 2D e 3D

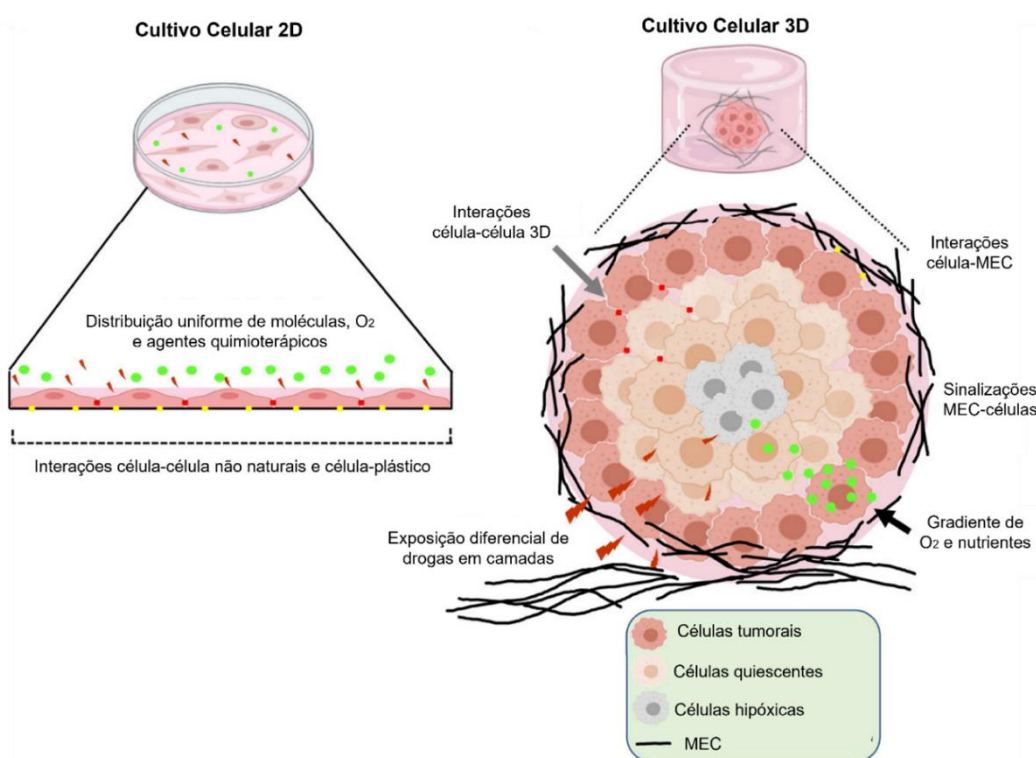
Ao buscar compreender os mecanismos do desenvolvimento do câncer *in vitro*, utilizam-se modelos de estudo em monocamada ou bidimensionais (2D) e tridimensionais (3D) (Figura 8), os quais são aplicados em diferentes abordagens para avaliar a interação célula-célula e célula-matriz, apresentando suas respectivas vantagens e limitações (Salinas-Vera *et al.*, 2022).

O cultivo de células em modelo bidimensional (2D) é baseado na adesão celular em superfícies rígidas e planas, sendo elas normalmente confeccionadas com polietileno ou materiais vítreos (Baker; Chen, 2012). Neste modelo, a disposição das células permite que todas recebam os nutrientes presentes no meio cultivo de maneira uniforme, favorecendo o crescimento e proliferação homogênea. Dessa forma, as células são capazes de estabelecer maior contato com o substrato e meio nutritivo, resultando em polarização, fazendo com que a propagação ocorra em plano horizontal, o que não é observado em condições fisiológicas. Além disso, as células em monocamada exibem mudanças em sua morfologia devido à disposição em que estão, e esse fator pode ocasionar modulações em seu comportamento. Dentre essas

mudanças, pode-se destacar as alterações na estrutura da cromatina, que por sua vez, possibilitam mudanças na expressão gênica (Vergani; Grattarola; Nicolini, 2004; Fontoura *et al.*, 2020).

Ainda assim, o cultivo celular bidimensional é um modelo bem estabelecido, sendo aplicado em estudos desde os anos 1900 e que permite relativa agilidade na execução de experimentos e alta reprodutibilidade (Ferreira; Gaspar; Mano, 2018). Ademais, trata-se de uma abordagem de baixo custo quando comparada com outros modelos, sendo amplamente utilizada para investigar aspectos relacionados à biologia celular, morfologia, citologia e diferenciação celular, bem como modificações comportamentais em nível celular frente às condições experimentais impostas (Abuwatfa; Pitt; Hussein, 2024).

Figura 8 - Cultivo celular 2D e 3D.



Comparativo entre cultivo celular 2D e 3D. Fonte: adaptado de Salinas-Vera *et al.*, 2022.

O cultivo tridimensional (3D), por sua vez, é um modelo *in vitro* mais complexo que no estudo do câncer, mimetiza com maior precisão o microambiente tumoral. Sua composição mais realista - devido à incorporação de elementos da matriz extracelular, interações entre células e células-matriz, distribuição de O₂ e de nutrientes - busca

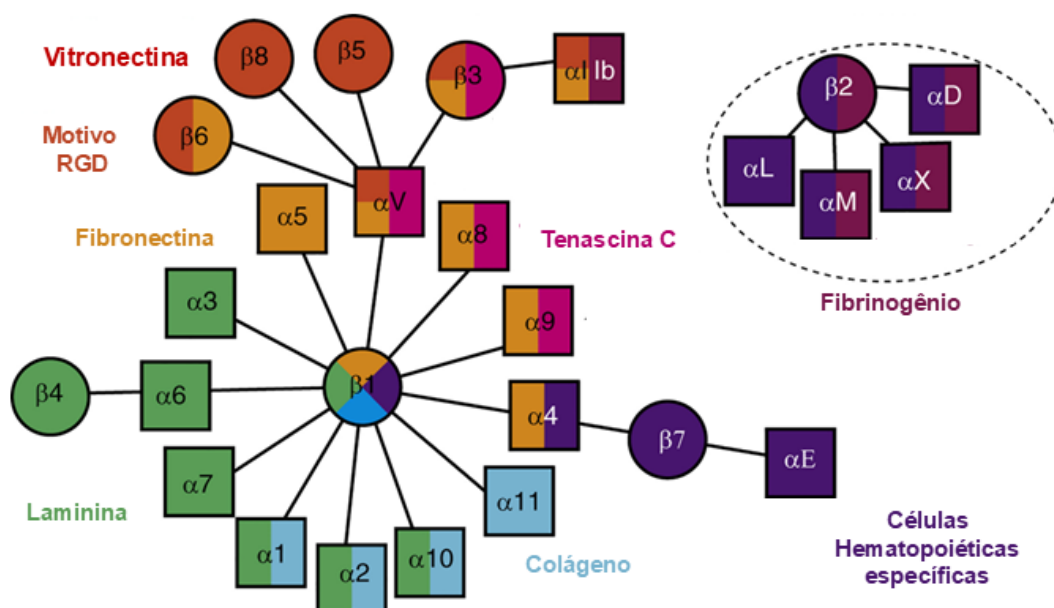
reproduzir o que é observado em tumores sólidos. Entretanto, a aplicação desse método requer maior investimento de recursos, apresenta menos reprodutibilidade e maior limitação no escalonamento de ensaios. Além disso, não há uma plataforma padronizada ou universal, o que permite diversas abordagens para a formação de esferoides, que se dividem em duas grandes categorias, sendo baseadas ou não baseadas em suportes ou *scaffolds*. Ainda assim, os estudos em modelo 3D são eficientes para a avaliação do perfil de difusão de drogas, comportamento tumoral e resposta a terapias (Lovitt; Shelper; Avery, 2014; Verjans *et al.*, 2018).

Os modelos de estudo disponíveis atualmente ainda possuem restrições e esse fato não se limita apenas aos modelos *in vitro*. Os experimentos *in vivo* também requerem altos custos e o metabolismo de animais geralmente homogêneos (originados de cruzamentos parentais) podem não representar fidedignamente a fisiologia e heterogeneidade descrita em *Homo sapiens* (Poornima *et al.*, 2022). Assim, cabe ao pesquisador avaliar qual abordagem é mais adequada para responder às hipóteses formuladas, levando em consideração o tempo e recursos disponíveis.

1.8 Integrinas

A interação célula-matriz, e a consequente ativação de vias de sinalização resultantes dessa interação, é mediada por receptores celulares de adesão denominados integrinas. As integrinas se configuram como heterodímeros transmembranares, formados por subunidades α e β , das quais existem 18 e 8 variantes, respectivamente, resultando em 24 subunidades conhecidas, as quais se combinam entre si (Figura 9)(Li *et al.*, 2021). Esses receptores são capazes de reconhecer uma ampla gama de ligantes constituintes da MEC por meio de seu domínio extracelular, e são classificados com base nessa afinidade. Pode-se citar as integrinas que possuem afinidade pelo motivo RGD (Arginina, Glicina, Ácido Aspártico), receptores de colágeno, fibronectina, laminina, vitronectina, dentre outros ligantes, como constituintes de venenos de serpentes e patógenos (Nieberler *et al.*, 2017).

Figura 9 - Família de integrinas.



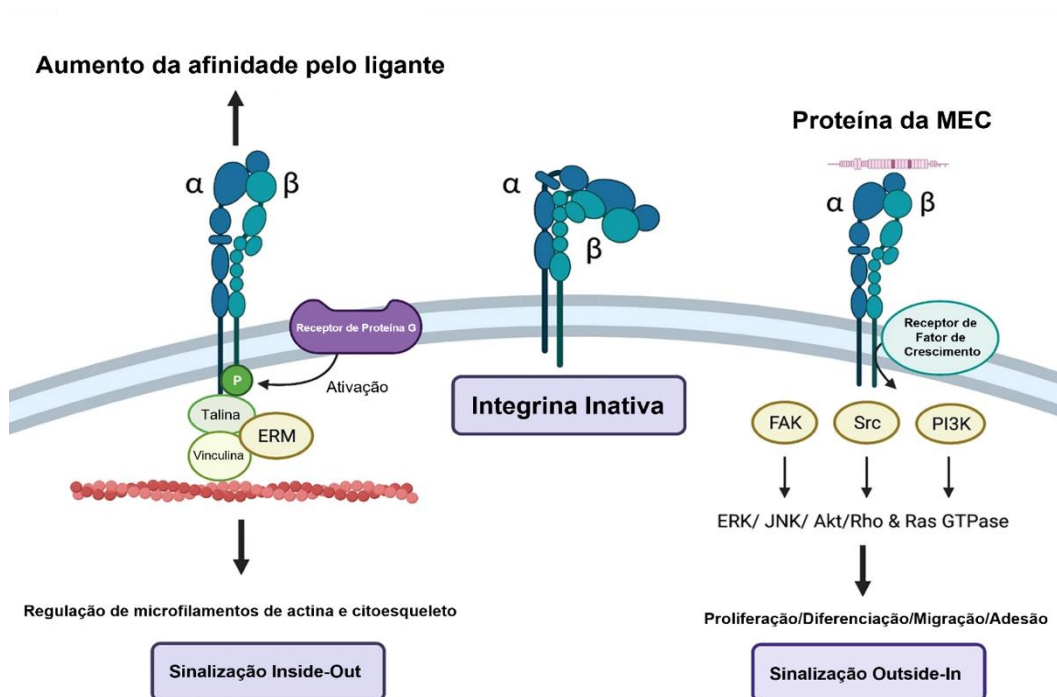
Representação da família de integrinas e seus respectivos ligantes. Fonte: adaptado de Chastney; Conway; Ivaska, 2021.

O reconhecimento e interação com moléculas presentes na matriz extracelular permite que as integrinas convertam sinais mecânicos em sinais bioquímicos, que se desdobram em seu domínio citoplasmático, interagindo com proteínas constituintes do citoesqueleto. Essas interações evidenciam que esses receptores realizam uma transdução bidirecional de sinais através da membrana plasmática (Figura 10) (Kadry *et al.*, 2020). Ao se ligarem aos componentes da MEC, as integrinas recrutam diversas quinases intracelulares, principalmente a quinase de adesão focal (FAK), o proto-oncogene tirosina quinase (Src), proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), cujas vias de sinalização se cruzam com aquelas disparadas pela ativação de receptores tirosina quinase de fatores de crescimento, como o receptor de fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR) e o receptor do fator de crescimento 1 semelhante à insulina (IGF-1R) (Cruz da Silva *et al.*, 2019).

As integrinas constituem uma maquinaria complexa e dinâmica que regula aspectos cruciais moduladores do comportamento celular, como a migração, diferenciação, sobrevivência e polaridade. Entretanto, a desregulação no processo de adesão ou sinalizações aberrantes mediadas por essas proteínas, ocasionam desordens como o câncer.

A superexpressão dessas moléculas se relaciona com a progressão tumoral, por serem facilitadoras dos processos de intravasamento e extravasamento na cascata metastática, além de garantirem a sobrevivência das células tumorais no sistema circulatório. A plasticidade e *crosstalk* entre integrinas, ou seja, a interação de vias de sinalização, também é relacionada ao aumento da migração celular, protusões e resistência a drogas em tumores sólidos (Hamidi; Ivaska, 2018).

Figura 10 - Conformações e sinalização bidirecionais de integrinas.



Representação das conformações adotadas pelas integrinas e capacidade de sinalização bidirecional.

Fonte: adaptado de (Dhaliwal; Shepherd, 2022).

A integrina $\alpha\beta_3$, que reconhece proteínas com motivo RGD, tais como vitronectina e fibronectina, propiciam o aumento da migração e invasão celular, resultando em menores taxas de sobrevivência de pacientes com câncer de mama, melanoma e carcinoma de cólon (Li *et al.*, 2021). A superexpressão desse heterodímero também está relacionada à ativação de Src, relacionada à resistência à *anoikis*, fenótipo indiferenciado e promoção da metástase no câncer de mama e câncer de pulmão.

O gene *ITGB3*, responsável por codificar a subunidade β_3 , tem sua expressão e ativação facilitada em ambientes hipóxicos e ácidos, que são característicos dos

tecidos tumorais. Ademais, durante a transição epitelial-mesenquimal induzida pelo fator de transformação do crescimento *beta* (TGF- β), o gene *ITGB3* é regulado de maneira positiva, aprimorando a invasão e migração (Zhu *et al.*, 2021).

A integração das vias de sinalização de integrinas e de fatores de crescimento tipo tirosina quinase desempenha um papel fundamental na progressão tumoral, bem como na resistência às quimioterapias, radioterapias e terapias dirigidas a um alvo (Cruz Da Silva *et al.*, 2019). Os receptores tirosina quinase são os alvos de uma classe de inibidores, os RTKis, os quais apresentam excelentes resultados em termos de aumento de sobrevida e controle da progressão de câncer de mama HER2 positivo (Pottier *et al.*, 2020). Nos últimos cinco anos, estudos têm destacado o papel das integrinas na resistência às terapias com inibidores de tirosina quinases (RTKis), evidenciando que a resistência adquirida a esses inibidores está diretamente relacionada com o aumento da expressão da integrina $\alpha\beta3$ (Nagpal *et al.*, 2023). Tem-se também verificado que a inativação do eixo integrina $\alpha\beta3$ /FAK/PI3K/AKT pode reverter a TEM bem como a resistência à cisplatina em células de tumor de mama (Luo *et al.*, 2018), demonstrando como sua atuação é importante na aquisição de resistência. Além disso, estudos demonstram que a integrina $\alpha\beta3$ regula a expressão de MMP-2 e MMP-9 e que ambas metaloproteinases de matriz estão envolvidas na quimiorresistência induzida por TEM (Casali *et al.*, 2022; Tune *et al.*, 2022).

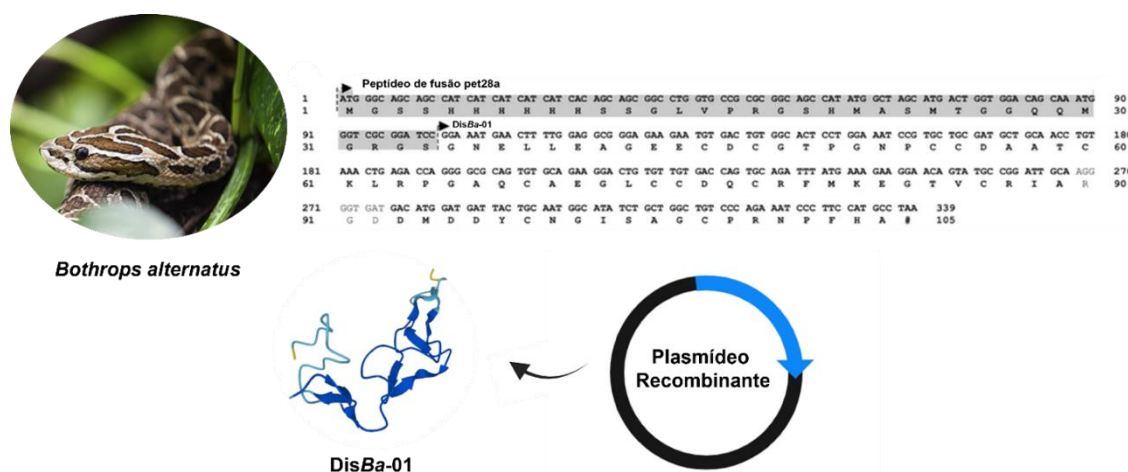
1.9 Desintegrina DisBa-01

As desintegrinas são pequenas proteínas encontradas em veneno de serpentes pertencentes à família *Viperidae* e são liberadas após processamento proteolítico por metaloproteinases (SVMPs, do inglês Snake Venom Metalloproteinases). Estudos recentes também postulam sua presença em organismos hematófagos, como carrapatos, sanguessugas e vermes (Kolvekar *et al.*, 2023).

Nosso grupo de pesquisa, o Laboratório Multiusuário de Bioquímica e Biologia Molecular (LMBBM), estuda um inibidor da integrina $\alpha\beta3$ denominado DisBa-01, uma desintegrina recombinante obtida de *Bothrops alternatus*, espécie popularmente conhecida como urutu ou urutu cruzeiro. DisBa-01 é derivada por processamento proteolítico de um precursor membro da classe P-IIa, caracterizada por possuir

domínio metaloproteinase e desintegrina. Além disso, possui o motivo RGD, o qual garante sua alta afinidade à integrina $\alpha\beta_3$ ($K_d = 7,62 \times 10^{-5} \text{ M}$), como confirmado por meio de ensaios de ressonância plasmônica (Selistre-de-Araujo *et al.*, 2010; (Montenegro *et al.*, 2017). No trabalho de Ramos e colaboradores em 2008, bibliotecas de cDNA foram obtidas da glândula venenifera da serpente e o produto de PCR obtido foi clonado e inserido em plasmídeo. O vetor produzido foi utilizado na transformação de uma cepa bacteriana, viabilizando a purificação dos primeiros lotes da proteína recombinante (Figura 11).

Figura 11 - Desintegrina recombinante DisBa-01.



Representação da desintegrina DisBa-01 e sua origem. Fonte: própria, imagens extraídas de Butantã, Biorender e Ramos *et al.*, 2008.

Em ensaios *in vivo*, a desintegrina demonstrou propriedades antineoangiogênicas, antimetastáticas e antitrombóticas. Em experimentos *in vitro*, mostrou-se capaz de inibir a migração de diversas linhagens celulares em modelos controlados em normóxia e hipóxia, ou seja, em níveis normais de oxigênio e diminuição do aporte desse gás, respectivamente (Ramos *et al.*, 2008; Casali *et al.*, 2022).

Estudos anteriores do nosso grupo contribuíram para o conhecimento do papel biológico da integrina $\alpha\beta_3$, demonstrando que a inibição desse receptor bloqueia a ativação de MMP-2 na superfície celular, e com isso a migração é prejudicada e as células com bloqueio da integrina $\alpha\beta_3$ perdem a direcionalidade do movimento

celular, por meio da formação de adesões mais estáveis (Montenegro *et al.*, 2012; Montenegro *et al.*, 2017). Estas células não desaderem completamente da matriz e nem morrem por perda de adesão, ao contrário, ativam o programa de autofagia quando tratadas com DisBa-01 (Lino *et al.*, 2019).

Verificou-se que a integrina $\alpha\beta3$ 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). Constatou-se que a inibição da integrina $\alpha\beta3$ reduz a comunicação de células tumorais de mama TNBC (linhagem MDA-MB-231) com células não malignas de epitélio mamário (linhagem MCF10A) *in vitro*, levando a uma visível redução de vesículas extracelulares (EVs, do inglês *extracellular vesicles*) presentes no meio extracelular, além da inibição da via endossomal de síntese de exossomos (Altei *et al.*, 2020).

Estudos recentes demonstraram que o bloqueio da integrina $\alpha\beta3$ foi capaz de restaurar a morte celular por ferroptose em células de tumor de mama HER2⁺ resistentes ao tratamento induzido por RTKis (Nagpal *et al.*, 2023). De forma similar, Lovitt e colaboradores em 2018 demonstraram que o bloqueio da integrina $\beta1$ resultou em aumento da eficácia do tratamento com doxorrubicina em células MDA-MB-231.

Tendo em vista que o bloqueio de interações célula-matriz por meio de integrinas é capaz de mediar a efetividade de tratamentos sistêmicos, pretende-se neste trabalho avaliar os efeitos da combinação de DisBa-01 e doxorrubicina em células de tumorais de mama. Busca-se avaliar os efeitos do tratamento combinado frente a fenótipos celulares distintos, utilizando as linhagens MCF-7 (Luminal A) e MDA-MB-231 (TNBC), e analisar os efeitos em modelos de cultivo 2D e 3D, os quais diferem na exposição diferencial de drogas e na interação célula-matriz, processos que envolvem atuação de receptores de adesão, especialmente as integrinas. Nossa hipótese se baseia na premissa de que o bloqueio de vias de sinalização que envolvem a integrina $\alpha\beta3$ possa influenciar a resposta celular ao quimioterápico, aumentando sua eficácia. Supõe-se que os efeitos de doxorrubicina, ao nível do material genético, somado aos de DisBa-01, que atuam na migração, invasão e transição epitelial-mesenquimal, possam exercer uma ação complementar e mais potente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do tratamento combinado de doxorubicina e DisBa-01, um inibidor da integrina $\alpha\beta3$, na capacidade migratória e na transição epitelial-mesenquimal de células tumorais de mama dos subtipos ER⁺PR⁺ e TNBC em modelos 2D e 3D.

2.2 Objetivos Específicos

1. Determinar os níveis de expressão das integrinas $\alpha\upsilon$ e $\beta3$ nas células MCF-7 e MDA-MB-231 por citometria de fluxo.
2. Estabelecer a concentração inibitória média (IC₅₀) de doxorubicina por meio do ensaio de proliferação celular por resazurina, na presença e ausência de DisBa-01.
3. Verificar a migração celular pelos métodos *transwell* e *wound healing* nos cultivos 2D após tratamento com DisBa-01 combinada com doxorubicina.
4. Analisar a atividade de metaloproteinases de matriz MMP-9 e MMP-2 por meio de ensaios de zimografia, após bloqueio da integrina $\alpha\beta3$ por DisBa-01 combinada ao tratamento com doxorubicina.
5. Avaliar a capacidade invasiva e alterações morfológicas das células mediante o tratamento combinado em ensaio de degradação em gelatina fluorescente.
6. Avaliar a viabilidade celular e morfologia do cultivo celular tridimensional (3D) mediante tratamento com a desintegrina e doxorubicina.
7. Examinar a internalização de DisBa-01 marcada com Alexa Fluor™ 546 em modelos de cultivo 2D e 3D mediante adição ou não do quimioterápico.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Produção recombinante de DisBa-01

3.1.1 Transformação e crescimento bacteriano

Os métodos empregados para a expressão e purificação de DisBa-01 foram descritos por Ramos e colaboradores em 2008. Neste trabalho, iniciou-se com a transformação da cepa *Escherichia coli* BL21 (DE3) fazendo uso de plasmídeo pET28a contendo sequência codificadora de DisBa-01. As primeiras etapas consistiram na preparação das células competentes, em que o pré-inóculo de uma colônia isolada foi centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C e o *pellet* resultante foi ressuspendido em solução gelada de CaCl₂ 100 mM. A mistura foi incubada a 4°C por 20 minutos, seguida de nova centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos a 4°C e o *pellet* resultante foi ressuspendido em mesma solução de cloreto de cálcio. Na etapa de transformação, misturou-se as células competentes com o plasmídeo pET28a, anteriormente isolado com o *kit* Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), durante 30 minutos a 4°C. Realizou-se choque térmico, com incubação a 42°C por 2 minutos, seguido pela incubação a 4°C por 2 minutos. Em seguida, adicionou-se 4:1 do volume de células competentes em meio de cultivo Luria Bertani Broth (LB Broth) (L3397, Sigma-Aldrich) para agitação em shaker (TE-422, TECNAL) a 250 RPu por 1h a 37°C, visando o crescimento celular. As células transformadas foram inoculadas em placas de Petri com auxílio de alça de Drigalski em meio sólido LB Agar (L3272, Sigma-Aldrich) contendo o antibiótico seletivo kanamicina (30 mg/mL) e mantidas em 37°C para crescimento bacteriano *overnight*.

Visando confirmar se a transformação havia sido efetiva, uma alíquota das células bacterianas foi submetida à *miniprep* para extração do DNA plasmidial, sendo diluídas em meio LB Broth seletivo. As amostras foram homogeneizadas com tampão de amostra (5:1) e aplicadas em gel de agarose (0,3 g agarose, 30 mL Tampão TBE 1x, 1µL Brometo de Etídio) submetido à corrente de 100 V por 20 minutos. O gel foi fotodocumentado utilizando o equipamento ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad) e o filtro *Ethidium Bromide*.

Após confirmada a transformação, prosseguiu-se com o isolamento para uma nova placa de Petri pelo método de estriamento. No dia seguinte, escolheu-se a maior colônia e mais isolada para a preparação de pré-inóculo em meio líquido LB Broth, o qual foi mantido a 250 RPu, 37°C durante 16h-18h. A partir do pré-inóculo, foi realizada a expansão bacteriana para 2 L de meio de cultivo, e o crescimento das células foi acompanhado mediante leitura em 660 nm no espectrofotômetro, almejando o alcance de densidade óptica (DO) entre 0,4 e 0,6, indicativo da fase log de crescimento.

3.1.2 Indução da expressão de DisBa-01

A expressão de DisBa-01 foi induzida por mediante uso de IPTG 0,5 mM (Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo) durante 3h, seguida por centrifugação a 5000 rpm por 7 minutos a 4°C (Sorvall® RC5C Plus, Kendro Laboratory 9 Products, rotor GSA) e o *pellet* gerado foi homogeneizado em tampão de ligação (Imidazol 5 mM, NaCl 0,5 M, Tris 40 mM, pH 7,9). Para a lise bacteriana e extração do conteúdo citoplasmático, a amostra foi submetida a 8 pulsos sônicos (Vibra cell, Sonics and Materials) com intervalos de 1 minuto, seguidos pela centrifugação por 15 minutos, 13000 rpm a 4°C (Sorvall® RC5C Plus, Kendro Laboratory Products, rotor SS-34). A amostra foi ressuspendida em tampão de ligação acrescido de Ureia (Tris 40 mM, NaCl 0,5 M, Ureia 6 M, Imidazol 5 mM, pH 7,9) e mantida em agitação a 4°C durante 1h. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 13000 rpm por 15 minutos a 4°C (Sorvall® RC5C Plus, Kendro Laboratory Products, rotor SS-34) e o sobrenadante resultante, contendo a proteína de interesse, foi filtrado para tubos cônicos estéreis.

3.1.3 Purificação por coluna de afinidade e cromatografia líquida

O lisado bacteriano foi purificado por cromatografia em coluna de afinidade (HIS-Select® Nickel Affinity Gel, Sigma Aldrich®), a qual foi equilibrada com tampão de ligação acrescido de Ureia. Após a aplicação da proteína na coluna, o tampão de eluição (Tris 40 mM, NaCl 0,5 M, Imidazol 250 mM, pH 7,9) foi aplicado, permitindo a eluição de DisBa-01 devido à competição pela resina com o componente Imidazol. A amostra foi dialisada em membrana de nitrocelulose (Spectra/Por® Membrane MW: 6-8,000; Spectrum Labs, Repligen) em Ureia 3 M e em Tris 20 mM, respectivamente.

O conteúdo proteico foi concentrado para 1 mL (Eppendorf, Concentrator Plus) e então submetido à segunda etapa de purificação em cromatografia de troca aniônica (Mono-Q 5/50 GL, GE Healthcare Life Sciences) em um sistema de alta performance (ÄKTA® Pure, GE Healthcare). A coluna foi equilibrada com tampão A (Tris 20 mM, pH 8,6) e para a competição entre cargas e eluição da proteína de interesse, procedeu-se com a eluição por gradiente pela adição do tampão B (Tris 20 mM, NaCl 1 M, pH 8,6). A liberação da proteína pôde ser acompanhada mediante cromatograma gerado. A expressão de DisBa-01 foi acompanhada após cada etapa da purificação, por meio da confecção de géis SDS-PAGE 15%, os quais foram corados com *Coomassie Brilliant Blue* (0,25% brilliant blue, 50% isopropanol, 10% ácido acético) e lavados com solução descorante (10% ácido acético, 10% metanol) para visualização das bandas e registro por meio do filtro Comassie Blue no fotodocumentador ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad).

O conteúdo eluído, contendo a proteína purificada, foi dialisado em água ultrapura e concentrado para 1 mL. A concentração proteica final foi determinada por detecção colorimétrica pelo ensaio do ácido bicinconínico (BCA) (*kit* Pierce™ BCA Protein Assay, Thermo Scientific, catalog Number: 23225).

3.1.4 Teste de atividade de DisBa-01

Para a avaliação da atividade da proteína recém purificada, utilizou-se células da linhagem HUVEC (do inglês: *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) em ensaio de migração celular *transwell* considerando o tempo de migração de 6h. Considerou-se as condições em que não foi aplicado soro fetal bovino (FSB, do inglês *fetal bovine serum*) como quimioatraente nos poços (controle negativo), a aplicação de FBS 10% como quimioatraente (controle positivo) e o tratamento com DisBa-01 (1 µM). A metodologia detalhada do ensaio de migração *transwell* pode ser verificada no item 3.7.2. A concentração de DisBa-01 utilizada nos experimentos seguintes foi 1 µM, seguindo a metodologia padronizada por nosso grupo de pesquisa em estudos anteriores (Lino *et al.*, 2019; Danilucci *et al.*, 2019; Altei *et al.*, 2020).

3.1.5 Marcação de DisBa-01 com Alexa Fluor™ 546

Inicialmente, foi preparada a solução estoque de Alexa Fluor™ 546 (A20002, Invitrogen), que consistiu em sua diluição em 100 µL de Dimetilformamida (DMF) livre de íons para uma concentração inicial de 10 mg/mL. Uma alíquota de DisBa-01 purificada foi submetida à microdiálise em solução de bicarbonato de sódio (0,1 M; pH 8,4) em membrana de nitrocelulose (*Spectra/Por® Membrane MW: 6-8,000; Spectrum Labs, Repligen*) durante 30 minutos. Posteriormente, o conteúdo proteico foi quantificado por meio da detecção colorimétrica utilizando o método BCA (*kit Pierce™ BCA Protein Assay, Thermo Scientific, catalog Number: 23225*) para obtenção da concentração a ser utilizada, resultando na razão de 10 µL de Alexa Fluor™ 546 para cada 1 mg de DisBa-01. A mistura dos componentes se sucedeu no escuro, em agitação por 1h e o excesso de fluoróforo foi removido por cromatografia de gel filtração em coluna Sephadex G-25 (S5772, *Sigma-Aldrich*).

O equilíbrio da resina foi realizado com 10 volumes de PBS antes da aplicação da proteína, a qual foi concentrada para 1 mL após a coleta. Para a quantificação da amostra marcada, os cálculos seguiram conforme constam nas especificações do fabricante, iniciando com a determinação da D.O._{280nm}, por meio do equipamento SpectraMa (Molecular Devices) por meio do software SoftMax®Pro 6, corrigindo a absorbância obtida pela absorbância máxima do corante (CF), resultando na absorbância da proteína ($A_{\text{proteína}}$). A seguir, a concentração proteica final (C) foi calculada com a aplicação da fórmula $C = \frac{1 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times A_{\text{proteína}}}{1,4}$. A marcação de DisBa-01 foi testada em células MDA-MB-231 e as imagens foram obtidas por meio de microscopia confocal. Para isso, aplicou-se *coating* de PDL (0,1 mg/mL) em câmaras acopladas às lâminas (µ-Slide 8 WellHigh glass bottom, IBidi, #80807), as quais foram mantidas a 37°C, 5% CO₂ durante 16h. No dia posterior, adicionou-se 3×10^4 células/câmara, seguida pela incubação com DisBa-01 marcada com o fluoróforo (1 µM) por 30 minutos. As células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos, seguida por duas lavagens com PBS. Prosseguiu-se com a permeabilização das membranas com Triton-X 100 0,1% por 5 minutos, duas lavagens com PBS e marcação dos núcleos celulares e citoplasma com DAPI (0,7 ng/µL) e Phalloidin-488 2,5% (A12379, Invitrogen), respectivamente, por 20 minutos. Findada a incubação, os poços foram lavados com PBS duas vezes.

3.2 Cultivo celular

As linhagens celulares MCF-7 (ATCC HTB-22) e MDA-MB-231 (ATCC HTB-26) foram cultivadas em meio DMEM Regular (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Nutricell) e Leibovitz's L-15 Medium (Gibco), respectivamente, suplementados com 10% soro fetal bovino (FBS) e com 1% antibiótico (Penicilina/Streptomicina - Vitrocell). As células foram mantidas em incubadora a 37 °C, 5% CO₂ (Model 3110 Spectrum Series II water Jacket CO₂ incubator, Thermo Scientific) e a contagem e aferimento da viabilidade celular foram realizados utilizando *trypan blue* 0,4% em contador automático (TC20™ Automated Cell Counter, BioRad).

3.3 Imunofenotipagem celular por citometria de fluxo

As células MCF-7 e MDA-MB-231 (1×10^6 células/poço) foram plaqueadas em placas de 6 poços (703001, Nest) e no dia posterior foram coletadas em PBS (NaCl 136 mM, KCl 2,6 mM, Na₂HPO₄ 7,74 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM) gelado por raspagem mecânica com a utilização de *cell scraper* (K26-0025, KASVI). As células suspensas foram submetidas à centrifugação a 1200 rpm por 8 minutos a 4 °C (Eppendorf, Centrifuge 5430 R, rotor FA45-24-11-HS) e o *pellet* resultante foi homogeneizado em PBS. Prosseguiu-se com a marcação utilizando anticorpos específicos (Tabela 1), seguida pela incubação a 4 °C durante 1h. As amostras foram lavadas com a adição de PBS para retirada do excesso dos anticorpos e centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos a 4 °C (Eppendorf, Centrifuge 5430 R, rotor FA-45-24-11- HS). O *pellet* resultante foi solubilizado em PBS e o conteúdo homogeneizado foi repousado em gelo por 30 minutos antes da análise em citômetro de fluxo (BD Accuri™ C6). Foram adquiridos 20000 eventos no *software* BD Accuri C6 (BD Biosciences) para posterior análise comparativa dos dados no *software* FlowJo™ v10.8.1. Utilizou-se a estratégia de *gating* e o parâmetro SE Dymax (%), que determina a porcentagem de eventos considerados como tendo fluorescência positiva em relação ao controle não marcado.

Tabela 1 – Anticorpos utilizados nos ensaios de citometria de fluxo e suas especificações.

Alvo	Diluição/Concentração	Fabricante
Integrina α v (FITC)	1 μ g para 1×10^6 células	Santa Cruz (sc53360)
Integrina β 3 (FITC)	20 μ L para 1×10^6 células	BD Pharmingen #555753
Goat Anti-Mouse IgG H&L (FITC)	1:500	Abcam (ab6785)

Fonte: própria.

3.4 Determinação da Concentração Inibitória Média (IC₅₀) de doxorubicina por ensaio de viabilidade celular

Células MDA-MB-231 e MCF-7 (5×10^3 células/poço) foram plaqueadas em placas de 96 poços (K12-096, KASVI) e submetidas ao crescimento durante 24h a 37°C e 5% CO₂. Após incubação, as células foram tratadas com diferentes concentrações de doxorubicina (0,2 a 12 μ M). A viabilidade celular foi avaliada 24h, 48h e 72h após o tratamento, em que o sobrenadante do cultivo celular foi coletado e substituído por meio de cultivo contendo 10% resazurina (alamarBlue™, Thermo Fisher Scientific). As células com resazurina foram incubadas a 37°C, em 5% CO₂ por 4h e após esse período, 200 μ L do sobrenadante foi transferido para uma nova placa para leitura por fluorescência (Excitação: 560 nm, Emissão: 590 nm) no leitor SpectraMax i3 (Molecular Devices) por meio do software SoftMax®Pro 6. A solução de uso foi utilizada como controle negativo e o controle positivo 100% reduzido foi preparado mediante autoclavagem dessa solução. Em contato com células vivas, a resazurina, de coloração azul, é internalizada e metabolicamente reduzida em resofurina, que apresenta coloração rosa escuro. Por meio da mudança colorimétrica foi possível prever a proliferação celular e o valor do IC₅₀ foi determinado utilizando regressão não-linear no *software* GraphPad Prism (v. 8.0), com a transformação dos valores da concentração de doxorubicina em escala log. A concentração inibitória média de doxorubicina obtida neste ensaio foi utilizada nos experimentos seguintes.

3.5 Avaliação da viabilidade celular mediante tratamento combinado de doxorubicina e DisBa-01

Ambas as linhagens celulares (5×10^3 células/poço) foram aplicadas em placas de 96 poços (K12-096, KASVI) e submetidas a crescimento durante 24h a 37°C e 5%

CO₂. Após incubação, as células foram tratadas com doxorubicina (0,8 µM para MCF-7 e 5,1 µM para MDA-MB-231) e diferentes concentrações de DisBa-01 (0,01, 0,05, 0,1, 0,5 e 1 µM) foram aplicadas. A proliferação celular foi avaliada após 24h, 48h e 72h da aplicação dos tratamentos e mensurada conforme metodologia apresentada no item 3.3.

3.6 Ensaios de migração celular

3.6.1. Migração celular por wound healing

As células MCF-7 e MDA-MB-231 (1×10^5 células/poço) foram semeadas em placa de 24 poços (K012-24, KASVI) com seus respectivos meios de cultivo. Após 48h, realizou-se uma risca na monocamada de células, fazendo uso de uma ponteira estéril de 200 µL. Em seguida, aplicou-se Mitomicina C (M4287, Sigma Aldrich®) pelo período de 4h, visando inibir a proliferação celular e tornando possível apenas a análise migratória. As células foram submetidas a lavagens com PBS e os tratamentos foram aplicados. O registro das imagens das fendas foi adquirido considerando os tempos 0h, 24h e 48h após a aplicação dos tratamentos fazendo uso do microscópio Axio Vert.A1 Zeiss, em lente de 10x. A análise quanto à área da fenda foi realizada usando o *software* FIJI-ImageJ e a migração celular foi calculada por meio da porcentagem de abertura da fenda, usando a equação $\Delta h \times 100/T_0$, em que Δh é a área da risca em diferentes tempos de incubação, e T_0 a área logo após a ferida ser efetuada.

3.6.2 Migração celular *transwell*

As células MCF-7 (5×10^4) e MDA-MB-231 (1×10^5) foram homogeneizadas em 250 µL de meio de cultivo sem FBS e aplicadas na parte superior dos insertos de membrana com poros de 8,0 µm (Greiner bio-one® ThinCert™). Imediatamente após o plaqueamento, os insertos foram realocados em placa de 24 poços (662160, CELLSTAR®, Greiner bio-one®) contendo meio de cultivo com FBS, com exceção para o controle negativo, o qual foi usado para medir a migração basal. A placa foi mantida em incubação por 24h para as células MCF-7 e 16h para as células MDA-

MB-231, a 37 °C e 5% CO₂. As células que migraram através dos insertos foram fixadas com paraformaldeído 4% (pH=7) por 10 minutos e, findada a fixação, os insertos foram lavados com PBS por imersão três vezes consecutivas, seguido pela marcação dos núcleos celulares com DAPI (4',6-diamino-2-fenil-indol) por 20 minutos. Os insertos foram lavados com PBS para retirar o excesso de corante e as membranas presentes na parte inferior foram destacadas para a montagem das lâminas. O número de células migrantes foi determinado pela análise *multiwavelength cell scoring* e as imagens foram adquiridas por meio do microscópio ImageXpress[®] Micro.

3.7 Detecção da atividade de metaloproteínases de matriz por ensaio de zimografia

Para a identificação do nível de atividade gelatinase das metaloproteínases MMP-2 e MMP-9, os sobrenadantes oriundos dos ensaios de migração (15 µg) foram combinados com tampão de amostra não desnaturante (glicerol 2%; EDTA 0,1M; Tris 1M, *bromophenol blue* 0,03 mM, pH 6,8) numa proporção de 1:3. As alíquotas foram aplicadas em gel SDS-PAGE 10% contendo gelatina (100 mg/mL) e submetidas à corrente de 85 V por aproximadamente 3h a 4 °C. Utilizando Triton X-100 2,5%, realizou-se a lavagem dos géis por 40 minutos em temperatura ambiente e em constante agitação para a retirada do excesso de SDS. Em seguida, o conteúdo proteico presente nos géis foi renaturado com tampão de incubação (Tris 50 mM, CaCl₂ 5 mM, NaN₃ 0,02%, ZnCl₂ 10 mM, pH 8,0) por 20h a 37 °C e os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue* (brilliant blue 0,25%, isopropanol 50%, ácido acético 10%) durante 16h. Os géis foram lavados em solução descorante (ácido acético 10%, metanol 10%) e o registro da atividade proteolítica, caracterizada pela presença de bandas incolores nos géis, foi efetivado com o uso do fotodocumentador ChemiDocTM XRS+ (Bio-Rad) e a quantificação em relação à densidade das bandas foi feita por meio do *software* FIJI-ImageLab. A normalização dos dados foi realizada mediante divisão dos valores pela média das bandas contendo somente FBS.

3.8 Ensaio de morfologia celular

Plaqueou-se as células (5×10^3) em placa de 96 poços (CLS3603, Corning®), a qual foi mantida a 37°C e 5% CO₂. No dia seguinte, as células foram tratadas com doxorubicina e DisBa-01, sendo mantidas em incubação por 24h. As células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos, seguida por duas lavagens com PBS. Prosseguiu-se com a permeabilização das membranas com Triton-X 100 0,1% por 5 minutos, duas lavagens com PBS e marcação dos núcleos celulares e citoplasma com DAPI (0,7 ng/μL) e Phalloidin-488 2,5% (A12379, Invitrogen), respectivamente, por 20 minutos. Findada a incubação, os poços foram lavados com PBS duas vezes. As imagens de epifluorescência foram adquiridas em lentes de aumento de 10x no microscópio ImageXpress® Micro para posterior análise no *software* FIJI-ImageJ.

3.9 Ensaio de invasão celular em *coating* de gelatina fluorescente

Placas de 96 poços (CLS3603, Corning®) foram forradas com uma camada de gelatina conjugada com fluoresceína (0,2 mg/mL) (G13187, Molecular Probes) e incubadas por 30 minutos a 37 °C 5% CO₂. O excesso de solução de gelatina nos poços foi drenado e o *coating* foi condicionado com meio de cultivo por 30 minutos. Após tripisinização, as células MCF-7 (1×10^4) e MDA-MB-231 (5×10^3) foram plaqueadas sobre o *coating* de gelatina concomitantemente à aplicação dos tratamentos com doxorubicina e DisBa-01. Após 24h, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos em temperatura ambiente e em seguida lavadas duas vezes com PBS. As membranas foram permeabilizadas com Triton X-100 0,1% por 5 minutos e após duas lavagens de PBS, adicionou-se DAPI (0,7 ng/μL) e Phalloidin-647 (ab176759, abcam) para marcação dos núcleos celulares e citoplasma, respectivamente, por 20 minutos. As imagens de epifluorescência foram adquiridas em lentes de aumento de 10x utilizando o equipamento ImageXpress® Micro e analisadas no *software* FIJI-ImageJ.

3.10 Ensaio de internalização com DisBa-01 marcada com Alexa Fluor™ 546

Inicialmente, realizou-se o *coating* com poli-D-lisina (PDL) 0,1 mg/mL em *chambers slides* (μ-Slide 8 Well^{high}, 80806, ibidi®), as quais foram incubadas por no

mínimo 30 minutos a 37 °C, 5% CO₂. As células (1×10^4) foram aplicadas no arcabouço e mantidas 37 °C, 5% CO₂ para aderência ao *coating* e, no dia posterior, o meio de cultivo foi drenado, seguido por lavagem com PBS. Adicionou-se o meio de cultivo previamente preparado com 1 µM de DisBa-01 marcada com Alexa Fluor™ 546 pelos tempos de incubação de 1, 2, 5, 10, 15, 30 e 60 minutos, visando avaliar a dependência do tempo na absorção da desintegrina. Em adição, também se avaliou o *uptake* de DisBa-01 quando em combinação com doxorubicina pelos tempos de 5 e 30 minutos. As células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos e, após lavagem com PBS, foram sensibilizadas à permeabilização com Triton-X 100 0,1% por 5 minutos. Após nova lavagem com PBS, as células foram marcadas durante 20 minutos com DAPI, Phalloidin-647 (ab176759, abcam) e LysoTracker (L7526, Invitrogen), sendo este último um marcador de lisossomos. O arcabouço alocado em cima da lâmina foi retirado e se prosseguiu com a adição de meio de montagem Prolong Diamond Antifade Mountant (P36461, Invitrogen) e coberta com lamínula, seguida de selagem. As imagens foram adquiridas em microscópio Confocal Upright LSM780 NLO (Carl Zeiss AG, Germany) por meio do *software* Zen Black.

3.11 Verificação da viabilidade celular mediante ensaio *live/dead*

As células (5×10^3) foram plaqueadas em placa de 96 poços (CLS3603, Corning®), a qual foi mantida a 37 °C e 5% CO₂. No dia seguinte, as células foram tratadas com doxorubicina e DisBa-01, sendo mantidas em incubação por 24h. Posteriormente ao tratamento, substituiu-se o meio de cultivo por novo meio contendo calceína (1 g/mL) e Iodeto de Propídeo (PI) (5 M), seguido pela incubação por 1h a 37°C e 5% CO₂. Esperou-se que nesse experimento, as células vivas fossem permeabilizadas e coradas com calceína (FITC) e as células mortas fossem coradas com PI, que devido às membranas celulares estarem danificadas, pode se intercalar ao DNA. Assim, após a incubação, as imagens de epifluorescência foram imediatamente adquiridas no equipamento ImageXpress® Micro e a análise dos dados foi efetuada no *software* FIJI-ImageJ.

3.12 Cultivo celular 3D

3.12.1 Formação dos esferoides de células MCF-7 em moldes de agarose

Para a formação de cultura 3D, foram utilizados moldes de silicone (*MicroTissue 3D Petri Dish micro-mold spheroids* - Sigma Z764019) preenchidos com agarose salina estéril (2% agarose ultrapura (Invitrogen, 16500100), 0,9% NaCl). Anteriormente, os moldes foram lavados com 0,01% Extran e esterilizados por autoclavagem, assim como a agarose ultrapura. Após solidificado, o molde de agarose foi transferido para placa de 12 poços (K12-012, KASVI) e os espaços laterais, entre o molde e as paredes dos poços, foram preenchidos com fina camada de agarose para fixação.

Os moldes foram equilibrados com a adição de PBS e submetidos à incubação por 15 minutos a 37 °C e 5% CO₂. Esse procedimento foi realizado duas vezes e, em seguida, adicionou-se meio de cultivo base para esferoides (Tabela 2) para condicionamento dos moldes, os quais foram mantidos durante 15 minutos em incubação na estufa seguindo as mesmas as condições anteriormente descritas.

Tabela 2 - Composição do meio de cultivo base para esferoides.

Componente	Concentração	Código e Marca
DMEM	5 mL	Dulbecco's Modified Eagle Medium, Nutricell
Penicilina/Streptomicina	1%	Vitrocell
Ácido L-ascórbico	50 µg/mL	Sigma, A4403
Albumina Humana	1,25 µg/mL	BLAUBIMAX® 20%
ITS (Insulina, Transferrina, Selênio)	1x	LONZA 17838z

Fonte: própria.

As células foram tripisinizadas e adicionadas aos moldes (5×10^5 células/molde) e a formação dos esferoides acompanhada durante 7 dias, com adição de 80 µL de meio de cultivo a cada 2 dias. A captura de imagens e medida dos diâmetros dos esferoides foram efetuadas por uma câmera fotográfica (AxioCam MRc Zeiss) acoplada ao microscópio (Axio Vert.A1 Zeiss, Zeiss), em lente de aumento de 4 e 10x.

Para remoção da cultura 3D dos moldes de agarose, preparou-se uma nova placa de 12 poços (K12-012, KASVI) contendo 1 mL de meio de cultivo. Os moldes foram transferidos e realocados de forma invertida, visando que os esferoides se

desprendessem da agarose. A placa foi centrifugada a 500 rpm por 5 minutos, conforme especificação do fabricante. O molde de agarose foi retirado do poço com auxílio de uma espátula e uma pinça, e os esferoides foram realocados para placas de 96 poços para a realização dos experimentos posteriores.

3.12.2 Formação dos esferoides de células MDA-MB-231 pelo método *embedded*

Segundo metodologia proposta por Lee *et al.* em 2007, revestiu-se os poços de uma placa de 96 poços (CLS3603, Corning®) com 6 µL de colágeno tipo I (354236, BD Pharmingen), mantendo-a em incubadora úmida a 37 °C a 5% CO₂ por 20 minutos. Após tripsinização, as células MDA-MB-231 (5×10^4) foram homogeneizadas em colágeno tipo I e plaqueadas sobre o *coating* previamente preparado. Após 15 minutos, 60 µL de meio de cultivo foi adicionado cuidadosamente ao poço. A cultura foi mantida durante quatro dias, sendo o meio de cultivo trocado a cada dois dias. Verificada a formação das estruturas tridimensionais, os ensaios de viabilidade, morfologia e *uptake* foram executados conforme indicado nos tópicos abaixo.

3.12.3 Avaliação morfológica dos esferoides

No dia posterior aos tratamentos com doxorrubicina e DisBa-01, as placas contendo os esferoides foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos e o meio de cultura drenado para a substituição por paraformaldeído 4%. Após 10 minutos, foram efetuadas duas lavagens com PBS, seguidas pela adição de Triton-X 100 0,1% por 5 minutos. Após lavagens com PBS, foi adicionada a mistura DAPI + Phalloidin-488 2,5% (A12379, Invitrogen) para marcação de componentes celulares. As imagens de epifluorescência foram adquiridas em lentes de aumento de 10x utilizando o equipamento ImageXpress® Micro e a análise realizada no *software* FIJI-ImageJ.

3.12.4 Verificação da viabilidade do cultivo 3D mediante ensaio *live/dead*

Passadas 24h após a aplicação dos tratamentos com o quimioterápico e DisBa-01 no cultivo 3D, prosseguiu-se com as etapas descritas em 3.11.

3.12.5 Ensaio de internalização de DisBa-01 marcada com Alexa Fluor™ 546 em esferoides

A metodologia utilizada seguiu conforme descrito no item 3.10.

3.13 Análise estatística

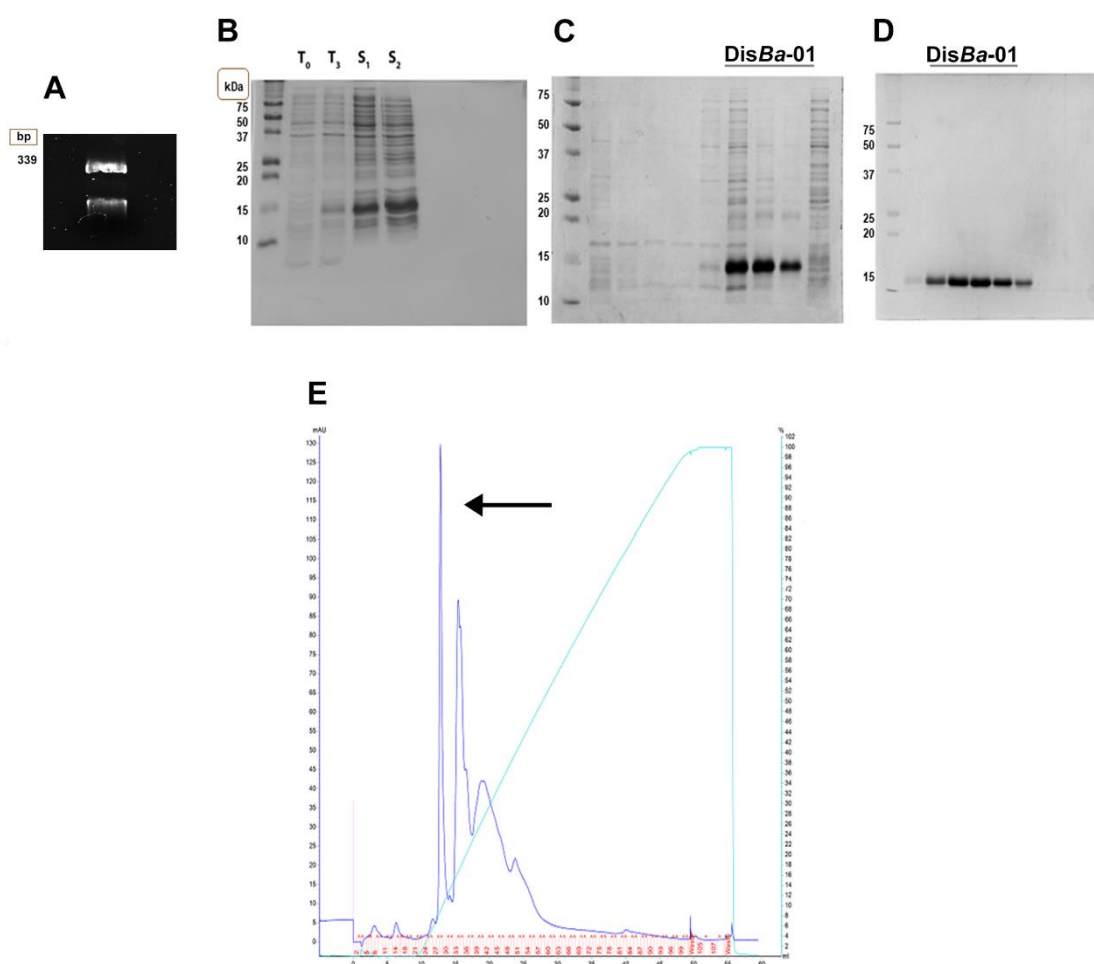
Os ensaios foram realizados em duplicatas ou triplicatas técnicas, em pelo menos três amostras independentes. Os dados obtidos foram submetidos a testes de normalidade (Shapiro-Wilk para $n < 9$, D'Agostino-Pearson *omnibus* K2 para $n \geq 9$) e de distribuição de frequência, precedidos pela identificação de *outliers* pelo método *ROUT* ($Q \geq 0,1$). Dados paramétricos foram analisados por método ANOVA *one-way* (uma variável) ou ANOVA *two-way* (duas variáveis) com teste de múltiplas comparações de Tukey. Dados não paramétricos foram testados por análise de variância de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente relevantes. A análise dos dados e a plotagem dos gráficos foi realizada no *software* GraphPad Prism (versão 8.0.1).

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção de DisBa-01 purificada e ativa

A transformação bacteriana bem-sucedida pôde ser confirmada após a extração de DNA plasmidial da alíquota bacteriana, por meio da confecção do gel de agarose. Verificou-se que a presença de plasmídeo superenovelado, caracterizado por duas bandas presentes no gel após revelação (Figura 12A).

Figura 12 - Confirmação da expressão de DisBa-01 durante as etapas de expressão e purificação.



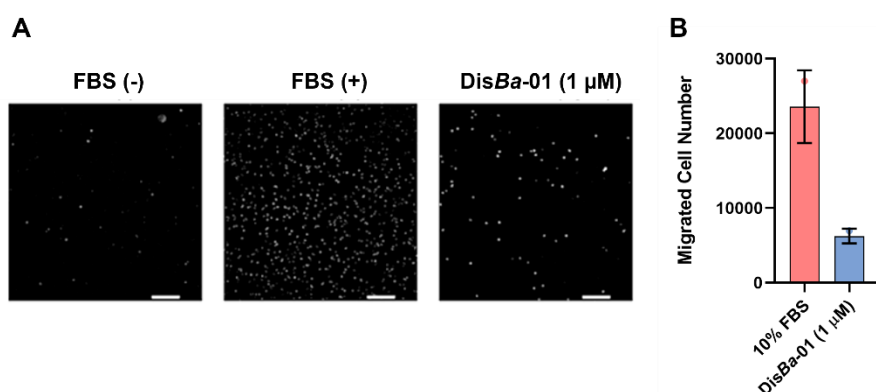
(A) Gel de agarose demonstrando a presença de plasmídeo superenovelado. (B) As amostras T₀, T₃, S₁ e S₂ representam as alíquotas coletadas durante o processo de crescimento, após indução da expressão e do sobrenadante após a lise celular, respectivamente. (C) Alíquotas de frações eluídas após purificação na coluna de níquel. (D) Frações eluídas após cromatografia de exclusão por tamanho,

demonstrando a ausência de contaminantes ao final do processo. (E) Cromatograma indicando a eluição de DisBa-01 no primeiro pico indicado pela seta. Fonte: própria.

As etapas de crescimento e expressão bacteriana para a produção de DisBa-01 foram acompanhadas mediante SDS-PAGE 15% pela verificação das bandas formadas na altura correspondente a 12 kDa e que ficam mais evidentes após a etapa de lise bacteriana, indicando a presença da desintegrina (Figura 12B). As etapas subsequentes de purificação em coluna de afinidade a níquel (Figura 12C) e cromatografia por troca aniônica (Figura 12D) se mostraram bem-sucedidas, visto a identificação da proteína de interesse e ausência de contaminantes. O cromatograma obtido demonstrou a presença de DisBa-01 entre as eluições 24 e 34 (Figura 12E).

Como resultado da quantificação proteica, obteve-se curva padrão com coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,998 e foi constatada uma concentração total de 2,6 mg/mL de DisBa-01, equivalente a 221500 nM em volume final de 1 mL.

Figura 13 - Teste de atividade de DisBa-01 mediante ensaio de migração *transwell*.



(A) Imagens obtidas por meio de microscopia de fluorescência exibem os núcleos celulares marcados com DAPI (em cinza para melhor visualização) das células que migraram através dos insertos. Considerou-se as condições em que não foi aplicado soro fetal bovino (FSB, do inglês) como quimioatraente nos poços (controle negativo), a aplicação de FBS 10% como quimioatraente (controle positivo) e o tratamento com DisBa-01 (1 μM). Barra de escala: 200 μm. (B) Contagem de células migrantes nas condições sem tratamento (controle positivo) e tratadas com DisBa-01 demonstram a redução da migração de células HUVEC mediante tratamento. Fonte: própria.

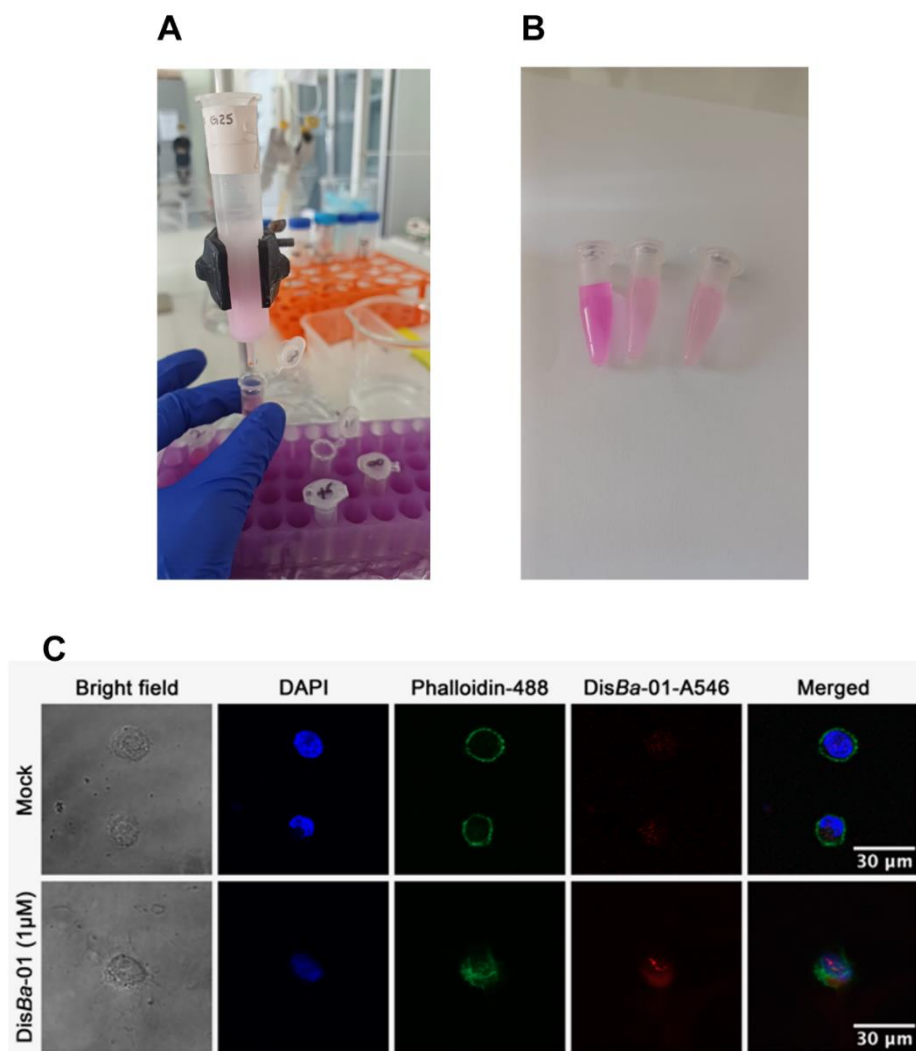
Para o teste de atividade por meio do ensaio de migração *transwell*, constatou-se a diminuição do número de células migrantes nas condições em que houve a

submissão ao tratamento com DisBa-01 (1 μ M) pelo período de 6h, em comparação com as células não tratadas (Figura 13A e Figura 13B).

4.2 Marcação efetiva de DisBa-01 com Alexa Fluor™ 546

A concentração da alíquota de DisBa-01 marcada com Alexa Fluor™ 546, foi estimada em 1,33 mg/mL em um volume de aproximadamente 240 μ L. Assim, para cada 0,32 mg de DisBa-01, considerou-se 3,20 μ L de fluoróforo. A Figura 13A demonstra o momento em que a solução foi submetida a separação por gel filtração. A amostra marcada foi eluída na primeira fração devido ao maior peso molecular e às demais frações eluídas, mais leves, são referentes ao excesso de fluoróforo não ligado à amostra (Figura 13B).

Figura 14 - Etapas da obtenção de DisBa-01 marcada com Alexa Fluor™ 546.



(A) Amostra sendo submetida à gel filtração em coluna Sephadex G-25 (Sigma-Aldrich). (B) Frações eluídas após a cromatografia, sendo a primeira fração eluída composta por DisBa-01 marcada e apresenta coloração mais forte que as demais frações, as quais são constituídas por excesso de corante. (C) As células MDA-MB-231 com núcleos marcados em azul (DAPI) e citoesqueleto marcado em verde (Phalloidin-488) submetidas a tratamento com DisBa-01 marcada (vermelho). As imagens obtidas por meio de microscopia confocal permitem confirmar o sucesso da marcação da desintegrina em comparação com as células não tratadas com DisBa-01. Fonte: própria.

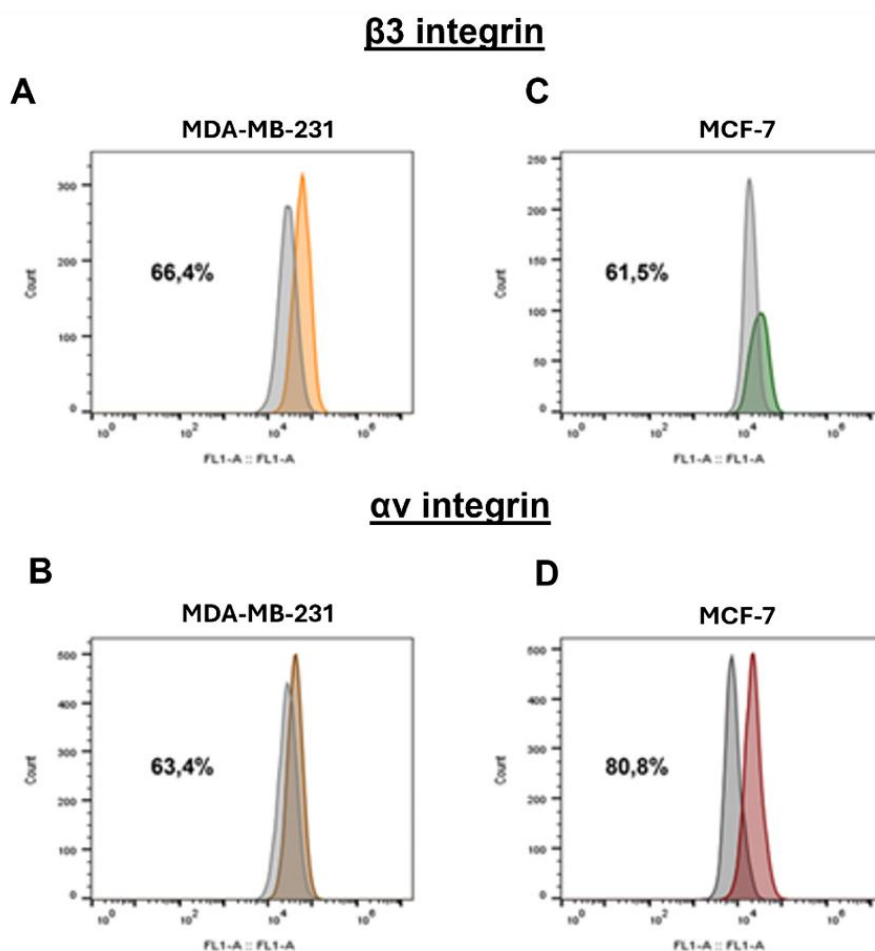
Após a concentração da amostra para o volume de 1 mL, procedeu-se à análise por espectrofotometria sob a excitação de 280 nm, resultando em uma absorvância $A_{280} = 0,522$. A absorvância obtida foi corrigida fazendo uso da absorvância máxima do marcador ($CF = 0,12$), resultando em $A_{proteína} = 0,402$. A obtenção do valor da

concentração proteica foi alcançada por meio da razão $1 \frac{\frac{mg}{mL} \times 0,402}{1,4}$, a qual resultou em 0,2871 mg/mL ou 23925 nM. A marcação de DisBa-01 foi confirmada mediante microscopia confocal (Figura 13C). Sua aplicação neste trabalho permitiu a avaliação de sua internalização nas linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231. A marcação da desintegrina possibilita uma gama de experimentos de epifluorescência que podem ser realizados futuramente.

4.3 Células MCF-7 e MDA-MB-231 expressam diferentes níveis de integrinas α e β

Neste ensaio, verificou-se que as linhagens celulares ER+PR+ e TNBC exibem níveis distintos de expressão das integrinas α e β . As células MDA-MB-231 apresentaram expressão superficial de 66,4% da subunidade β (Figura 18A) e 63,4% da subunidade α (Figura 18B). As células MCF-7, por sua vez, apresentaram 61,5% da integrina β e 80,8% da integrina α (Figura 5A e 5B).

Figura 15 - Histogramas obtidos por meio da análise da citometria de fluxo.



(A) Histogramas representam a relação entre as células não marcadas (cinza) e os eventos tidos como positivos para a expressão da integrina $\beta 3$, em que MDA-MB-231 apresentou 66,4% e MCF7 apresentou 61,5%. (B) Histogramas representativos referentes a integrina αv demonstram que as células MDA-MB-231 expressaram 63,4% e as células MCF7 80,8%. Fonte: própria.

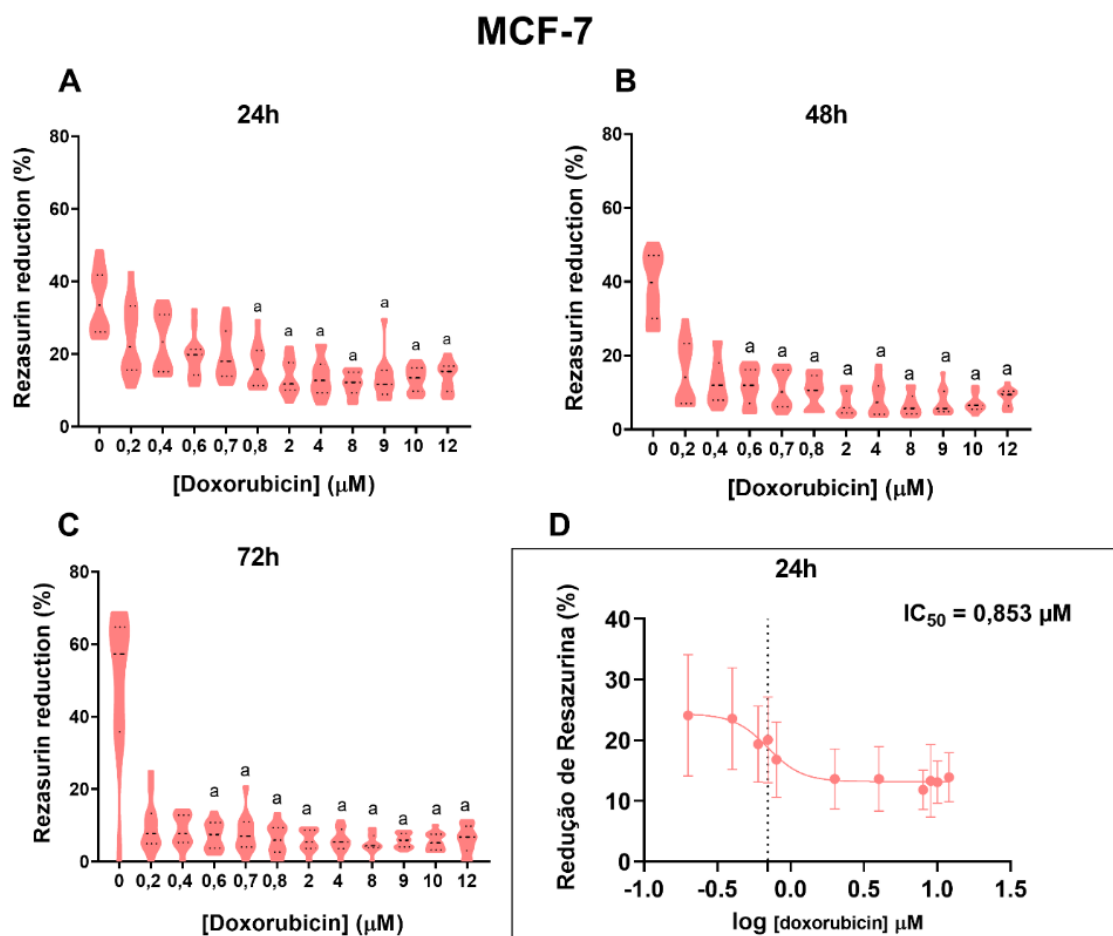
Salienta-se que as subunidades αv e $\beta 3$ podem se combinar com outras integrinas e formar heterodímeros como $\alpha v\beta 6$, $\alpha v\beta 8$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 1$ e $\alpha 11\beta 3$, os quais também podem apresentar níveis distintos de expressão conforme o subtipo molecular considerado (Chastney; Conway; Ivaska, 2021).

4.4 Células MCF-7 e MDA-MB-231 apresentam respostas distintas ao tratamento com doxorrubicina

Os ensaios com células MCF-7 e MDA-MB-231 apresentaram diferenças significativas ($p < 0,0001$) relativas à porcentagem de redução de resazurina em ambas as linhagens celulares após 24h do tratamento (Figuras 14A e 15A). Para as células MCF-7, após o período de 48h (Figura 14B) e 72h (Figura 14C), notou-se que o contato com doxorrubicina reduziu de forma significativa a proliferação celular, quando em comparação com o grupo que não recebeu tratamento. Assim, o IC_{50} de doxorrubicina para células MCF-7 foi calculado em 0,8 μM considerando 24h após a aplicação do quimioterápico (Figura 14D).

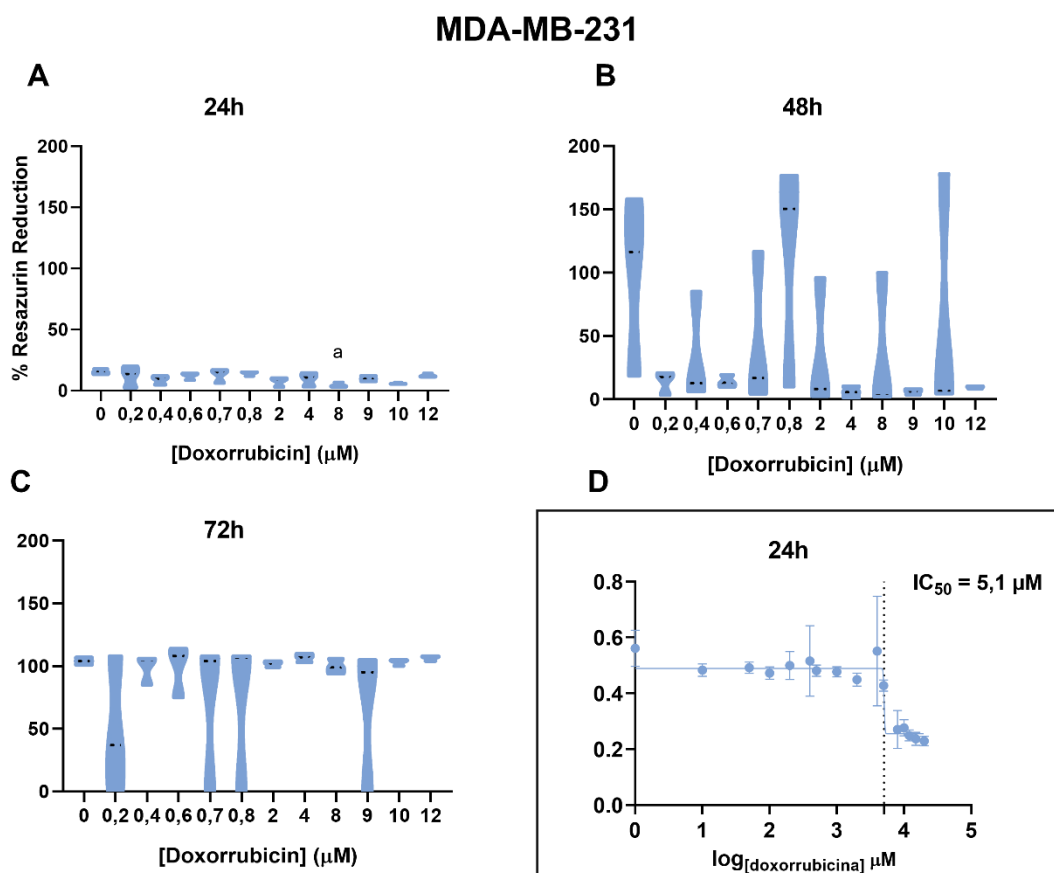
As células MDA-MB-231 demonstraram diferenças significativas mediante tratamento com doxorrubicina individualizada apenas após 24h do tratamento (Figura 15A). Após 48h (Figura 15B) e 72h (Figura 15C), não foi verificada redução da proliferação celular. Portanto, o IC_{50} para a MDA-MB-231 foi determinado em 5,1 μM considerando o período de 24h de tratamento. As concentrações determinadas para as respectivas linhagens celulares foram consideradas em todos os experimentos seguintes, nos quais se avaliou a resposta ao tratamento singular ou combinado após 24h.

Figura 16 - Determinação do IC_{50} de doxorubicina em células MCF-7.



(A) Gráficos em violino representando a porcentagem de redução de resazurina mediante tratamento com Doxorubicina (0,2 a 12 μM) pelos períodos de 24h, (B) 48h e (C) 72h. (D) Determinação do IC_{50} de Doxorubicina para as células MCF7 no período de 24h de tratamento. Para análise estatística, aplicou-se o teste de variância Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's. Os dados estão representados como mediana e intervalo interquartil. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes quando comparado ao grupo não tratado (a). Fonte: própria.

Figura 17 - Determinação do IC₅₀ de doxorubicina em células MDA-MB-231.



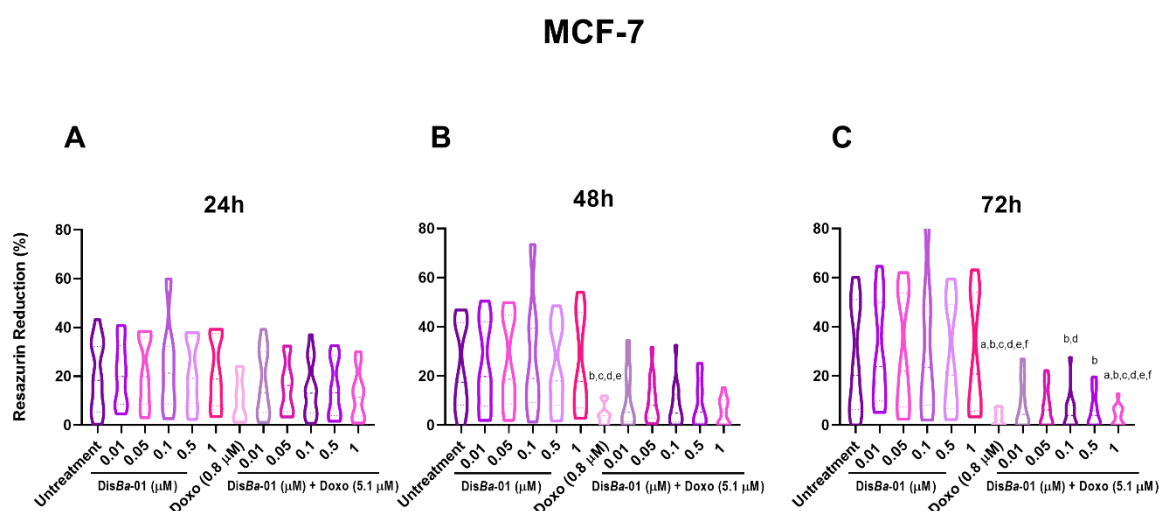
(A) Gráficos em violino representando a porcentagem de redução de resazurina mediante tratamento com Doxorubicina (0,2 a 12 µM) pelos períodos de 24h, (B) 48h e (C) 72h. (D) Determinação do IC₅₀ de doxorubicina para as células MDA-MB-231 no período de 24h de tratamento. Para análise estatística, aplicou-se o teste de variância Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's. Os dados estão representados como mediana e intervalo interquartil. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes quando comparado ao grupo não tratado (a). Fonte: própria.

4.5 O tratamento combinado de DisBa-01 e doxorubicina reduziu a proliferação celular em células ER⁺PR⁺

Ao proceder com o ensaio de viabilidade, verificou-se que as células MCF-7 sem tratamento e tratadas com a desintegrina apresentaram aumento na porcentagem de redução de resazurina (Figura 16A e Figura 16B) no decorrer do tempo até atingirem 72h de tratamento. Entretanto, os grupos tratados somente com doxorubicina (0,8 µM) e grupos tratados com doxorubicina combinada com DisBa-01 apresentaram menor índice de redução de resazurina, indicando menor atividade

metabólica nesses grupos. Nesse sentido, observou-se diferenças significativas principalmente entre os grupos submetidos ao tratamento com doxorrubicina (0,8 μM) e doxorrubicina combinada com DisBa-01 (0,1; 0,5 e 1 μM) após 48h e 72h (Figura 16C).

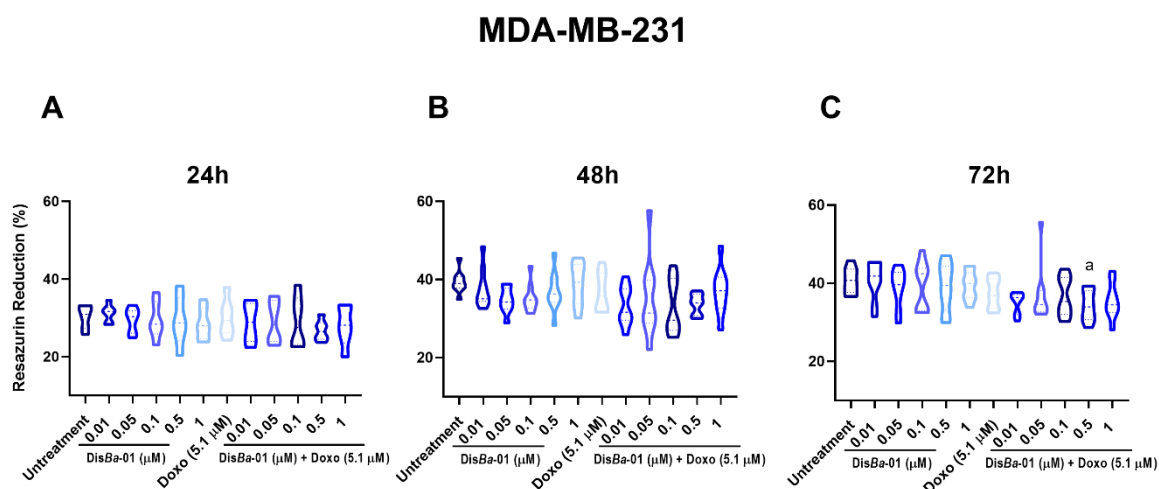
Figura 18 - Ensaio de viabilidade para avaliação do tratamento combinado de doxorrubicina e DisBa-01 em MCF-7.



(A) Gráficos representam a porcentagem de redução de resazurina mediante tratamento com DisBa-01 (0,01 a 1 μM) e doxorrubicina pelo período de 24h, (B) 48h e (C) 72h. Verifica-se diferenças significativas ($p > 0,001$) a partir de 48h do início do tratamento entre grupos submetidos à ação de doxorrubicina e doxorrubicina combinada com DisBa-01 mediante comparação com os grupos tratados apenas com a desintegrina. Para análise estatística, aplicou-se o teste de variância Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's. Os dados estão representados como mediana e intervalo interquartil. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes quando comparados aos grupos não tratado (a). Fonte: própria.

A linhagem MDA-MB-231, por sua vez, demonstrou alteração significativa referente à viabilidade celular no grupo tratado com doxorrubicina e DisBa-01 (0,5 μM) após 72h (Figura 17C), em comparação com o grupo sem tratamento. Neste ensaio, verificou-se novamente que as células triplo-negativas apresentaram respostas distintas ao quimioterápico em comparação com as células MCF-7 (Figura 17A e Figura 17B).

Figura 19 - Ensaio de viabilidade para avaliação do tratamento combinado de doxorubicina DisBa-01 em MDA-MB-231.

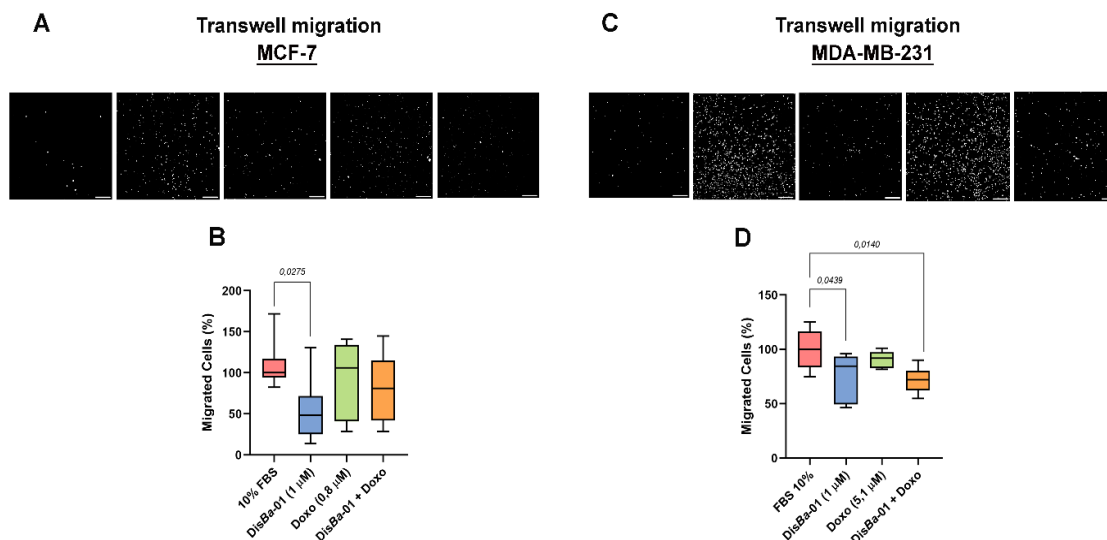


(A) Gráficos representam a porcentagem de redução de resazurina mediante tratamento das células MDA-MB-231 com DisBa-01 (0,01 a 1 μM) e doxorubicina pelo período de 24h, (B) 48h e (C) 72h. Verifica-se diferenças significativas ($p = 0,0399$) a partir de 72h do início do tratamento entre grupos submetidos à ação de doxorubicina combinada com DisBa-01 mediante comparação com o grupo sem tratamento. Para análise estatística, aplicou-se o teste de variância Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's. Os dados estão representados como mediana e intervalo interquartil. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes quando comparados aos grupos não tratado (a) Fonte: própria.

4.6 DisBa-01 reduziu migração celular *transwell* em ambas as linhagens celulares e o tratamento combinado foi efetivo em células TNBC

Procedeu-se com duas metodologias para a avaliação da migração celular com o intuito de verificar diferenças na motilidade das células durante a migração individualizada e a migração coletiva, por meio dos ensaios de migração *transwell* e *wound healing*, respectivamente. No primeiro deles, denominado migração *transwell*, verificou-se que as células MCF-7 exibiram menor taxa de migração, mesmo quando estimuladas por quimioatraente. Isso se dá devido à baixa expressão de VEGF e abstenção de estrogênio para ativação de vias autócrinas nesse tipo celular (Comşa; Cîmpean; Raica, 2015). Apesar disso, ao realizar o tratamento das células com DisBa-01 (1 μM), observou-se redução na taxa de células migrantes em comparação com o grupo não tratado (Figura 19A, Figura 19B).

Figura 20 - Migração *transwell* em células MCF-7 e MDA-MB-231.

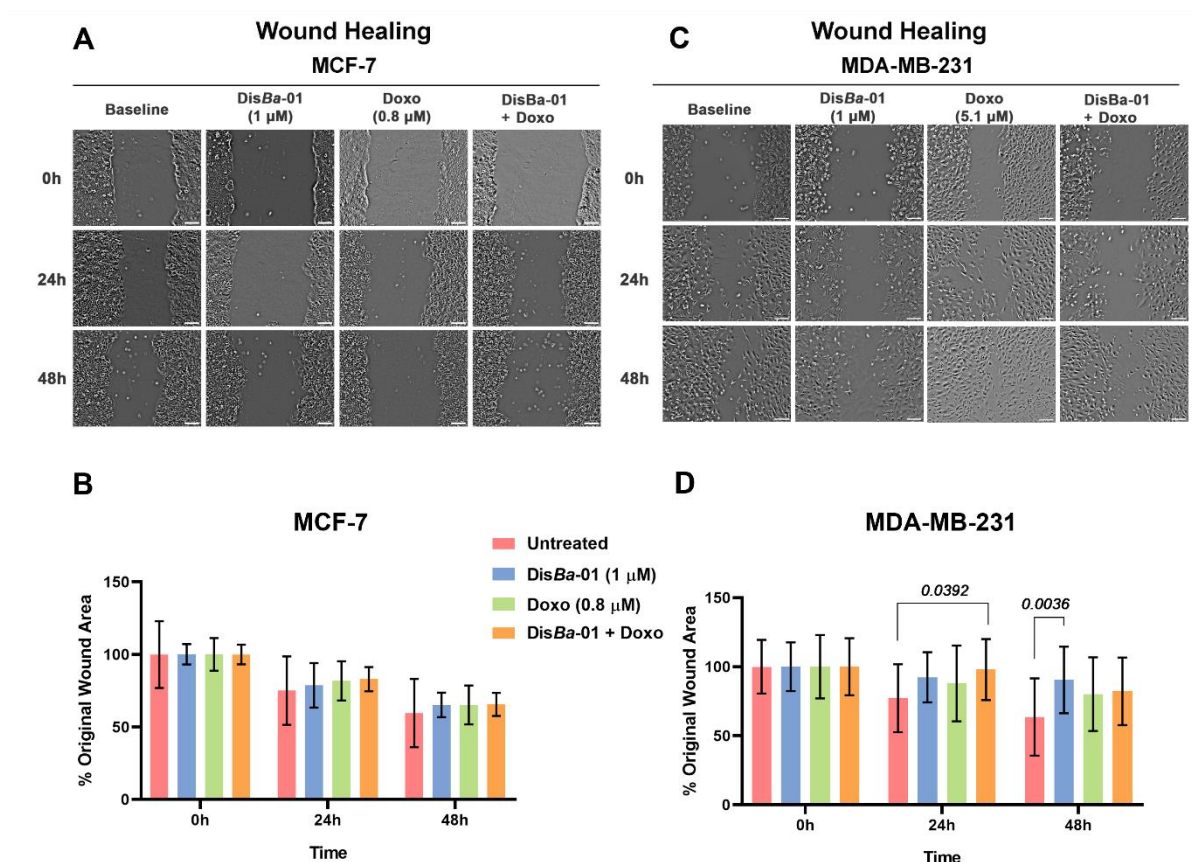


(A) Contagem de células MCF-7 migrantes nas condições sem tratamento (10% FBS), tratadas com DisBa-01 (1 μ M), doxorrubicina (0,853 μ M) e tratadas com DisBa-01 e Doxo. Barra de escala 100 μ m. Núcleos marcados com DAPI representados na cor branca para melhor visualização. (B) Gráfico demonstra redução ($p = 0,0275$) de células migrantes mediante tratamento com DisBa-01 em células MCF-7. (C) Contagem de células MDA-MB-231 migrantes nas condições sem tratamento (10% FBS), tratadas com DisBa-01 (1 μ M), doxorrubicina (5,1 μ M) e tratadas com DisBa-01 e Doxo. Barra de escala 100 μ m. (D) Análise demonstra redução de células migrantes após tratamento com DisBa-01 ($p = 0,0439$) e tratamento combinado ($p = 0,0140$). Para análise estatística, aplicou-se ANOVA *one-way* com teste de múltiplas comparações de Tukey. Os dados estão representados como média e desvio-padrão. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Fonte: própria.

Considerando o mesmo ensaio, as células MDA-MB-231 apresentaram maior índice de migração em comparação com a linhagem MCF-7, devido a seu fenótipo mais agressivo e expressão de moléculas tais como EGR, VEGF e integrinas. Neste experimento, verificou-se que os grupos tratados com DisBa-01 (1 μ M) e doxorrubicina (5,1 μ M) combinada com DisBa-01 (1 μ M) resultaram em diminuição significativa em comparação com as células não tratadas (Figura 19C e Figura 19D).

Ao avaliar a metodologia de migração por *wound healing*, observou-se que as células MCF-7 foram capazes de realizar a migração coletiva (Figura 20A), mas não foram observadas diferenças significativas em relação aos tratamentos aplicados (Figura 20B).

Figura 21 - Migração *Wound Healing* das células MCF-7 e MDA-MB-231.



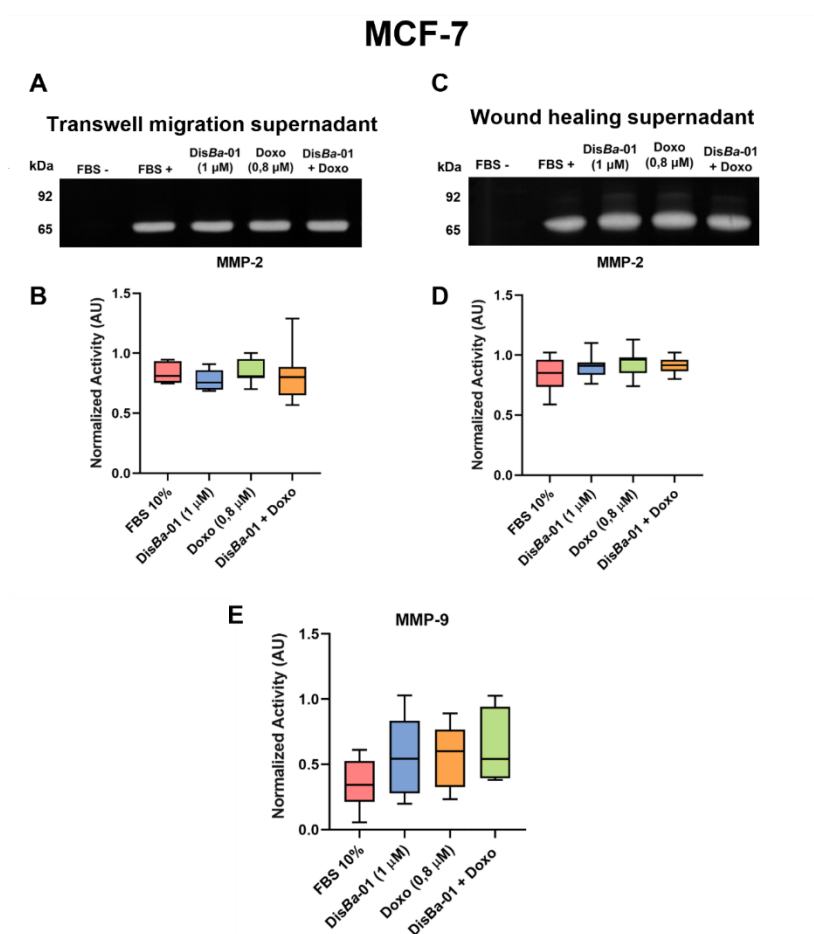
(A) Imagens representativas demonstrando alterações na abertura da fenda após 0h, 24h e 48h da aplicação dos tratamentos em células MCF-7. Barra de escala 100 μm. (B) Quantificação da área da fenda após 24h, 48h e 72h em células MCF-7. Não foram observadas diferenças significativas. (C) Imagens representativas demonstrando alterações na abertura da fenda após 0h, 24h e 48h da aplicação dos tratamentos em células MDA-MB-231. Barra de escala 100 μm. (D) Quantificação da área da fenda após 24h, 48h e 72h em células MDA-MB-231. Verificou-se redução da taxa de migração coletiva após aplicação do tratamento combinado em 24h e após aplicação de DisBa-01 em 48h. Para análise estatística, aplicou-se ANOVA two-way com teste de múltiplas comparações de Tukey. Os dados estão representados como média e desvio-padrão. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Fonte: própria.

As células MDA-MB-231 também demonstraram migração coletiva (Figura 19C), constatadas pela redução da área da fenda original no decorrer do tempo ao considerar o grupo sem tratamento. Foram observadas diferenças significativas na redução da taxa de migração celular após 24h mediante aplicação do tratamento combinado e após 48h, o tratamento com DisBa-01 se mostrou mais efetivo.

4.7 DisBa-01 reduziu atividade gelatinase de MMP-2 em células TNBC.

O ensaio de zimografia realizado a partir do sobrenadante do experimento de migração *transwell* das células MCF-7 (Figura 21A) não demonstrou redução da atividade enzimática de MMP-2 (kDa 65) e MMP-9 (kDa 92) (Figura 21B). O sobrenadante do ensaio de *wound healing* (Figura 21D) para as mesmas células também não apresentou diferenças significativas na atividade destas metaloproteinases.

Figura 22 - Detecção de atividade de MMPs em ensaio de zimografia em sobrenadantes de MCF-7



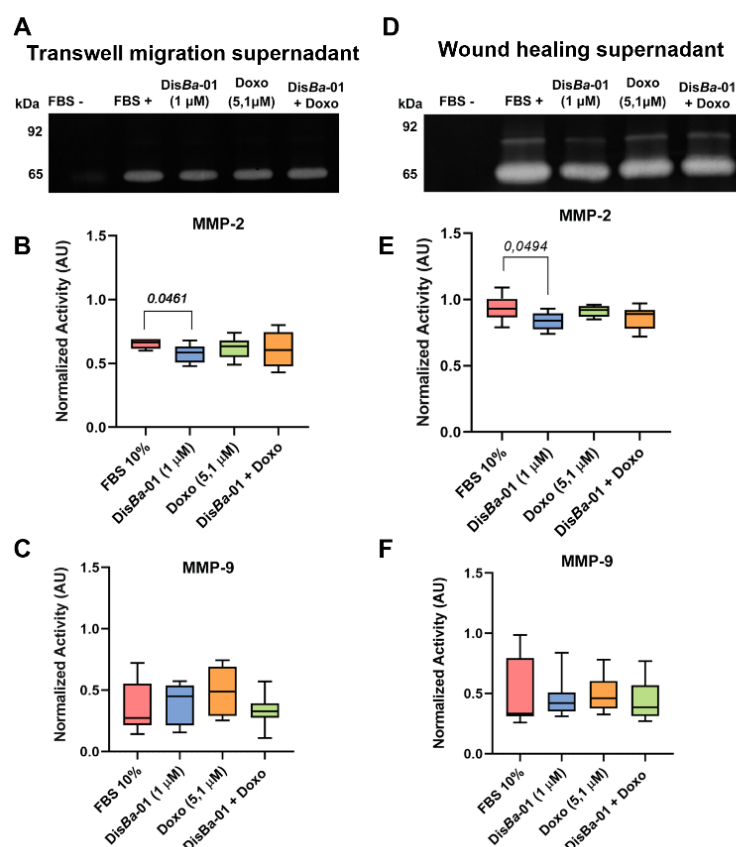
(A) Zimograma representativo demonstrando bandas incolores referentes à atividade das gelatinases MMP-9 (92 kDa) e MMP-2 (62 kDa) do meio condicionado resultante do ensaio de migração celular por

ensaio de migração *transwell* em células MCF-7. (B) Quantificação referente à atividade de MMP-2 representativo, pois só foi possível avaliar a atividade em uma das repetições do ensaio. (C) Quantificação referente à atividade de MMP-9. (D) Zimograma representativo demonstrando bandas incolores referentes à atividade das gelatinases MMP-9 (92 kDa) e MMP-2 (62 kDa) do meio condicionado resultante do ensaio de migração celular por ensaio de migração *wound healing*. (E) Quantificação referente à atividade de MMP-2 e (E) MMP-9. Para análise estatística, aplicou-se ANOVA *one-way* com teste de múltiplas comparações de Tukey. Os dados estão representados como média e desvio-padrão. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Fonte: própria.

Os sobrenadantes do ensaio de migração *transwell* das células MDA-MB-231 (Figura 22A), por sua vez, demonstraram que os níveis de atividade de MMP-2 foram reduzidos mediante tratamento individualizado de DisBa-01 (Figura 22B). Os sobrenadantes do ensaio *wound healing* também apresentaram redução na atividade enzimática de MMP-2 quando as células receberam tratamento com a desintegrina (Figura 22E). Os níveis de MMP-9, por sua vez, não apresentaram diferenças significativas (Figura 22C e Figura 22F), bem como não foram verificadas diferenças significativas após a aplicação do tratamento combinado.

Figura 23 - Detecção de atividade de MMPs em ensaio de zimografia em sobrenadantes de MDA-MB-231.

MDA-MB-231



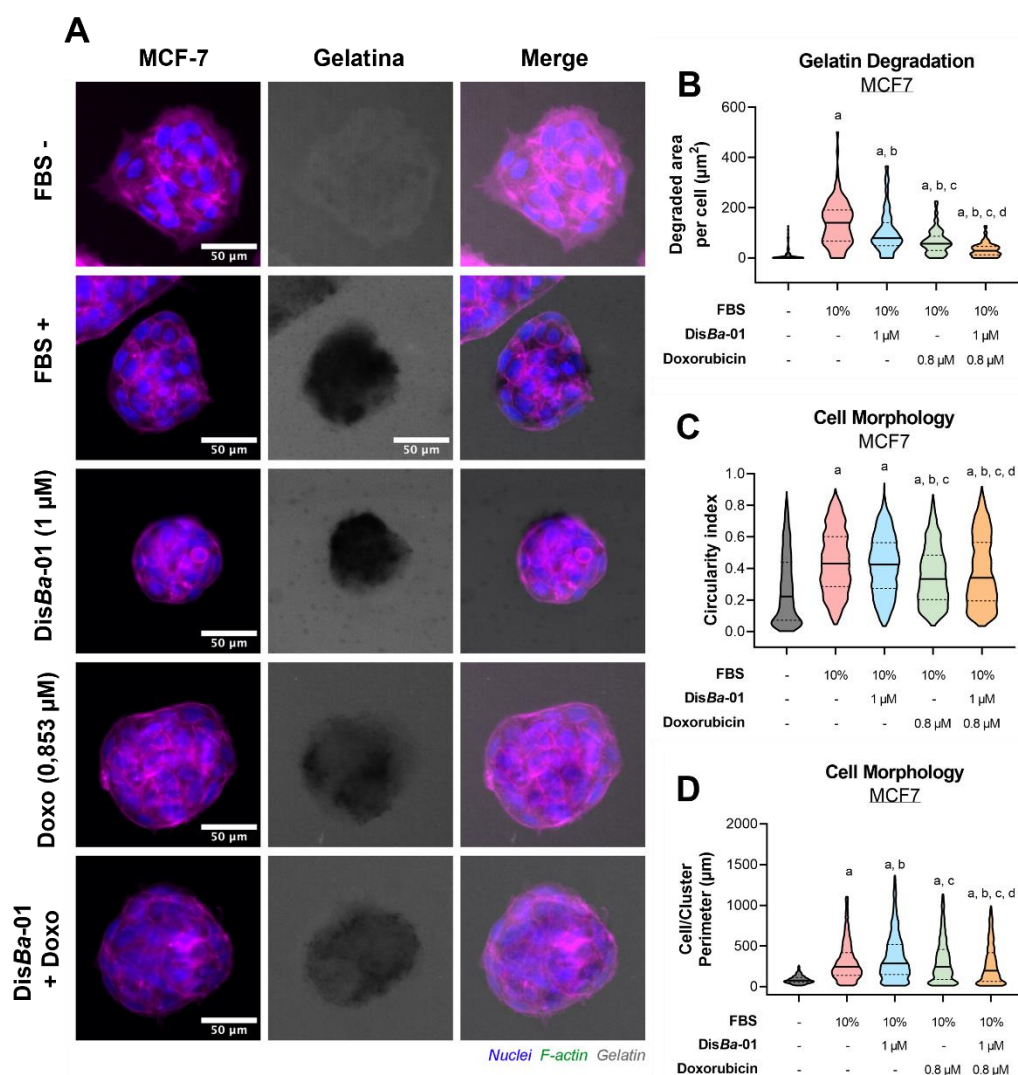
(A) Zimograma representativo demonstrando bandas incolores referentes à atividade das gelatinases MMP-9 (92 kDa) e MMP-2 (62 kDa) do meio condicionado resultante do ensaio de migração celular por ensaio de migração *transwell* em células MDA-MB-231. (B) Quantificação referente à atividade de MMP-2 demonstra redução mediante tratamento com DisBa-01 ($p = 0,0461$). (C) Quantificação referente à atividade de MMP-9. (D) Zimograma representativo demonstrando bandas incolores referentes à atividade das gelatinases MMP-9 (92 kDa) e MMP-2 (62 kDa) do meio condicionado resultante do ensaio de migração celular por ensaio de migração *wound healing*. (E) Quantificação referente à atividade de MMP-2 e (F) MMP-9. Para análise estatística, aplicou-se ANOVA *one-way* com teste de múltiplas comparações de Tukey. Os dados estão representados como média e desvio-padrão. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Fonte: própria.

4.8 Tratamento combinado entre DisBa-01 e doxorrubicina reduziu degradação em gelatina fluorescente para ambas as linhagens celulares

Neste experimento, verificou-se a redução dos pontos de degradação do *coating* de gelatina fluorescente (Figura 23A) mediante tratamentos individualizados e tratamento combinado nas células MCF-7. Constatou-se a atuação da desintegrina e do quimioterápico na inibição da invasão em camada de gelatina de forma significativa, principalmente em relação ao tratamento combinado em comparação com o grupo não tratado (Figura 23B). Além disso, foi possível verificar alterações na morfologia celular após exposição aos tratamentos, como a redução da circularidade (Figura 23C) e a redução do perímetro de células individuais e de *clusters* celulares que obtiveram o tratamento combinado (Figura 23D).

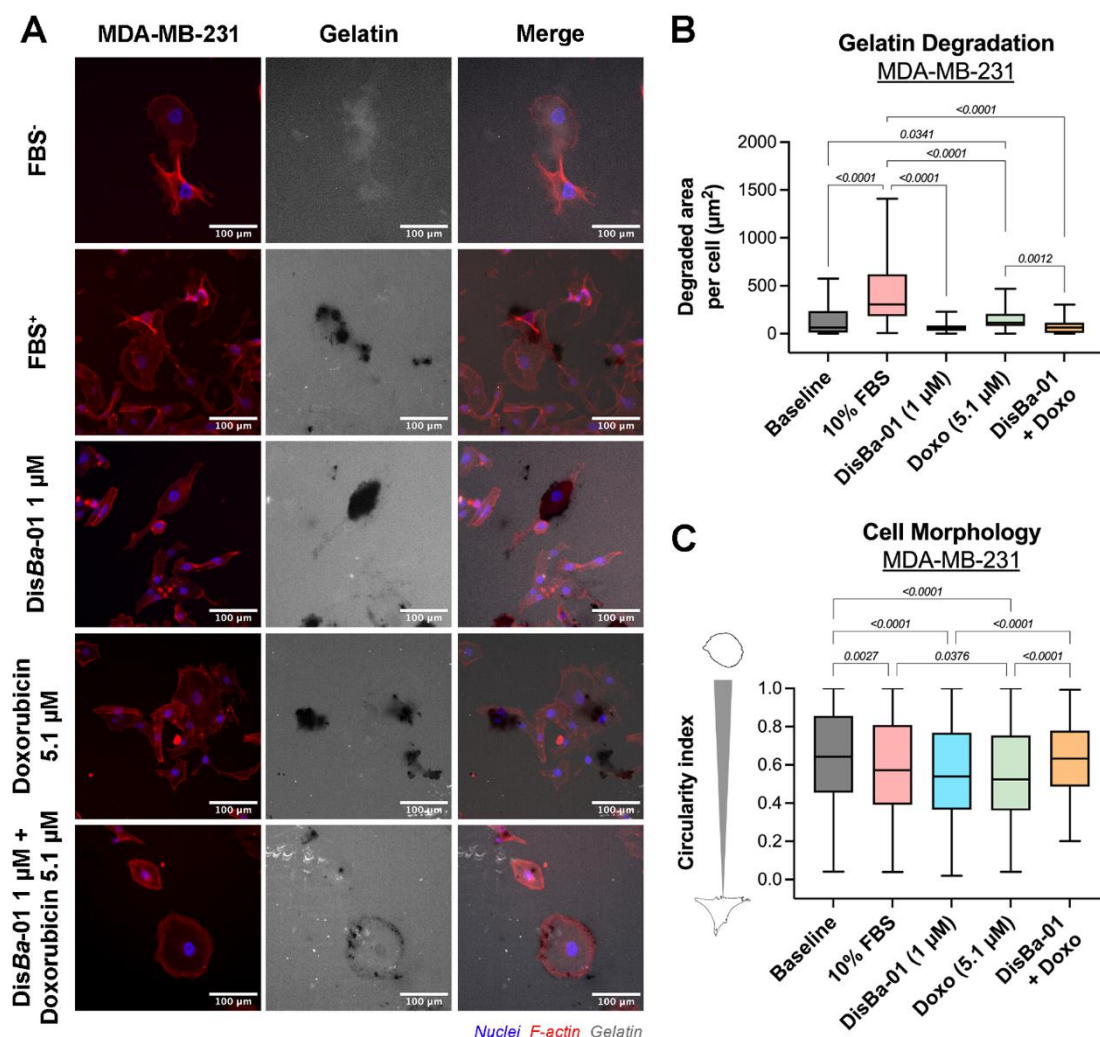
As células MDA-MB-231 também resultaram em redução da área de degradação de gelatina (Figura 24A e Figura 24B) após aplicação dos tratamentos em comparação com o grupo não tratado. Além disso, o tratamento com doxorrubicina demonstrou redução de circularidade celular em comparação com o grupo sem tratamento (Figura 24C).

Figura 24 - Ensaio de degradação de gelatina fluorescente em células MCF-7.



(A) Imagens representativas obtidas por microscopia de epifluorescência demonstram as áreas de degradação em gelatina fluorescente e a nítida diferenciação após aplicação dos tratamentos ($p < 0,0001$). Barra de escala: 100 μm . Quantificação da (B) área degradada, (C) circularidade e (D) perímetro das células e clusters de células resultantes ao final do ensaio. Observa-se que o tratamento de DisBa-01 e doxorubicina reduziu ($p < 0,0001$) a degradação do *coating*, assim como levou a redução de circularidade e perímetro das células. Para análise estatística, aplicou-se o teste de variância Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's. Os dados estão representados como mediana e intervalo interquartil. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes quando comparados aos grupos não tratado (a) Fonte: própria.

Figura 25 - Ensaio de degradação de gelatina fluorescente em células MDA-MB-231.



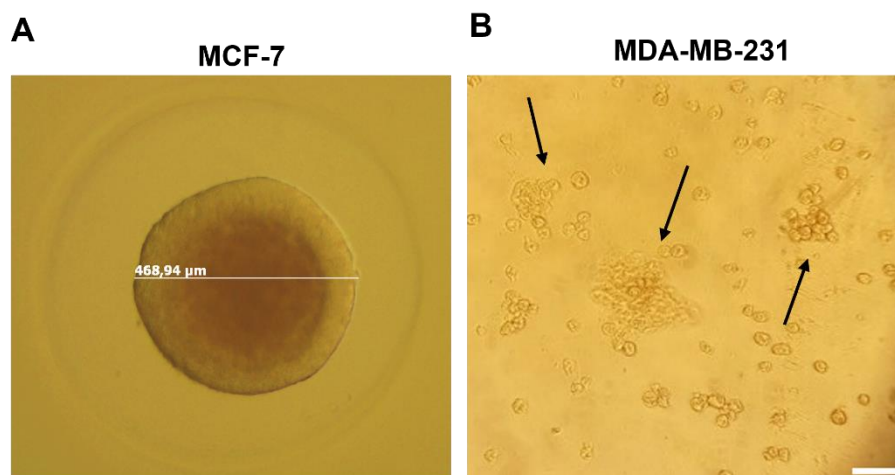
(A) Imagens representativas obtidas por microscopia de epifluorescência das células MDA-MB-231 demonstram as áreas de degradação em gelatina fluorescente e a nítida diferenciação após aplicação dos tratamentos. Barra de escala: 100 µm. Quantificação da (B) área degradada e (C) circularidade. Verifica-se que o tratamento de DisBa-01 e doxorrubicina reduziu ($p < 0,0001$) a degradação do *coating* de gelatina. Para análise estatística, aplicou-se ANOVA *one-way* com teste de múltiplas comparações de Tukey. Os dados estão representados como média e desvio-padrão. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Fonte: própria.

4.9 Padronização efetiva no cultivo celular 3D.

A formação dos esferoides foi verificada mediante acompanhamento do cultivo celular durante sete dias para as células MCF-7 (Casali *et al.*, 2022) e quatro dias para as células MDA-MB-231 (Becceneri *et al.*, 2024). Observou-se que a linhagem ER⁺PR⁺ foi capaz de gerar esferoides compactos (Figura 25A), enquanto as células

TNBC geraram aglomerados semelhantes a “suspensões de células únicas” (Figura 25B), presentes em classificação de Froehlich e colaboradores em 2016.

Figura 26 - Registro da formação de esferoides em células MCF-7 e MDA-MB-231.



(A) Esferoides formados pelas células MCF-7 com 468,94 µm. (B) Suspensão de células únicas formadas pelas células MDA-MB-231. Barra de escala: 20 µm. Fonte: própria.

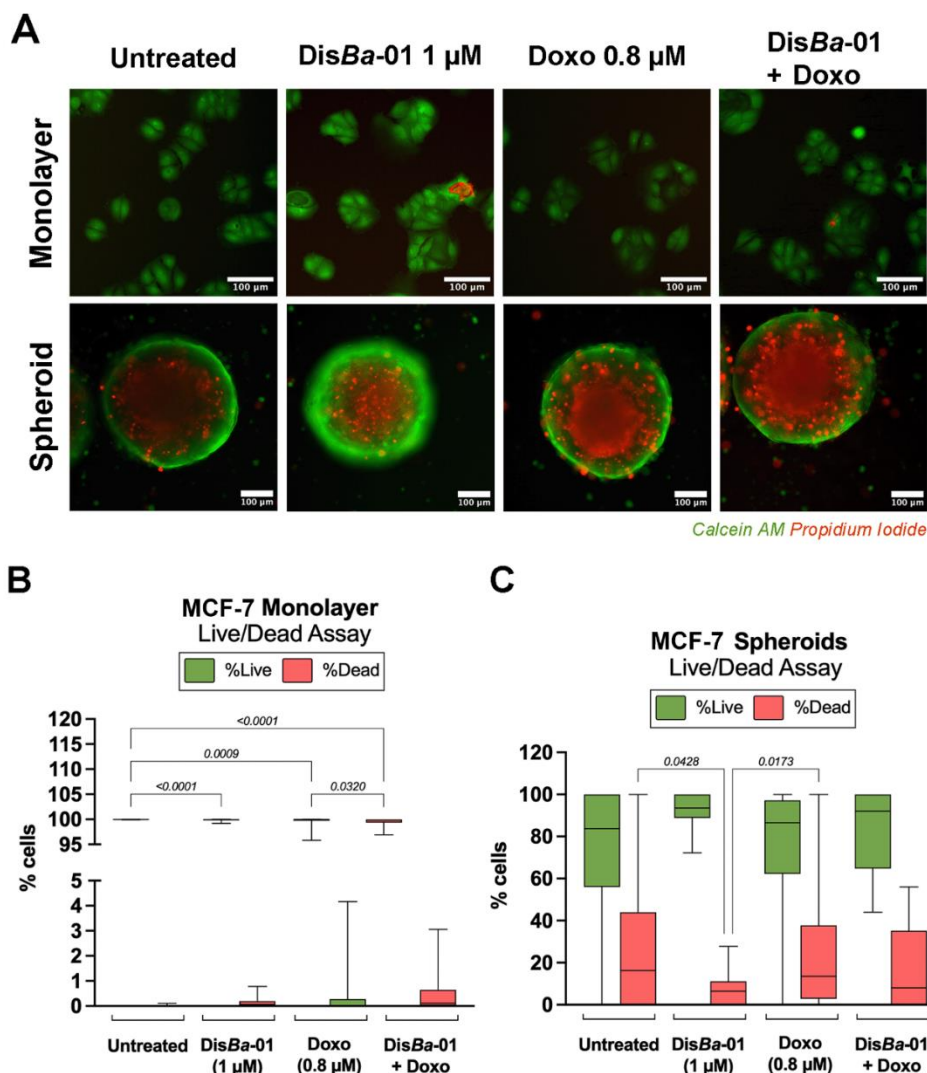
4.10 Aumento de viabilidade em ensaio *live/dead* mediante tratamento combinado e com *DisBa-01* isolada

O ensaio de viabilidade *live/dead* (Figura 26A) demonstrou que a linhagem MCF-7 cultivada em monocamada exibiu menor porcentagem de células consideradas vivas mediante o tratamento com *DisBa-01* e tratamento combinado (Figura 26B). No cultivo 3D, verificou-se redução da porcentagem de células mortas após a aplicação de tratamento com *DisBa-01* (Figura 26C). Além disso, é possível observar a formação de núcleos necróticos nos esferoides. Os esferoides, assim como os tumores sólidos, apresentam uma heterogeneidade nas taxas de proliferação celular. Na periferia, encontram-se células com alta capacidade replicativa, enquanto uma camada intermediária abriga células quiescentes. Na região central, localizam-se células hipóxicas e necróticas.

Para a linhagem MDA-MB-231, constatou-se redução na porcentagem de células vivas após o tratamento combinado de *DisBa-01* e doxorrubicina, em comparação com o grupo tratado apenas com o quimioterápico em monocamada

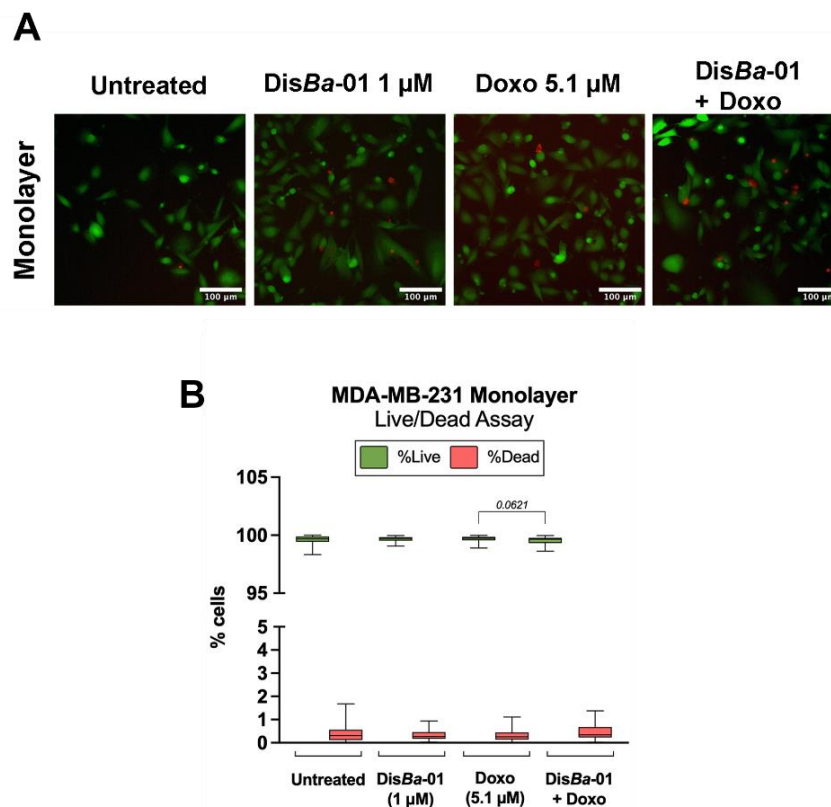
(Figura 27A e Figura 27B). Em relação ao modelo 3D, devido à instabilidade dos esferoides para essa linhagem celular, não foi possível a realização da quantificação.

Figura 27 - Ensaio de *Live/Dead* para a linhagem celular MCF-7 em modelo 2D e 3D.



(A) Imagens representativas de microscopia de epifluorescência demonstram células MCF-7 em monocamada e como esferoides marcadas com calceína e PI. Barra de escala 100 μ m. (B) Quantificação de células vivas e mortas no ensaio em monocamada em células MCF-7. Verifica-se marcação de células vivas maior quando submetidas aos tratamentos. (C) Quantificação de células vivas e mortas em esferoides MCF-7. Verifica-se redução de marcação de células mortas após o tratamento com DisBa-01. Para análise estatística, aplicou-se ANOVA *one-way* com teste de múltiplas comparações de Tukey. Os dados estão representados como média e desvio-padrão. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Fonte: própria.

Figura 28 - Ensaio de *Live/Dead* para a linhagem celular MDA-MB-231 em modelo 2D



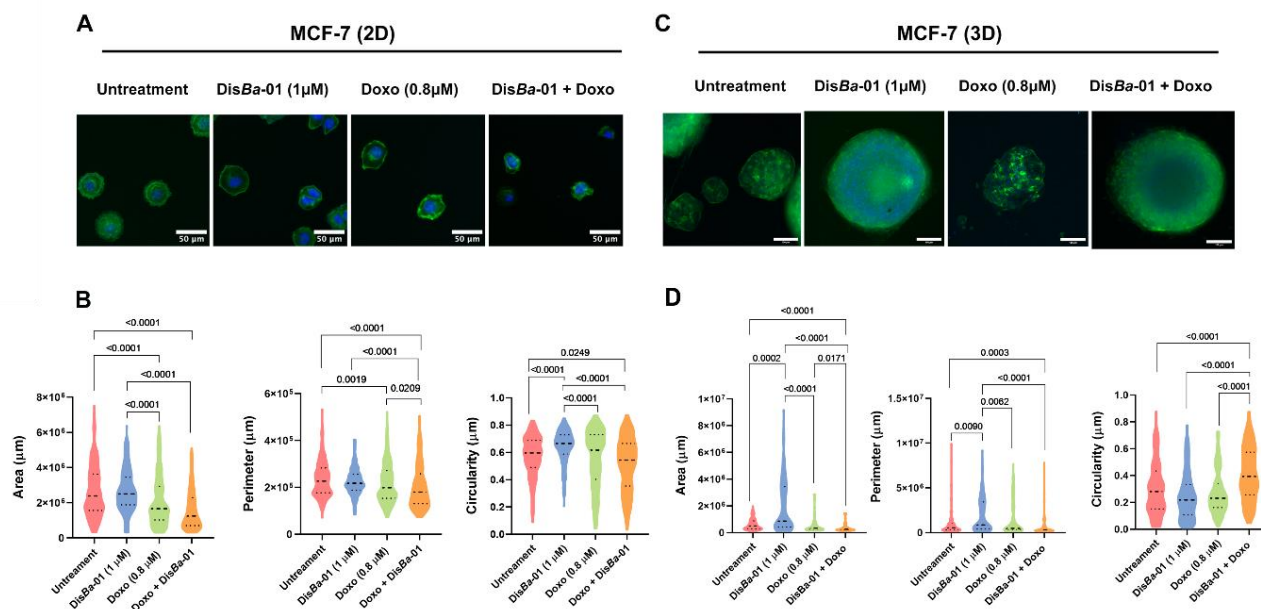
(A) Imagens representativas de microscopia de epifluorescência demonstram células MDA-MB-231 em monocamada e como esferoides marcadas com calceína e PI. Barra de escala 100 μm . (B) Quantificação de células vivas e mortas no ensaio em monocamada de células MDA-MB-231. Para análise estatística, aplicou-se ANOVA *one-way* com teste de múltiplas comparações de Tukey. Os dados estão representados como média e desvio-padrão. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Fonte: própria.

4.11 Modificações morfológicas promovidas por tratamento com doxorrubicina e DisBa-01

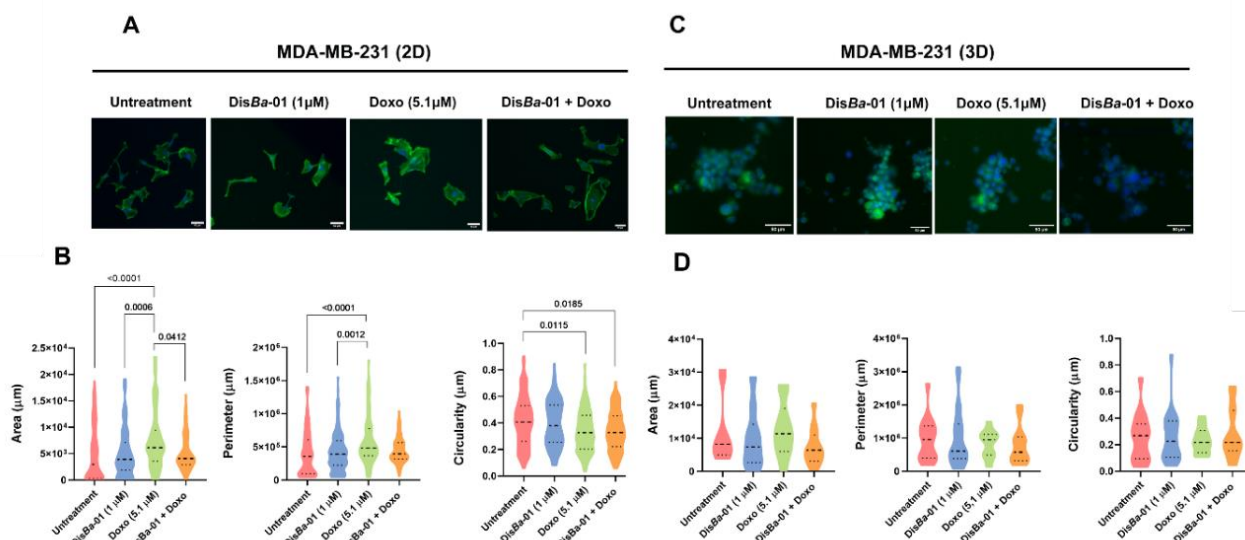
As células MCF-7 em monocamada demonstraram redução de área quando aplicados os tratamentos com doxorrubicina e tratamento combinado, além de redução do perímetro e circularidade nessas mesmas condições (Figura 28A, Figura 28B). O cultivo 3D por sua vez, demonstrou redução de área durante o tratamento combinado e aumento quando tratado apenas com DisBa-01. O tratamento

combinado foi capaz de reduzir o perímetro, mas em contrapartida aumentou a circularidade, em comparação com os demais grupos (Figura 28C e Figura 28D).

Figura 29 - Morfologia das células MCF-7 em modelos de cultivo 2D e 3D.



(A) Imagem de epifluorescência representativas de células MCF-7 marcadas com DAPI e faloidina para visualização de núcleo e citoesqueleto, respectivamente. Barra de escala 50 µm. (B) Quantificação de área, perímetro e circularidade das células. Verifica-se de forma geral atuação proeminente de doxorrubicina e do tratamento combinado em alterações na morfologia quando comparadas com o grupo sem tratamento. (C) Imagem de epifluorescência representativas de esferoides MCF-7 marcadas com DAPI e faloidina para visualização de núcleo e citoesqueleto, respectivamente. Barra de escala 50 µm. (D) Quantificação de área, perímetro e circularidade dos esferoides. Tem-se maior atuação do tratamento combinado em alterações morfológicas, demonstrando redução de área e perímetro e aumento de circularidade. Para análise estatística, aplicou-se o teste de variância Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's. Os dados estão representados como mediana e intervalo interquartil. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes quando comparados aos grupos não tratado (a) Fonte: própria.

Figura 30 – Morfologia das células MDA-MB-231 em modelos de cultivo 2D e 3D.

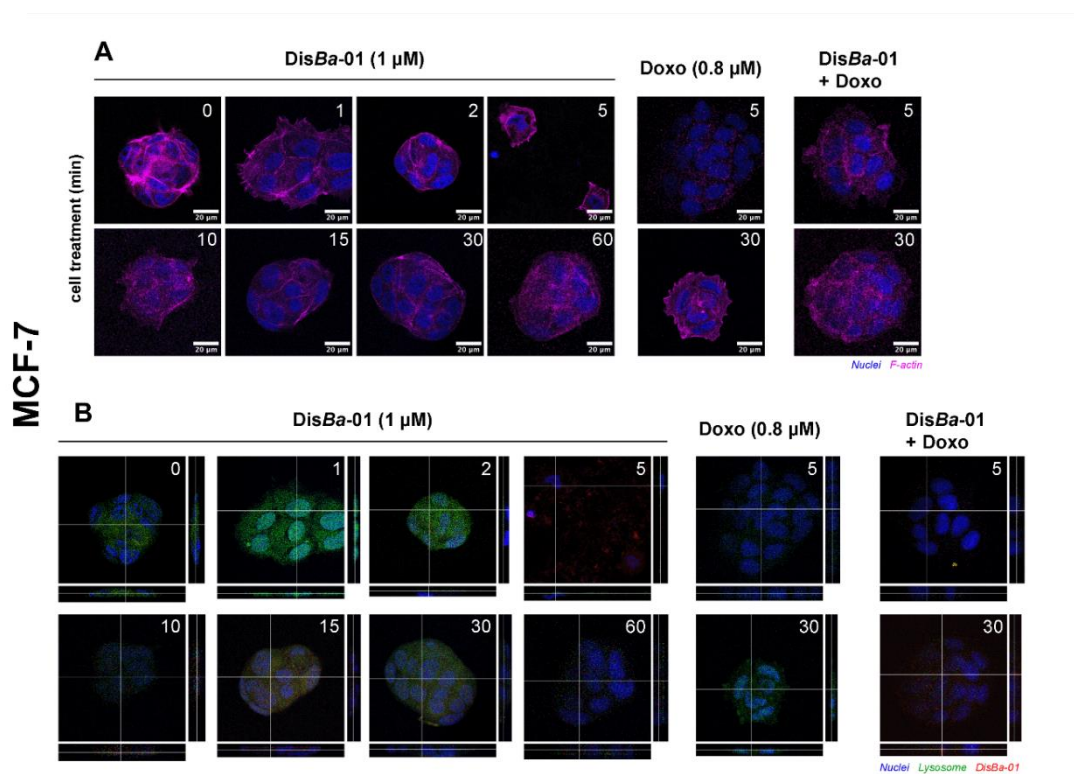
(A) Imagem de epifluorescência representativas de células MDA-MB-231 marcadas com DAPI e faloidina para visualização de núcleo e citoesqueleto, respectivamente. Barra de escala 50 µm. (B) Quantificação de área, perímetro e circularidade das células. Verifica-se de forma geral atuação proeminente de doxorrubicina e do tratamento combinado em alterações na morfologia quando comparadas com o grupo sem tratamento. (C) Imagem de epifluorescência representativas de esferoides MDA-MB-231 marcadas com DAPI e faloidina para visualização de núcleo e citoesqueleto, respectivamente. Barra de escala 100 µm. (D) Quantificação de área, perímetro e circularidade dos esferoides sem identificação de diferenças significativas. Para análise estatística, aplicou-se o teste de variância Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's. Os dados estão representados como mediana e intervalo interquartil. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes quando comparados aos grupos não tratado (a) Fonte: própria.

A linhagem MDA-MB-231, quando em monocamada, apresentou aumento de área e perímetro em células tratadas com doxorrubicina em comparação com os demais tratamentos (Figura 29A). Ao avaliar a circularidade, observou-se redução quando o tratamento com doxorrubicina e o tratamento combinado são comparados com o grupo não tratado (Figura 29B). No modelo 3D (Figura 29C), entretanto, não foram constatadas diferenças significativas frente à aplicação dos tratamentos (Figura 29D).

4.12 Rápida internalização de DisBa-01 em monocamada e cultivo 3D.

Ao avaliar a absorção tempo-dependente de DisBa-01 pelas células MCF-7, notou-se que a partir de 1 minuto da aplicação do tratamento foi possível observar a absorção da desintegrina em monocamada (Figura 30B). Durante o tratamento combinado, foi possível verificar melhor a absorção após 30 minutos, demonstrando que a presença do quimioterápico não influenciou na interação com DisBa-01.

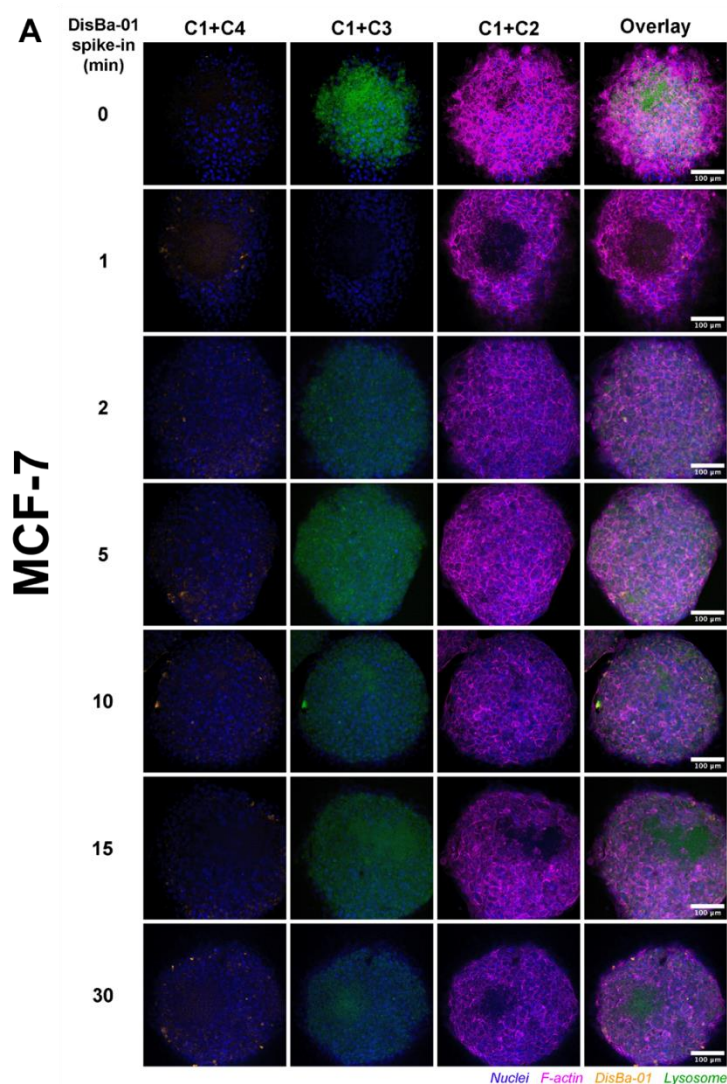
Figura 31 - Ensaio de *uptake* de DisBa-01 marcada com Alexa Fluor™ 546 em células MCF-7.



(A) Imagens de microscopia confocal representativas do ensaio tempo-dependente de *uptake* de DisBa-01 em células MCF-7 em monocamada. Marcação de núcleo e citoesqueleto com DAPI e faloidina, respectivamente. (B) Imagens representativas equivalentes ao observado no item (A), porém com lisossomos e DisBa-01 marcada. Verifica-se a absorção de DisBa-01 a partir de 1 minuto. Ao avaliar o tratamento combinado, a presença de interação com DisBa-01 é mais clara após 30 minutos de tratamento. Barra de escala 20 μm. Fonte: própria.

Ao avaliar o cultivo 3D, verificou-se que a partir de 1 minuto do ensaio houve interação de DisBa-01 com os esferoides, interação esta que se manteve em todos os períodos de incubação (Figura 31A).

Figura 32 - Ensaio de *uptake* de DisBa-01 marcada com Alexa Fluor™ 546 em esferoides de MCF-7.

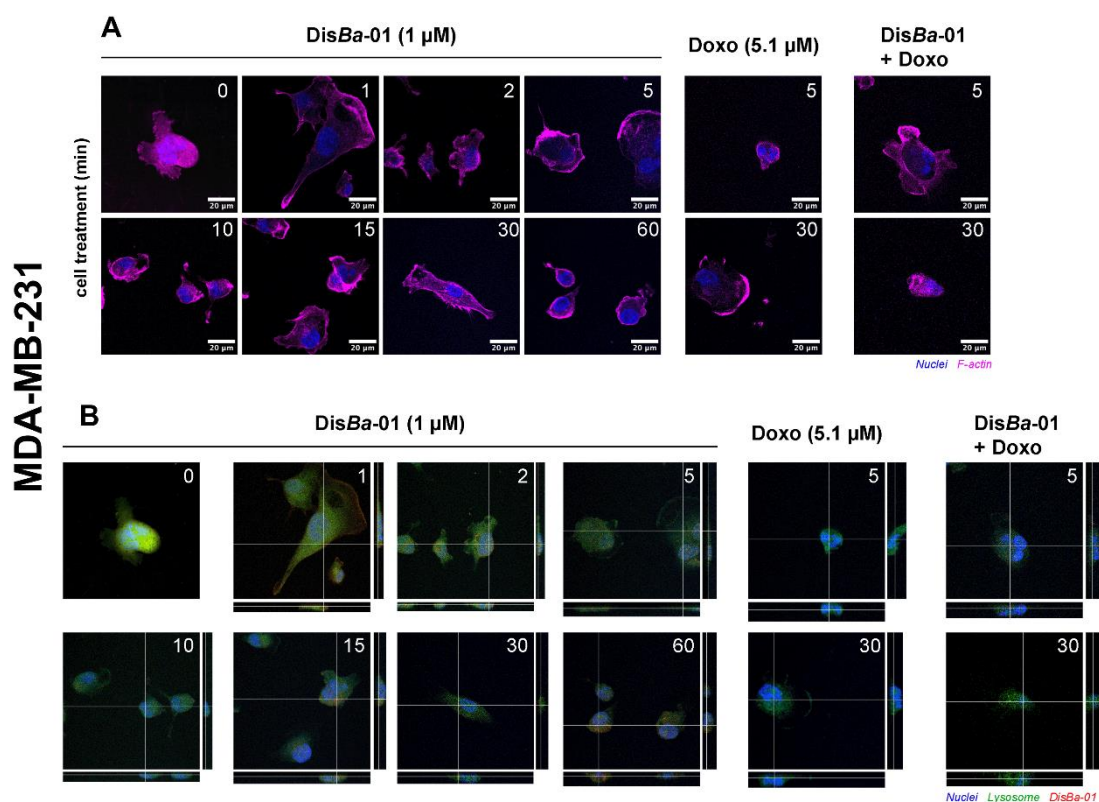


(A) Imagens de microscopia confocal representativas do ensaio tempo-dependente de *uptake* de DisBa-01 em esferoides de células MCF-7. Marcação de núcleo e citoesqueleto com DAPI (C1) e faloidina (C2), respectivamente, além da marcação de lisossomos (C3) e DisBa-01 (C4). Nota-se a absorção de DisBa-01 após 1 minuto a aplicação do tratamento. Barra de escala: 100 μm . Fonte: própria.

Em relação às células MDA-MB-231, as imagens representativas demonstram que, a partir de 1 minuto de tratamento, foi possível observar a interação entre a desintegrina e as células TNBC em monocamada. O tratamento combinado também

demostrou a internalização de DisBa-01 em 1 minutos após aplicação, certificando que a presença do quimioterápico não influenciou a absorção da desintegrina (Figura 32).

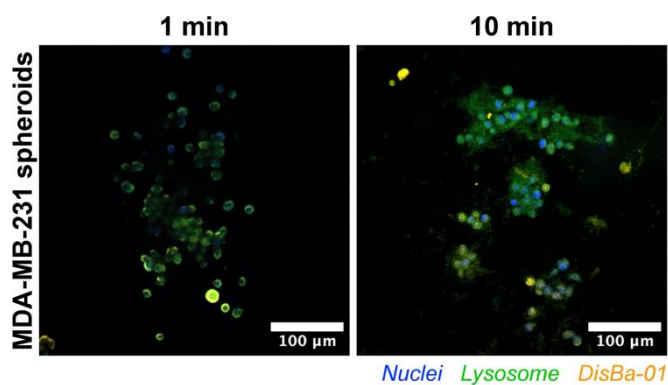
Figura 33 - Ensaio de *uptake* de DisBa-01 marcada com Alexa Fluor™ 546 em células MDA-MB-231.



(A) Imagens de microscopia confocal representativas do ensaio tempo-dependente de *uptake* de DisBa-01 em células MDA-MB-231 em monocamada. Marcação de núcleo e citoesqueleto com DAPI e faloidina, respectivamente. (B) Imagens representativas equivalentes ao observado no item (A), porém com lisossomos e DisBa-01 marcada. Verifica-se a absorção de DisBa-01 a partir de 1 minuto após o tratamento. Ao avaliar o tratamento combinado, a presença de interação com DisBa-01 já pode ser visualizada em 5 minutos após aplicação. Barra de escala: 20 μm. Fonte: própria.

A instabilidade do cultivo 3D das células MDA-MB-231 dificultou a análise relativa ao *uptake* de DisBa-01 (Figura 33).

Figura 34 - Ensaio de *uptake* de DisBa-01 marcada com Alexa Fluor 546 em esferoides de MDA-MB-231.



(A) Imagens de microscopia confocal representativas do ensaio tempo-dependente de *uptake* de DisBa-01 em esferoides de células MDA-MB-231. Observa-se a marcação de núcleos, lisossomos e DisBa-01. Devido à instabilidade na formação dos esferoides para a linhagem TNBC, apenas os períodos de 1 e 10 minutos após o tratamento puderam ser registrados. Apesar disso, verifica-se que a DisBa-01 teve interação com os aglomerados celulares. Barra de escala: 100 μm. Fonte: própria.

Embora, após 1 e 10 minutos do tratamento, tenha se verificado a marcação da desintegrina, não foi possível registrar outras observações nesse modelo.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, avaliamos os efeitos do tratamento combinado entre DisBa-01 e doxorrubicina em linhagens MCF-7 e MDA-MB-231. O uso dessas linhagens buscou representar dois subtipos celulares de câncer de mama com características distintas, o Luminal A e TNBC, respectivamente, buscando proporcionar uma análise comparativa robusta. Dentre algumas das diferenças que se buscou verificar neste trabalho, foi a expressão das integrinas αv e $\beta 3$ por citometria de fluxo, a fim de verificar sua biodisponibilidade nas linhagens celulares estudadas. As células MDA-MB-231, expressam a integrina $\beta 3$ em maior proporção que as células MCF-7, mas o inverso é observado em relação aos níveis da integrina αv , o que corrobora a literatura científica (Cerqueira *et al.*, 2022). Níveis elevados de integrina $\beta 3$ são correlacionados com a metástase a nível ósseo, radiosensibilização e promoção da quimiorresistência, contribuindo para o fenótipo mais agressivo observado em células MDA-MB-231. A integrina $\beta 3$ pode se combinar com outras integrinas, como $\alpha 11b$ e αv , sendo esta última um receptor de vitronectina (Mousa, 2003; Lautenschlaeger *et al.*, 2013).

A atuação do heterodímero $\alpha v\beta 3$ na progressão tumoral é consolidada na literatura, devido à sua alta taxa de expressão em tumores agressivos, desenvolvimento de metástases, bem como seu envolvimento na resistência à quimioterapia, radioterapia e imunoterapia (Gu *et al.*, 2023). Estudos demonstraram que o bloqueio de interações célula-matriz é capaz de mediar a efetividade de tratamentos sistêmicos. Verificou-se que o bloqueio de integrina $\alpha v\beta 3$ foi capaz de restaurar a morte celular por ferroptose em células de tumor de mama HER2⁺ resistentes ao tratamento induzido por RTKis (Nagpal *et al.*, 2023) e o bloqueio da integrina $\beta 1$, resultou em aumento da eficácia do tratamento com doxorrubicina em células MDA-MB-231 (Lovitt CJ, Shelper TB, Avery VM., 2018). Em 2016, Nair e colaboradores demonstram que a integrina $\beta 3$ é capaz de promover a quimiorresistência em células TNBC, inibindo a apoptose após contato com o quimioterápico epirrubina.

Desta forma, sugeriu-se que a aplicação do tratamento combinado de uma desintegrina junto à doxorrubicina, um fármaco comumente utilizado no tratamento

clínico do câncer de mama, pudesse conciliar a atuação de ambas as moléculas no tratamento contra as células-alvo. Para tal propósito, foi necessário avaliar a atuação individual de doxorrubicina nas linhagens celulares de interesse. Os ensaios demonstraram que as células apresentaram respostas distintas em contato com quimioterápico. Uma das principais características da quimioterapia é a redução da viabilidade celular. O tratamento combinado em células MCF-7 levou à significativa redução no metabolismo celular energético em decorrência do tempo e mediante aumento da concentração de doxorrubicina. Em células MDA-MB-231, observou-se respostas significativas de redução de proliferação celular somente após 24h, o maior tempo de exposição ao quimioterápico não exibiu resposta relevante. Os tratamentos contra tumores triplo-negativos têm a quimioterapia como principal estratégia de intervenção, com a doxorrubicina sendo frequentemente utilizada. Porém, a ativação de TEM e a regulação positiva de diversas moléculas sinalizadoras, como EGFR, agem como mecanismos de evasão ao tratamento (Paramanantham *et al.*, 2021). Estudos demonstram que a resistência de TNBC à doxorrubicina pode ser adquirida por interação direta com a integrina $\beta 1$, ativando a sinalização FAK/c-Src/ERK/STAT3. Esse fenômeno culmina na translocação nuclear de STAT3, um fator de transcrição que impulsiona a expressão da survivina (Nam *et al.*, 2017). Assim, é notável a importância exercida pelas integrinas sobre a progressão tumoral e resistência a terapias.

O tratamento utilizando DisBa-01 de forma isolada não afetou a viabilidade celular e esse fato pode ser explicado devido à capacidade da desintegrina de ativar vias de autofagia, impedindo a morte imediata por apoptose (Lino *et al.*, 2019). A autofagia é um processo que ocorre nos lisossomos e envolve a reciclagem de proteínas e organelas, promovendo a renovação celular (Tang *et al.*, 2020). Entretanto, no câncer sua atuação é mais complexa e estudos demonstram duplo papel da autofagia na progressão e na supressão tumoral. A autofagia desempenha funções importantes dentro das próprias células tumorais e no estroma circundante do microambiente tumoral, influenciando o crescimento do tumor e a resistência a medicamentos (Debnath; Gammoh; Ryan, 2023). O processo de autofagia em tumores estabelecidos viabiliza o crescimento celular descontrolado e o aumento das atividades metabólicas, auxiliando na sua manutenção (Kenific; Debnath, 2015). Todavia, a autofagia atua também na disponibilidade de nutrientes e fornece um meio

propício para a adaptação metabólica, além de ser um importante mecanismo homeostático. Isso sugere que a autofagia desempenha uma função paralela que protege o organismo contra o câncer e o consequente desequilíbrio da homeostase tecidual (Klionsky *et al.*, 2021). Os efeitos da autofagia parecem depender do estágio do tumor, da presença de mutações específicas e do contexto celular (Debnath; Gammoh; Ryan, 2023).

Ao realizar a combinação do tratamento entre DisBa-01 e doxorrubicina, constatou-se que houve redução significativa da proliferação celular em células MCF-7 mediante a aplicação da desintegrina (0,1, 0,5 e 1 μM) em associação com o quimioterápico (0,8 μM). A respeito das células MDA-MB-231, a combinação de DisBa-01 (0,5 μM) e doxorrubicina (5,1 μM) demonstrou redução significativa da viabilidade.

Ao assimilar um quimioterápico notavelmente conhecido por sua atuação citotóxica com DisBa-01, molécula que mostrou não comprometer a viabilidade celular, procuramos equilibrar os efeitos colaterais que podem ocorrer em um modelo *in vivo* ou em um teste clínico futuro, em que células saudáveis também podem sofrer efeitos adversos e serem comprometidas.

DisBa-01 não apresenta atuação citotóxica, mas como descrito na literatura científica e confirmado por este trabalho, é capaz de atuar inibindo vias de sinalização associadas à migração, invasão celular e expressão de enzimas envolvidas na transição epitelial-mesenquimal, como as metaloproteinases de matriz.

A migração celular é essencial para células tumorais na cascata metastática e, neste trabalho, avaliamos o comportamento migratório utilizando metodologias distintas que analisaram a migração coletiva e por quimiotaxia. Ambas as abordagens demonstraram menor porcentagem de células migrantes em células TNBC após tratamento com DisBa-01 isolada e em combinação com doxorrubicina. Entretanto, não foram verificadas alterações estatisticamente relevantes ao aplicar os mesmos tratamentos nas células MCF-7, sugerindo que a desintegrina e o quimioterápico possam interagir de forma mais eficiente com a subunidade β_3 , a qual é expressa de forma mais proeminente em células MDA-MB-231.

A integrina β_3 está envolvida com a direcionalidade da migração celular (Montenegro *et al.*, 2017) e sua inibição por DisBa-01 foi previamente avaliada com sucesso sob normóxia e hipóxia por nosso grupo de pesquisa, sugerindo que a

desintegrina reduza fibras de estresse nas células e ocasione perda de aderência (Casali *et al.*, 2022).

Em paralelo, investigamos a atividade de metaloproteinases de matriz a partir dos ensaios de migração celular, visto sua notória função na degradação da MEC durante as etapas de transição epitelial-mesenquimal e invasão (Amar; Smith; Fields, 2017). Os ensaios demonstraram que os sobrenadantes celulares de MCF-7 apresentaram atividade enzimática de MMP-2 e MMP-9 similares em comparação com os grupos tratados e grupo não tratado. Estudos prévios demonstraram que mesmo com modulações da MEC, a atividade de MMPs não foi afetada em MCF-7, as quais se mostraram menos invasiva que células MDA-MB-231 (Das *et al.*, 2017). Nos ensaios *transwell* e *wound healing*, a linhagem TNBC apresentou redução nos níveis de MMP-2 quando tratada com DisBa-01, demonstrando que a desintegrina é capaz de bloquear vias de sinalização relacionadas à expressão dessas metaloendopeptidases.

A invasão celular foi avaliada em matriz de gelatina fluorescente, conforme metodologia descrita anteriormente (Pachane *et al.*, 2022). Considerando que a lâmina basal é composta predominantemente por colágeno tipo IV (Paulsson, 1992), o ensaio buscou identificar alterações no comportamento invasivo mediante tratamento combinado. Observamos a redução da invasão para ambas as linhagens em tratamento combinado, sugerindo o sucesso no bloqueio de vias metabólicas promotoras da invasão por atuação conjunta da desintegrina e do quimioterápico.

O papel das integrinas na regulação da invasão celular no câncer de mama é amplamente reconhecido, visto que sua ativação induz à mecanotransdução derivada por Rho, além da sinalização de FAK em RTKs levar à fosforilação da tirosina no complexo E-caderina- β -catenina (Guo; Giancotti, 2004; Gaggioli *et al.*, 2007). A ação invasiva de células cancerosas é facilitada pela transformação do fenótipo celular mediante à transição epitelial-mesenquimal, a qual é realizada pela quinase ligada à integrina (ILK) e tem um impacto significativo na adesão e invasão celular (Hannigan; Troussard; Dedhar, 2005). Além disso, a redução da sinalização SNAIL/SLUG, expressão de E-caderina e de MMP-9 foram reportadas durante o processo invasivo (Guo; Giancotti, 2004; Hannigan; Troussard; Dedhar, 2005). A invasão mediada pela integrina $\alpha\beta 3$ é dependente de MMP-2 e facilita os comportamentos motis da célula (Li *et al.*, 2023).

Tendo em vista os resultados obtidos, supomos que o tratamento combinado interfira na migração direcional e invasão das células tumorais através do bloqueio da integrina $\alpha\beta 3$, interferindo na expressão de MMP-2 e permitindo a ação adjunta de doxorrubicina na viabilidade celular, impedindo, portanto, o desenvolvimento de um fenótipo mesenquimal.

Considerando que o cultivo celular tridimensional melhor mimetiza a complexidade de tumores sólidos, o tratamento combinado foi aplicado nesse modelo e comparamos com os resultados observados em monocamada. Buscou-se avaliar a exposição diferencial das moléculas empregadas e a interação célula-célula e célula-matriz em ensaios de viabilidade e morfologia em ambos os modelos de cultivo. As células MCF-7 formaram esferoides de maneira espontânea devido à expressão de E-caderina e demais moléculas de adesão (Chen *et al.*, 2012; Froehlich *et al.*, 2016).

Entretanto, a utilização de matriz exógena foi necessária para a formação de agregados celulares com formatos estrelados por MDA-MB-231, conforme descrito por Kenny e colaboradores em 2007. Nesse contexto, o cultivo tridimensional de células TNBC promove aumento da expressão de N-caderina e resulta em um perfil celular mesenquimal (Vinci *et al.*, 2012; Badea *et al.*, 2019; Huang; Yu; Tang, 2020). Esse fato dificultou a padronização do cultivo tridimensional para essa linhagem e o sucesso experimental.

Por meio do ensaio *live/dead*, constatou-se que as células MCF-7 exibiram redução de células vivas mediante a aplicação do tratamento combinado quando cultivadas em monocamada. Em modelo 3D, o tratamento com DisBa-01 resultou em menor proporção de células consideradas mortas. Neste último modelo, também foi possível observar um maior número de células necróticas no centro dos esferoides, as quais resultaram principalmente da baixa captação de oxigênio e nutrientes (Hirschhaeuser *et al.*, 2010). A linhagem TNBC, por sua vez, demonstrou redução da porcentagem de células vivas mediante o tratamento combinado em monocamada.

De forma curiosa, alterações morfológicas nas células e nos esferoides foram observados mediante tratamento individual ou combinado com DisBa-01. Em monocamada, as células MCF-7 e MDA-MB-231 apresentaram retração e aumento de circularidade quando expostas à desintegrina. Em cultivo tridimensional, percebeu-se que doxorrubicina impediu a formação de esferoides compactos na linhagem MCF-7 e que o tratamento combinado auxiliou as células a manterem-se coesas.

Estudos anteriores demonstraram que esferoides de MCF-7 apresentaram maior expressão de proteínas pró-sobrevivência após tratamento com doxorrubicina, propondo uma possível indução à resistência ao medicamento (Lovitt CJ, Shelper TB, Avery VM., 2018). Sugerimos que o aumento da circularidade esteja relacionado com alterações na atuação de moléculas de adesão e na interação célula-célula e célula-matriz, fazendo com que essa compactação impeça que as células localizadas nas bordas do esferoide se projetem para o ambiente. Em células TNBC, entretanto, as características celulares e a expressão de marcadores mesenquimais se revelaram uma limitação ao estudo, impedindo a obtenção de resultados conclusivos em modelo tridimensional.

Com o intuito de verificar a internalização de DisBa-01 nos modelos 2D e 3D, ensaios de *uptake* por microscopia confocal permitiram avaliar que a interação com as células ocorre ao primeiro minuto após a aplicação da proteína. O tratamento com doxorrubicina não interferiu na absorção da desintegrina pelas células. A contramarcagem das células para lisossomos, também foi realizada para investigar as vias de metabolismo da desintegrina.

Além de atuarem na degradação e reciclagem de componentes celulares, os lisossomos também são capazes de atuar em vias de sinalização, na atividade metabólica celular, no reparo da membrana plasmática e na remodelação da matriz extracelular (MEC). Além disso, uma de suas principais proteínas (LAMP1) são expressas de maneira elevada em tumores altamente metastáticos (Tang *et al.*, 2020). A marcação expressiva de lisossomos nos ensaios com MCF-7 foi realizada em caráter qualitativo. Visto que há aumento da síntese de lisossomos durante o processo de autofagia e, sendo esse processo favorecido por DisBa-01, a quantificação da intensidade de fluorescência e colocalização entre a desintegrina e a organela deverá ser avaliada futuramente para cada condição.

O presente estudo serve como passo inicial na investigação da ação conjunta de DisBa-01, uma proteína recombinante que apresenta fortes evidências antineoangiogênicas e antimigratórias, com um composto quimioterápico atualmente aplicado no tratamento clínico de pacientes com câncer. Com base nos resultados inéditos obtidos, sugere-se que DisBa-01 possa agir de forma aditiva ao quimioterápico, assimilando seu efeito sem comprometer a atuação de doxorrubicina. É interessante avaliar a possibilidade de reduzir a dose necessária do quimioterápico

ao combiná-lo com DisBa-01, sem comprometer sua eficácia e, de forma complementar, reduzir a capacidade invasiva e migratória das células tumorais.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo buscou ampliar o conhecimento sobre os processos celulares em que a integrina $\alpha\beta3$ está envolvida, bem como contribuir para a concepção de futuras abordagens terapêuticas ao realizar o tratamento combinado de DisBa-01 e doxorrubicina em células tumorais de mama. Em células MCF-7, o tratamento combinado resultou em diminuição da invasão celular, viabilidade celular e circularidade em modelo bidimensional. Em modelo 3D, o tratamento combinado resultou em esferoides mais coesos para essa linhagem celular. Ao considerar as células MDA-MB-231, verificou-se que o mesmo tratamento resultou em redução da invasão, viabilidade celular e circularidade em modelo 2D, além de diminuição da migração celular individualizada e coletiva. Os achados permitem avaliar a redução da dose necessária do quimioterápico quando combinado com DisBa-01, sem comprometer a eficácia do fármaco, sugerindo uma atuação aditiva entre as duas moléculas. Essa abordagem visa diminuir os efeitos colaterais citotóxicos do tratamento convencional, indicando novas abordagens para terapias antitumorais conjugadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUWATFA, Waad H.; PITT, William G.; HUSSEINI, Ghaleb A. Scaffold-based 3D cell culture models in cancer research. **Journal of Biomedical Science**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 7, 2024.
- AMAR, Sabrina; SMITH, Lyndsay; FIELDS, Gregg B. Matrix metalloproteinase collagenolysis in health and disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, [s. l.], v. 1864, n. 11, p. 1940–1951, 2017.
- BADEA, Madalina Andreea *et al.* Influence of Matrigel on Single- and Multiple-Spheroid Cultures in Breast Cancer Research. **SLAS Discovery**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 563–578, 2019.
- BAKER, Brendon M.; CHEN, Christopher S. Deconstructing the third dimension – how 3D culture microenvironments alter cellular cues. **Journal of Cell Science**, [s. l.], 2012.
- BECCENERI, Amanda Blanque *et al.* Nanoencapsulation of Ruthenium Complex Ru(ThySMet): A Strategy to Improve Selective Cytotoxicity against Breast Tumor Cells in 2D and 3D Culture Models. **Current Drug Discovery Technologies**, [s. l.], v. 21, n. 2, 2024.
- BEŇAČKA, Roman *et al.* Classic and New Markers in Diagnostics and Classification of Breast Cancer. **Cancers**, [s. l.], v. 14, n. 21, p. 5444, 2022.
- BENBOUBKER, Valentin *et al.* Cancer Cell Phenotype Plasticity as a Driver of Immune Escape in Melanoma. **Frontiers in immunology**, [s. l.], v. 13, p. 873116, 2022.
- BIANCHINI, Giampaolo *et al.* Treatment landscape of triple-negative breast cancer — expanded options, evolving needs. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 91–113, 2022.
- BRAY, Freddie *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], v. 74, n. 3, p. 229–263, 2024.
- BROWN, Joel S. *et al.* Updating the Definition of Cancer. **Molecular Cancer Research**, [s. l.], v. 21, n. 11, p. 1142–1147, 2023.
- CARMONA-FONTAINE, Carlos *et al.* Metabolic origins of spatial organization in the tumor microenvironment. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 114, n. 11, p. 2934–2939, 2017.
- CASALI, Bruna Carla *et al.* Blockage of $\alpha\beta 3$ integrin in 3D culture of triple-negative breast cancer and endothelial cells inhibits migration and discourages endothelial-to-mesenchymal plasticity. **Biochemistry and Biophysics Reports**, [s. l.], v. 38, p. 101686, 2024.

- CASALI, Bruna C. *et al.* The Effects of $\alpha\beta 3$ Integrin Blockage in Breast Tumor and Endothelial Cells under Hypoxia In Vitro. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 3, 2022.
- CERQUEIRA, Otto Luiz Dutra *et al.* Prognostic value of integrin αV expression and localization pattern in invasive breast carcinomas. **Neoplasia**, [s. l.], v. 30, p. 100803, 2022.
- CHASTNEY, Megan R.; CONWAY, James R.W.; IVASKA, Johanna. Integrin adhesion complexes. **Current Biology**, [s. l.], v. 31, n. 10, p. R536–R542, 2021.
- CHEANG, Maggie C. U. *et al.* Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, [s. l.], v. 101, n. 10, p. 736–750, 2009.
- CHEN, Lei *et al.* The enhancement of cancer stem cell properties of MCF-7 cells in 3D collagen scaffolds for modeling of cancer and anti-cancer drugs. **Biomaterials**, [s. l.], v. 33, n. 5, p. 1437–1444, 2012.
- COMȘA, Șerban; CÎMPEAN, Anca Maria; RAICA, Marius. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. **Anticancer research**, [s. l.], v. 35, n. 6, p. 3147–54, 2015.
- COX, Thomas R. The matrix in cancer. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 217–238, 2021.
- CRUZ DA SILVA, Elisabete *et al.* Role of Integrins in Resistance to Therapies Targeting Growth Factor Receptors in Cancer. **Cancers**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 692, 2019.
- DANILUCCI, Taís M. *et al.* Recombinant RGD-disintegrin DisBa-01 blocks integrin $\alpha\beta 3$ and impairs VEGF signaling in endothelial cells. **Cell Communication and Signaling**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 27, 2019.
- DAS, Alakesh *et al.* MMP proteolytic activity regulates cancer invasiveness by modulating integrins. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 14219, 2017.
- DAS, Sanjib; AMIN, Sk Abdul; JHA, Tarun. Inhibitors of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) for the management of hematological malignancies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 223, p. 113623, 2021.
- DE PALMA, Michele; BIZIATO, Daniela; PETROVA, Tatiana V. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 17, n. 8, p. 457–474, 2017.
- DEBNATH, Jayanta; GAMMOH, Noor; RYAN, Kevin M. Autophagy and autophagy-related pathways in cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 24, n. 8, p. 560–575, 2023.

DEEPAK, K.G.K. *et al.* Tumor microenvironment: Challenges and opportunities in targeting metastasis of triple negative breast cancer. **Pharmacological Research**, [s. l.], v. 153, p. 104683, 2020.

DHALIWAL, Dolly; SHEPHERD, Trevor G. Molecular and cellular mechanisms controlling integrin-mediated cell adhesion and tumor progression in ovarian cancer metastasis: a review. **Clinical & Experimental Metastasis**, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 291–301, 2022.

DUGGAN, Catherine *et al.* National health system characteristics, breast cancer stage at diagnosis, and breast cancer mortality: a population-based analysis. **The Lancet Oncology**, [s. l.], v. 22, n. 11, p. 1632–1642, 2021.

FARES, Jawad *et al.* Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 28, 2020.

FENG, Yixiao *et al.* **Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis.** [S. l.]: Chongqing yi ke da xue, di 2 lin chuang xue yuan Bing du xing gan yan yan jiu suo, 2018.

FERREIRA, L.P.; GASPAR, V.M.; MANO, J.F. Design of spherically structured 3D in vitro tumor models -Advances and prospects. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 75, p. 11–34, 2018.

FONTOURA, Julia C. *et al.* Comparison of 2D and 3D cell culture models for cell growth, gene expression and drug resistance. **Materials Science and Engineering: C**, [s. l.], v. 107, p. 110264, 2020.

FORSTER, Jake *et al.* A review of the development of tumor vasculature and its effects on the tumor microenvironment. **Hypoxia**, [s. l.], v. Volume 5, p. 21–32, 2017.

FROEHLICH, Karolin *et al.* Generation of Multicellular Breast Cancer Tumor Spheroids: Comparison of Different Protocols. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, [s. l.], v. 21, n. 3–4, p. 89–98, 2016.

GAGGIOLI, Cedric *et al.* Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. **Nature Cell Biology**, [s. l.], v. 9, n. 12, p. 1392–1400, 2007.

GE, Jingyu *et al.* The advance of adjuvant treatment for triple-negative breast cancer. **Cancer Biology and Medicine**, [s. l.], v. 18, n. , p. 0–0, 2021.

GERSTBERGER, Stefanie; JIANG, Qingwen; GANESH, Karuna. Metastasis. **Cell**, [s. l.], v. 186, n. 8, p. 1564–1579, 2023.

GRADISHAR, William J. *et al.* Breast Cancer, Version 3.2024, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, [s. l.], v. 22, n. 5, p. 331–357, 2024.

GU, Yanlun *et al.* The challenges and opportunities of $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -based therapeutics in cancer: From bench to clinical trials. **Pharmacological Research**, [s. l.], v. 189, p. 106694, 2023.

GUIDA, Florence *et al.* Global and regional estimates of orphans attributed to maternal cancer mortality in 2020. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 28, n. 12, p. 2563–2572, 2022.

GUO, Wenjun; GIANCOTTI, Filippo G. Integrin signalling during tumour progression. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 5, n. 10, p. 816–826, 2004.

HAMIDI, Hellyeh; IVASKA, Johanna. **Every step of the way: Integrins in cancer progression and metastasis**. [S. l.]: Nature Research, 2018.

HANAHAH, Douglas. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 31–46, 2022.

HANAHAH, Douglas; WEINBERG, Robert A. **Hallmarks of cancer: The next generation**. [S. l.: s. n.], 2011.

HANNIGAN, Gregory; TROUSSARD, Armelle A.; DEDHAR, Shoukat. Integrin-linked kinase: a cancer therapeutic target unique among its ILK. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 51–63, 2005.

HE, Kai *et al.* Metastasis organotropism in colorectal cancer: advancing toward innovative therapies. **Journal of Translational Medicine**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 612, 2023.

HELMINK, Beth A. *et al.* The microbiome, cancer, and cancer therapy. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 377–388, 2019.

HERNANDEZ-AYA, Leonel F.; GONZALEZ-ANGULO, Ana M. Adjuvant Systemic Therapies in Breast Cancer. **Surgical Clinics of North America**, [s. l.], v. 93, n. 2, p. 473–491, 2013.

HIRSCHHAEUSER, Franziska *et al.* Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 148, n. 1, p. 3–15, 2010.

HSU, Jennifer L.; HUNG, Mien-Chie. The role of HER2, EGFR, and other receptor tyrosine kinases in breast cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, [s. l.], v. 35, n. 4, p. 575–588, 2016.

HUANG, Jiacheng *et al.* Extracellular matrix and its therapeutic potential for cancer treatment. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 153, 2021.

INDRA *et al.* The relationship between NF κ B, HER2, ER expression and anthracycline -based neoadjuvant chemotherapy response in local advanced stadium breast cancer: A cohort study in Eastern Indonesia. **Annals of Medicine & Surgery**, [s. l.], v. 63, 2021.

INIC, Zorka *et al.* Difference between Luminal A and Luminal B Subtypes According to Ki-67, Tumor Size, and Progesterone Receptor Negativity Providing Prognostic Information. **Clinical Medicine Insights: Oncology**, [s. l.], v. 8, 2014.

JAYADEV, Ranjay; SHERWOOD, David R. Basement membranes. **Current Biology**, [s. l.], v. 27, n. 6, p. R207–R211, 2017.

JOHNSON, Karen S; CONANT, Emily F; SOO, Mary Scott. Molecular Subtypes of Breast Cancer: A Review for Breast Radiologists. **Journal of Breast Imaging**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 12–24, 2021.

KADRY, Yasmin A. *et al.* Differences in self-association between kindlin-2 and kindlin-3 are associated with differential integrin binding. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 295, n. 32, p. 11161–11173, 2020.

KENIFIC, Candia M.; DEBNATH, Jayanta. Cellular and metabolic functions for autophagy in cancer cells. **Trends in Cell Biology**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 37–45, 2015.

KENNY, Paraic A. *et al.* The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. **Molecular Oncology**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 84–96, 2007.

KLIONSKY, Daniel J *et al.* Autophagy in major human diseases. **The EMBO Journal**, [s. l.], v. 40, n. 19, 2021.

KOLVEKAR, Nivedita *et al.* How snake venom disintegrins affect platelet aggregation and cancer proliferation. **Toxicon**, [s. l.], v. 221, p. 106982, 2023.

KRISHNAMURTI, Uma; SILVERMAN, Jan F. HER2 in Breast Cancer. **Advances in Anatomic Pathology**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 100–107, 2014.

KUMAR, Pankaj; AGGARWAL, Rupali. An overview of triple-negative breast cancer. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, [s. l.], v. 293, n. 2, p. 247–269, 2016.

LANGSTEN, Kendall L. *et al.* Comparative Approach to the Temporo-Spatial Organization of the Tumor Microenvironment. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 9, 2019.

LARONHA, Helena; CALDEIRA, Jorge. Structure and Function of Human Matrix Metalloproteinases. **Cells**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 1076, 2020.

LAUTENSCHLAEGER, Tim *et al.* In vitro study of combined cilengitide and radiation treatment in breast cancer cell lines. **Radiation Oncology**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 246, 2013.

LEE, Genee Y *et al.* Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. **Nature Methods**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 359–365, 2007.

LEPUCKI, Arkadiusz *et al.* The Role of Extracellular Matrix Proteins in Breast Cancer. **Journal of Clinical Medicine**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 1250, 2022.

- LI, Siyi *et al.* Integrin signaling in cancer: bidirectional mechanisms and therapeutic opportunities. **Cell Communication and Signaling**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 266, 2023.
- LI, Meng *et al.* Integrins as attractive targets for cancer therapeutics. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, [s. l.], v. 11, n. 9, p. 2726–2737, 2021.
- LI, Yaqi *et al.* Targeting the tumor microenvironment to overcome immune checkpoint blockade therapy resistance. **Immunology Letters**, [s. l.], v. 220, p. 88–96, 2020.
- LINO, Rafael Luis Bressani *et al.* Alphavbeta3 integrin blocking inhibits apoptosis and induces autophagy in murine breast tumor cells. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, [s. l.], v. 1866, n. 12, 2019.
- LOVITT, Carrie; SHELPER, Todd; AVERY, Vicky. Advanced Cell Culture Techniques for Cancer Drug Discovery. **Biology**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 345–367, 2014.
- LOVITT, Carrie J.; SHELPER, Todd B.; AVERY, Vicky M. Doxorubicin resistance in breast cancer cells is mediated by extracellular matrix proteins. **BMC Cancer**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 41, 2018.
- LU, Zhihao *et al.* Epigenetic therapy inhibits metastases by disrupting premetastatic niches. **Nature**, [s. l.], v. 579, n. 7798, p. 284–290, 2020.
- LUO, Jing *et al.* 14, 15-EET induces breast cancer cell EMT and cisplatin resistance by up-regulating integrin $\alpha\beta 3$ and activating FAK/PI3K/AKT signaling. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 23, 2018.
- LUO, Zhen *et al.* Hypoxia signaling in human health and diseases: implications and prospects for therapeutics. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 218, 2022.
- M, Mats Paulsson. Basement Membrane Proteins: Structure, Assembly, and Cellular Interactions. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], v. 27, n. 1–2, p. 93–127, 1992.
- MATRO, Jennifer M. *et al.* Inflammatory Breast Cancer Management in the National Comprehensive Cancer Network: The Disease, Recurrence Pattern, and Outcome. **Clinical Breast Cancer**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 1–7, 2015.
- MONTENEGRO, Cyntia F. *et al.* Blocking $\alpha\beta 3$ integrin by a recombinant RGD disintegrin impairs VEGF signaling in endothelial cells. **Biochimie**, [s. l.], v. 94, n. 8, p. 1812–1820, 2012.
- MONTENEGRO, Cyntia F. *et al.* Inhibition of $\alpha\beta 3$ integrin induces loss of cell directionality of oral squamous carcinoma cells (OSCC). **PLOS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. e0176226, 2017.
- MOUSA, Shaker A. α vitronectin receptors in vascular-mediated disorders. **Medicinal Research Reviews**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 190–199, 2003.

MUENST, S. *et al.* The immune system and cancer evasion strategies: therapeutic concepts. **Journal of Internal Medicine**, [s. l.], v. 279, n. 6, p. 541–562, 2016.

MUTEBI, Miriam *et al.* Breast cancer treatment: A phased approach to implementation. **Cancer**, [s. l.], v. 126, n. S10, p. 2365–2378, 2020.

NABA, Alexandra. Mechanisms of assembly and remodelling of the extracellular matrix. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 25, n. 11, p. 865–885, 2024.

NAGPAL, Aadya *et al.* **Integrin $\alpha\beta 3$ is a master regulator of resistance to TKI-induced ferroptosis in HER2-positive breast cancer.** [S. l.: s. n.], [s. d.].

NAIR, Madhumathy G. *et al.* $\beta 3$ integrin promotes chemoresistance to epirubicin in MDA-MB-231 through repression of the pro-apoptotic protein, BAD. **Experimental Cell Research**, [s. l.], v. 346, n. 1, p. 137–145, 2016.

NAM, KeeSoo *et al.* Binding of galectin-1 to integrin $\beta 1$ potentiates drug resistance by promoting survivin expression in breast cancer cells. **Oncotarget**, [s. l.], v. 8, n. 22, p. 35804–35823, 2017.

NIEBERLER, Markus *et al.* Exploring the Role of RGD-Recognizing Integrins in Cancer. **Cancers**, [s. l.], v. 9, n. 12, p. 116, 2017.

ORRANTIA-BORUNDA, Erasmo *et al.* Subtypes of Breast Cancer. *In*: BREAST CANCER. [S. l.]: Exon Publications, 2022. p. 31–42.

O'SULLIVAN, Ciara C.; LOPRINZI, Charles L.; HADDAD, Tufia C. Updates in the Evaluation and Management of Breast Cancer. **Mayo Clinic Proceedings**, [s. l.], v. 93, n. 6, p. 794–807, 2018.

PACHANE, Bianca Cruz *et al.* Small Extracellular Vesicles from Hypoxic Triple-Negative Breast Cancer Cells Induce Oxygen-Dependent Cell Invasion. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 20, p. 12646, 2022.

PARAMANANTHAM, Anjugam *et al.* Doxorubicin-Resistant TNBC Cells Exhibit Rapid Growth with Cancer Stem Cell-like Properties and EMT Phenotype, Which Can Be Transferred to Parental Cells through Autocrine Signaling. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 22, p. 12438, 2021.

PARK, Misung *et al.* Breast Cancer Metastasis: Mechanisms and Therapeutic Implications. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 12, p. 6806, 2022.

PASTUSHENKO, Ievgenia; BLANPAIN, Cédric. EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. **Trends in Cell Biology**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 212–226, 2019.

PONDÉ, Noam F.; ZARDAVAS, Dimitrios; PICCART, Martine. Progress in adjuvant systemic therapy for breast cancer. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 27–44, 2019.

POOLE, Joshua J. A.; MOSTAÇO-GUIDOLIN, Leila B. Optical Microscopy and the Extracellular Matrix Structure: A Review. **Cells**, [s. l.], v. 10, n. 7, p. 1760, 2021.

POORNIMA, Kolluri *et al.* Implications of Three-Dimensional Cell Culture in Cancer Therapeutic Research. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 12, 2022.

POTTIER, Charles *et al.* Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer: Breakthrough and Challenges of Targeted Therapy. **Cancers**, [s. l.], v. 12, n. 3, 2020.

PRIHANTONO; FARUK, Muhammad. Breast cancer resistance to chemotherapy: When should we suspect it and how can we prevent it?. **Annals of Medicine and Surgery**, [s. l.], v. 70, p. 102793, 2021.

RAEISI, Mortaza *et al.* Anoikis in cancer: The role of lipid signaling. **Cell Biology International**, [s. l.], v. 46, n. 11, p. 1717–1728, 2022.

RAMOS, Oscar 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**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 53–64, 2008.

RICARD-BLUM, S. The Collagen Family. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. a004978–a004978, 2011.

SALINAS-VERA, Yarely M. *et al.* Three-Dimensional 3D Culture Models in Gynecological and Breast Cancer Research. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 12, 2022a.

SALINAS-VERA, Yarely M. *et al.* Three-Dimensional 3D Culture Models in Gynecological and Breast Cancer Research. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 12, 2022b.

SARHANGI, Negar *et al.* Breast cancer in the era of precision medicine. **Molecular Biology Reports**, [s. l.], v. 49, n. 10, p. 10023–10037, 2022.

SELISTRE-DE-ARAUJO, Heloisa S. *et al.* Snake Venom Disintegrins and Cell Migration. **Toxins**, [s. l.], v. 2, n. 11, p. 2606–2621, 2010.

TACAR, Oktay; SRIAMORNSAK, Pornsak; DASS, Crispin R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [s. l.], v. 65, n. 2, p. 157–170, 2013.

TANG, Tao *et al.* The role of lysosomes in cancer development and progression. **Cell & Bioscience**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 131, 2020.

TSANG, Julia Y.S.; TSE, Gary M. Molecular Classification of Breast Cancer. **Advances in Anatomic Pathology**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 27–35, 2020.

TUNE, Bernadette Xin Jie *et al.* Matrix Metalloproteinases in Chemoresistance: Regulatory Roles, Molecular Interactions, and Potential Inhibitors. **Journal of Oncology**, [s. l.], v. 2022, p. 1–25, 2022.

VANHARANTA, Sakari; MASSAGUÉ, Joan. Origins of Metastatic Traits. **Cancer Cell**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 410–421, 2013.

VERGANI, Laura; GRATTAROLA, Myriam; NICOLINI, Claudio. Modifications of chromatin structure and gene expression following induced alterations of cellular shape. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, [s. l.], v. 36, n. 8, p. 1447–1461, 2004.

VERJANS, Eddy-Tim *et al.* Three-dimensional cell culture models for anticancer drug screening: Worth the effort?. **Journal of Cellular Physiology**, [s. l.], v. 233, n. 4, p. 2993–3003, 2018.

VINCI, Maria *et al.* Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. **BMC Biology**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 29, 2012.

WAKS, Adrienne G.; WINER, Eric P. Breast Cancer Treatment. **JAMA**, [s. l.], v. 321, n. 3, p. 288, 2019.

WANG, Juan *et al.* TGF-beta signaling in cancer radiotherapy. **Cytokine**, [s. l.], v. 148, p. 155709, 2021.

WANG, Jun; WU, San-Gang. Breast Cancer: An Overview of Current Therapeutic Strategies, Challenge, and Perspectives. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, [s. l.], v. Volume 15, p. 721–730, 2023.

WANG, Jiani; XU, Binghe. Targeted therapeutic options and future perspectives for HER2-positive breast cancer. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 34, 2019.

WEIN, Lironne; LOI, Sherene. Mechanisms of resistance of chemotherapy in early-stage triple negative breast cancer (TNBC). **The Breast**, [s. l.], v. 34, p. S27–S30, 2017.

WELCH, Danny R.; HURST, Douglas R. Defining the Hallmarks of Metastasis. **Cancer Research**, [s. l.], v. 79, n. 12, p. 3011–3027, 2019.

YANG, Jing *et al.* Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 341–352, 2020.

ZERDES, Ioannis *et al.* Abstract P2-21-02: Longitudinal tumor-immune microenvironment changes in patients with clinical luminal A early breast cancer treated with neoadjuvant palbociclib and endocrine therapy: results from the Swedish

randomized PREDIX Luminal A trial. **Cancer Research**, [s. l.], v. 83, n. 5_Supplement, p. P2-21-02-P2-21-02, 2023.

ZHU, Yinxing *et al.* **Progress and challenges of immunotherapy in triple-negative breast cancer**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2021.