

Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”

UNIGRANRIO

LAURA ABRAHÃO GONÇALVES

**EFEITO DO TRATAMENTO COMBINADO ENTRE TRASTUZUMABE E
JARARACINA RECOMBINANTE SOBRE A EMT NO CÂNCER DE MAMA HER2+**

RIO DE JANEIRO

2025

Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”
UNIGRANRIO

LAURA ABRAHÃO GONÇALVES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza
Herdy”, como requisito parcial para a obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Denise de Abreu Pereira, PhD
Co-orientadora: Ana Luiza Frango de Sant’Anna

RIO DE JANEIRO

2025

LAURA ABRAHÃO GONÇALVES

**EFEITO DO TRATAMENTO COMBINADO ENTRE TRASTUZUMABE E
JARARACINA RECOMBINANTE SOBRE A EMT NO CÂNCER DE MAMA HER2+**

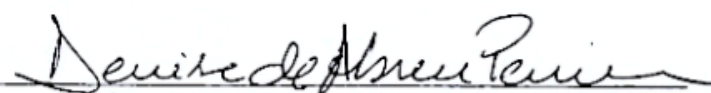
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade do Grande Rio "Prof. José de Souza
Herdy", como requisito parcial para a obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina.

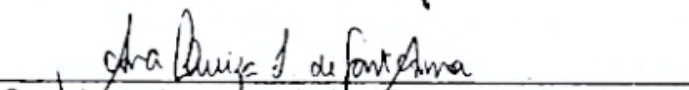
Orientadora: Denise de Abreu Pereira
Co-orientadora: Ana Luiza Frango de Sant'Anna

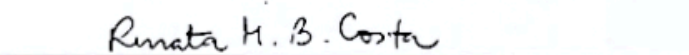
Aprovada em:

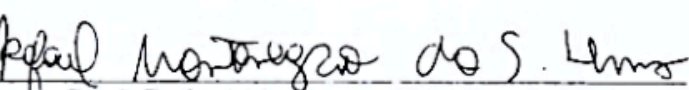
Barra da Tijuca, 14 de novembro de 2025.

BANCA EXAMINADORA


Orientadora: Denise de Abreu Pereira


Co-orientadora: Ana Luiza Frango de Sant'Anna


Prof. Renata Machado Brandão Costa


Prof. Rafael Montenegro da Silva Lima

AGRADECIMENTOS

Agradeço, acima de tudo, a Deus por sempre colocar as oportunidades certas no meu caminho, mesmo eu achando que não é para mim. Por sempre estar ao meu lado e me guiar na minha jornada, provando para mim que eu sou capaz.

Agradeço à minha família por sempre apoiarem minhas decisões, por darem suas opiniões e mostrarem novos pontos de vista. Agradeço ao meu pai, Celso, por ser meu maior companheiro e fiel escudeiro a todo momento, por me ajudar com literalmente qualquer coisa que eu precisar. Agradeço à minha mãe, Andrea, por ser minha melhor amiga, por me orientar na vida e me mostrar o caminho das pedras. Agradeço aos meus irmãos, Breno e Ian, por deixarem minha vida mais colorida com todas as bobagens. Agradeço à Juliana, que me aguentou desde criança, me viu graduar no ensino fundamental, ensino médio e agora no ensino superior. Agradeço à Alice, por todas as conversas, por me mostrar outras formas de pensar e por ser uma mulher inspiradora. Agradeço ao meu dindo Maurício por sempre me lembrar que suas portas estão abertas e que você está disposto a me ajudar com qualquer coisa. Agradeço ao Rocky, que, por anos, me aguentou sendo um grude. Você foi uma das melhores experiências da minha vida, filhote! Eu sou extremamente abençoada por tê-los em minha vida e não há nada que eu não faria por vocês.

Agradeço à minha orientadora, Dra. Denise, por me dar essa oportunidade, por ter paciência de me explicar, por ter me apoiado e me incentivado e por me guiar pelos meus erros. Cresci muito com essa oportunidade. Obrigada por ter me acolhido e acreditado em mim. Agradeço também à minha co-orientadora, Ana, por muitas coisas, mas principalmente pela paciência. Dei trabalho, eu sei, mas vocês sempre estiveram ali me incentivando e me ensinando a ser um pouco melhor a cada dia. Obrigada por ter me guiado ao longo deste ano.

Agradeço ao José Morgado, chefe do Programa de Oncobiologia Celular e Molecular e aos integrantes do projeto, Bárbara, Sofia, Yuri, Ana Clara, Esther, Paula, Michelle, Renata, Paula, Daniela, Clarisse e Maria. Agradeço também ao técnico Giovanni, e ao Leonardo Murad por toda a ajuda, risadas e por me receberem de braços abertos. Vocês são incríveis!

Agradeço à Dra. Teresa de Souza Fernandez Seixas, líder do Programa de Terapia Celular e Genética, do Laboratório de Citogenética do Centro de Transplante de Medula Óssea do Hospital do Câncer 1 (HC1), por conceder os reagentes e espaço para realizar os experimentos de PCR. Agradeço à Dra. Viviane Lamim Lovatel por me ensinar o PCR. Muito obrigada por toda atenção, paciência e cuidado. Agradeço, também, às meninas do projeto, Beatriz Ferreira, Gabriela Farias e Rafaela Silvestre, por me receberem tão bem.

Agradeço à Dra. Russolina Benedeta Zingali, chefe do laboratório de Hemostasia e Venenos - IBqM/UFRJ, pela colaboração com o projeto e pela oportunidade de trabalhar com a jararacina recombinante.

Por fim, agradeço ao Ministério da Saúde, ao CNPQ e ao INCA pela ajuda financeira e por disponibilizarem os materiais necessários para os experimentos. Sem sua ajuda esse trabalho não teria sido possível.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação morfológica do carcinoma mamário.....	8
Figura 2 - Mecanismos de ação do Trastuzumabe	10
Figura 3 - Estrutura, conformação e sinalização das integrinas	12
Figura 4 - Sinalização cooperativa entre receptores tirosina-quinase e integrina	13
Figura 5 - Transição Epitélio-Mesênquima	15
Figura 6 - Domínios de ligação e as integrinas-alvo	16
Figura 7 - Estrutura da jararacina	17
Figura 8 - Morfologia celular após os tratamentos	22
Figura 9 - Tabela dos <i>primers</i> desenhados	23
Figura 10 - Tabela da quantificação do RNA da linhagem HCC-1954.....	24
Figura 11 - Amplificação do cDNA	25
Figura 12 - Padronização do gene GAPDH	26
Figura 13 - Expressão relativa de E-caderina	27
Figura 14 - Expressão relativa de vimentina	27
Figura 15 - Co-localização de E-caderina e HER2	28
Figura 16 - Gráfico de dispersão da co-localização entre E-caderina e HER2	29
Figura 17 - Co-localização de E-caderina e integrina $\beta 1$	29
Figura 18 - Gráfico de dispersão da co-localização de E-caderina e Integrina $\beta 1$	30

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	4
1 INTRODUÇÃO.....	7
1.1 Câncer de mama.....	7
1.2 Câncer de Mama do subtipo HER2+.....	9
1.3 Terapia Alvo com Trastuzumabe.....	9
1.4 Resistência ao tratamento com Trastuzumabe.....	11
1.5 Transição Epitelial-Mesenquimal.....	14
1.6 Desintegrina jararacina.....	15
2. METODOLOGIA.....	17
2.1 Cultura de células.....	17
2.2 Tratamento das células.....	18
2.3 Imunofluorescência.....	18
2.4 Extração de RNA.....	19
2.5 Desenho de primer.....	19
2.6 Síntese de DNA complementar.....	20
2.7 PCR convencional.....	20
2.8 Transcrição Reversa com Reação em cadeia Polimerase em tempo real (RT-qPCR)..	20
3. RESULTADOS.....	21
3.1 Morfologia celular.....	21
3.2 Análise das sequências dos primers desenhados.....	22
3.3 Extração de RNA e Síntese de cDNA.....	23
3.4 Padronização das reações de RT-qPCR.....	24
3.5 Avaliação da expressão dos genes, E-caderina e vimentina por RT-qPCR.....	26
3.6 Avaliação da co-localização por imunofluorescência.....	27
4. DISCUSSÃO.....	30
6 CONCLUSÃO.....	31
REFERÊNCIAS.....	32

EFEITO DO TRATAMENTO COMBINADO ENTRE TRASTUZUMABE E JARARACINA RECOMBINANTE SOBRE A EMT NO CÂNCER DE MAMA HER2+

Laura Abrahão Gonçalves¹

Denise de Abreu Pereira²

Ana Luiza Frango de Sant'Anna³

RESUMO

O câncer de mama é altamente heterogêneo, sendo classificado em diferentes subtipos moleculares. O subtipo HER2+, caracterizado pelo aumento da expressão desse receptor, representa 15-20% dos casos de câncer de mama. Esse subtipo é tratado com a terapia alvo Trastuzumabe, um anticorpo monoclonal humanizado. Cerca de 70% dos pacientes apresentam resistência à essa terapia. Já foi descrito na literatura que as integrinas participam da EMT, processo onde as células passam por uma mudança fenotípica, conferindo plasticidade às células, garantindo a progressão tumoral. Em trabalhos anteriores do nosso grupo, foi identificada uma alta expressão de integrinas αv e $\beta 1$ nas células HCC-1954, que são resistentes ao Trastuzumabe. Após o tratamento com Trastuzumabe, ocorre um aumento na expressão da integrina $\beta 1$. A integrina $\beta 1$ é capaz de ativar vias de sinalização celulares que podem se sobrepor ao efeito de inibição de HER2. Com o objetivo de avaliar os efeitos dos tratamentos sobre a EMT, as células HCC-1954 foram tratadas com Trastuzumabe, jararacina e o tratamento combinado entre Trastuzumabe e jararacina. Observamos por RT-qPCR, uma diminuição na expressão de E-caderina e aumento na expressão de vimentina nas células tratadas com jararacina e com o tratamento combinado. Já na imunofluorescência, notamos uma possível co-localização entre E-caderina e HER2 e E-caderina e integrina $\beta 1$ nas células HCC-1954 não tratadas. É provável que as células tratadas com jararacina tenham passado pelo processo de EMT. Pode existir um provável crosstalk entre os receptores HER2, E-caderina e integrina $\beta 1$ nas células não tratadas.

Palavras-chave: Câncer de mama. HER2+. Trastuzumabe. Desintegrina. Resistência.

¹ Graduando(a) do curso de Biomedicina na Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO.

² Instituto Nacional de Câncer (INCA).

³ Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

ABSTRACT

Keywords: Breast cancer. HER2+. Trastuzumab. Disintegrin. Resistance.

Breast cancer is highly heterogenic, comprising different molecular subtypes. The HER2+ subtype, characterized by the increased expression of this receptor, represents 15-20% of breast cancer. This subtype is treated with the target therapy Trastuzumab, a humanized monoclonal antibody. Over 70% of the patients present resistance to this therapy. It has been described in literature that integrins participate in EMT, a process in which the cells undergo phenotypic changes, providing cell plasticity, inducing the tumor progression. In previous studies of our group, it was identified a high expression of αv and $\beta 1$ integrins in HCC-1954 cells that are resistant to Trastuzumab. After treatment with Trastuzumab, there is an increase in the expression of $\beta 1$ integrin. The $\beta 1$ integrin can activate cell signaling pathways that can override the inhibition effect on HER2. With the aim of evaluating the effects of the treatments on EMT, HCC-1954 cells were treated with Trastuzumab, jararacin and the combined treatment of Trastuzumab and jararacin. We observed by RT-qPCR, a decreased expression of E-cadherin and an increased expression of vimentin in cells treated with jararacin and in the combined treatment. In immunofluorescence, however, we noted a possible co-localization between E-cadherin and HER2 and E-cadherin and $\beta 1$ integrin in HCC-1954 untreated cells. It is probable that the cells treated with jararacin underwent the EMT process. A probable crosstalk may exist between the HER2, E-cadherin and $\beta 1$ integrin receptors in untreated cells.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de mama

De acordo com os dados da GLOBOCAN, em 2022 o câncer de mama feminino foi o segundo tipo de câncer mais incidente no mundo, contendo 2,3 milhões de novos casos reportados, representando cerca de 11,6% de todos os casos de câncer. Entre a população feminina, é o tipo mais frequente e a principal causa de morte por câncer (*BRAY et al., 2024*).

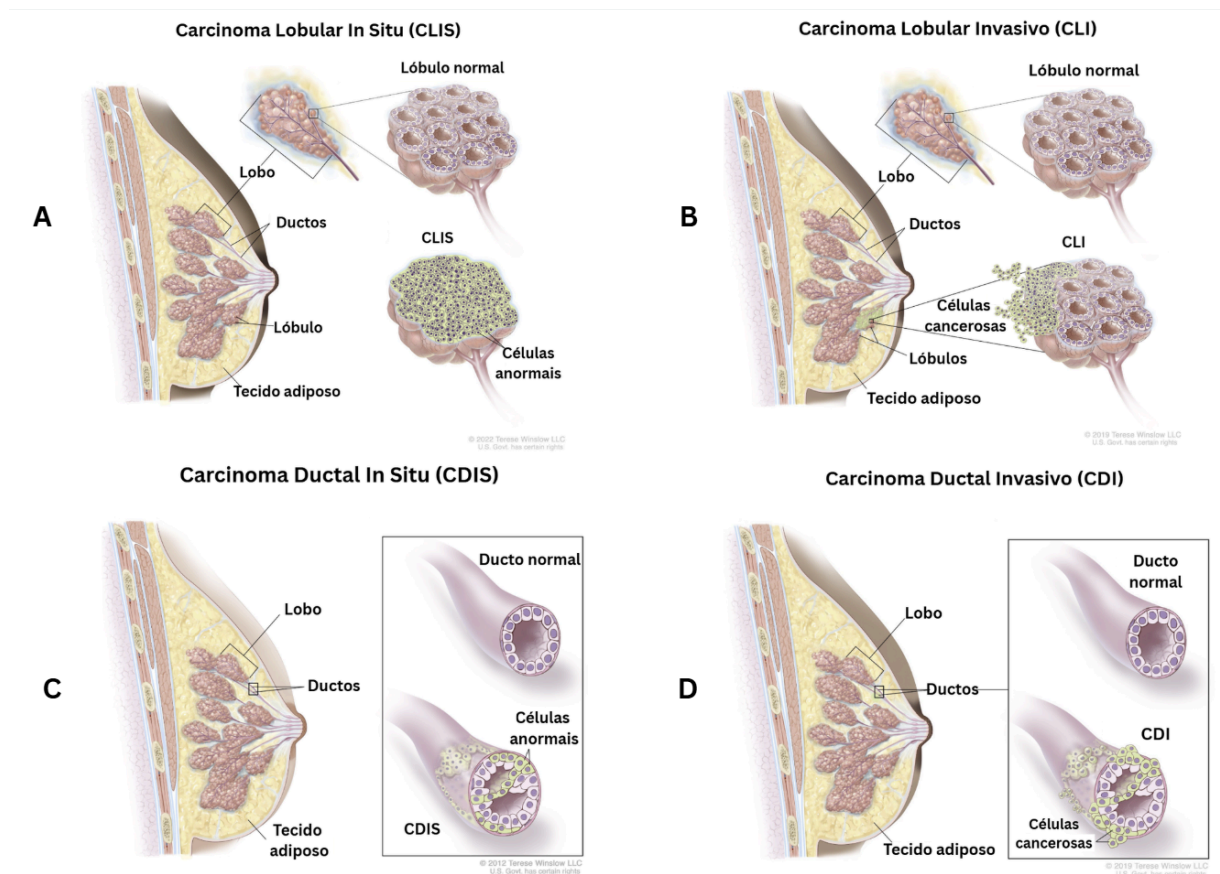
Devido à sua alta heterogeneidade, o câncer de mama é considerado um grupo de doenças (*INCA, 2024; TURNER et al., 2021*). A heterogeneidade ocorre tanto em cenários intertumoriais, em pacientes diferentes, quanto intratumoriais, em um mesmo tumor (*GUO et al., 2024*). A heterogeneidade do tumor é influenciada por diversos fatores, incluindo o microambiente tumoral, alterações genéticas, resistência aos tratamentos e a Transição Epitélio-Mesênquima (EMT) (*TURNER et al., 2021*).

Para a identificação do tipo de câncer, é necessário analisar as características morfológicas e moleculares do tumor. A análise morfológica classifica o tumor quanto ao grau de invasividade e o local de origem, permitindo sua classificação, entre outras, em carcinoma. Os carcinomas são o tipo mais comum de câncer, formados por células epiteliais e são classificados a partir das células acometidas. Os adenocarcinomas são formados em células epiteliais do tecido glandular. A maioria dos cânceres de mama são adenocarcinomas (*CARVALHO et al., 2025; NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2021*). O desenvolvimento do carcinoma mamário se inicia em estruturas como os ductos e os lóbulos e pode ser *in situ*, quando permanecem restritos ao tecido em que se originaram, ou podem extravasar para tecidos adjacentes, tornando-se invasivos (*CARVALHO et al., 2025; OBEAGU; OBEAGU, 2024*).

Por outro lado, a análise molecular distingue o câncer de mama pela expressão dos receptores de membrana, que servem como marcadores moleculares. São eles: receptores de estrogênio (RE), receptores de progesterona (RP) e receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2),

identificados pela imunohistoquímica. Além da verificação desses marcadores, a marcação do Ki67 permite a análise da proliferação celular (CARVALHO *et al.*, 2025). Essa análise permite a classificação em quatro principais subtipos: O subtipo Luminal A é caracterizado por RE+, RP+/-, HER2- e Ki67 baixo, enquanto o Luminal B é caracterizado por RE+, RP+/-, HER2+/- e Ki67 alto. O subtipo HER2+ é caracterizado pelo aumento na expressão desse receptor ou pela amplificação do gene ERBB2, que codifica esse receptor, não possuindo receptores hormonais e apresentando alta taxa mitótica. O subtipo basal, também chamado de triplo-negativo, ocorre quando nenhum desses receptores está sendo expresso. Nesses tumores estão expressos marcadores basais, como citoqueratinas (CK5/6) e/ou receptores do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e também apresenta alta taxa mitótica (ZHANG, 2023).

Figura 1 - Classificação morfológica do carcinoma mamário



(A) Carcinoma Lobular *in situ* (2022). (B) Carcinoma Lobular invasivo (2019). (C) Carcinoma Ductal *in situ* (2012). (D) Carcinoma Ductal invasivo (2019). Adaptado de National Cancer Institute (NCI), 2019; NCI, 2022; NCI, 2012.

1.2 Câncer de Mama do subtipo HER2+

A superexpressão do receptor HER2 está presente em, aproximadamente, 15% a 20% dos casos de câncer de mama (ZHAO *et al.*, 2025). Os receptores HER1/ErbB1 (EGFR), HER2/ErbB2, HER3/ErbB3 e HER4/ErbB4 constituem a família dos Receptores do Fator de Crescimento Epidermal (EGFR) (ARIENTI; PIGNATTA; TESEI, 2019). São receptores tirosina quinase, envolvidos em diversos processos fisiológicos e possuem três domínios: um domínio extracelular (N-terminal), um domínio transmembrana e um domínio intracelular (C-terminal) (PERRIER *et al.*, 2018).

Esses receptores podem adquirir duas conformações: inativa e ativa. Quando conectados a um ligante, esses receptores sofrem a dimerização através de mudanças estruturais (JURA *et al.*, 2009). Ao contrário dos outros integrantes dessa família, o HER2 não possui um ligante conhecido, formando heterodímeros com outros receptores, após os ligantes específicos a esses receptores se ligarem, e homodímeros com outros receptores HER2, sem a necessidade de um ligante (BAI *et al.*, 2023). A formação de dímeros leva à ativação do domínio intracelular tirosina quinase, iniciando algumas transduções de sinais, principalmente PI3K/Akt e Ras/MAPK, que, no cenário tumoral, estão envolvidas na migração, proliferação, invasão, escape à apoptose e angiogênese (LI *et al.*, 2025).

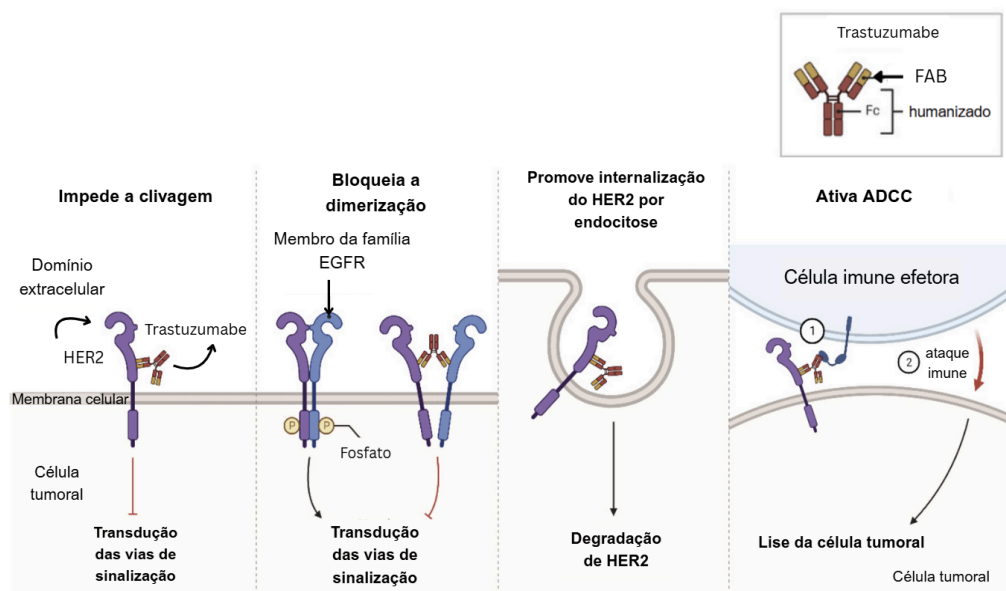
1.3 Terapia Alvo com Trastuzumabe

Hudziak *et al.* isolou, em 1989, o anticorpo monoclonal 4D5, de ratos que foram expostos ao receptor HER2 e notou a grande afinidade dele com este receptor. Em 1992, Carter *et al.* humanizou esse anticorpo, nomeando-o de Trastuzumabe. Mais tarde, em 1998, a FDA (em inglês *Food and Drug Administration*) autorizou o uso desse medicamento nos Estados Unidos (MAADI *et al.*, 2021). O Trastuzumabe possui múltiplas formas de atuação, impactando em diversos mecanismos, tanto celulares como do microambiente tumoral. A ligação da região FAB (em inglês, *Fragment Antigen-Binding*) do Trastuzumabe ao domínio IV da porção extracelular do receptor HER2 induz a internalização desse receptor para degradação intracelular, diminuindo o número de receptores na membrana celular. Promove o bloqueio da dimerização de HER2, impedindo a sinalização intracelular

de ocorrer. Previne a clivagem da porção extracelular, passo importante para ativação do receptor e inibe a angiogênese (Figura 2). Por outro lado, a região FC (em inglês, *Fragment Crystallizable*) modula a ADCC (em inglês, *Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*) mediando a ligação das células imunes com a célula tumoral e a subsequente liberação de moléculas citotóxicas (Figura 2) (RUEDAS *et al.*, 2024; MANDÓ *et al.*, 2021; BECCHETTI *et al.*, 2024). O Trastuzumabe também age induzindo a parada da fase G1 do ciclo celular, impedindo a proliferação das células (VIVEKANANDHAN; KNUTSON, 2022).

Aproximadamente 70% dos pacientes com câncer de mama do subtipo HER2+ que inicialmente apresentaram resposta ao Trastuzumabe progrediram dentro de um ano, mostrando resistência adquirida ao medicamento (DERAKHSHANI *et al.*, 2020). Diversos processos contribuem para a resistência ao Trastuzumabe, como mutações no receptor HER2, ativação de vias de sinalização alternativas, expressão de proteínas relacionadas à resistência, entre outros (VIVEKANANDHAN; KNUTSON, 2022).

Figura 2 - Mecanismos de ação do Trastuzumabe



Diferentes mecanismos de ação do Trastuzumabe. Adaptado de “4 Mechanisms of Action of Trastuzumab”, BioRender.com (2020), com base em Fang M. “Drug Treatments for HER2 Positive Breast Cancer” (2023).

1.4 Resistência ao tratamento com Trastuzumabe

A matriz extracelular (MEC) sofre alterações durante o desenvolvimento do câncer, tendo a sua composição e propriedades modificadas, o que contribui para o aumento da rigidez. Uma matriz extracelular mais rígida ativa respostas celulares através de sinalizações como Integrinas/FAK e YAP/TAZ, conferindo fenótipo maligno ao tumor. A rigidez da MEC é primordial para a formação de metástases e a indução da transição Epitélio-Mesênquima (EMT), uma vez que os tecidos tumorais que apresentam matriz rígida apresentam sinalizações celulares e expressão de moléculas alteradas que contribuem para a progressão tumoral (ZHANG; ZHANG, 2025).

As integrinas são moléculas de adesão transmembrana que ligam a MEC ao citoesqueleto celular, permitindo a transmissão de sinais entre a célula e a MEC (KARIYA; NISHITA, 2025). As integrinas são formadas por uma subunidade α e uma subunidade β , que, quando formam heterodímeros, podem assumir três conformações básicas: A) curvada-fechada, onde está inativa, B) esticada-fechada, onde possui baixa afinidade para os ligantes e C) esticada-aberta, onde apresenta alta afinidade aos ligantes. Esses estágios são modulados pela interação das integrinas com as moléculas da MEC, pela tensão mecânica entre o citoesqueleto de actina e a MEC e pelas interações de proteínas intracelulares com a cauda citoplasmática das integrinas (LI; YAN; SPRINGER, 2021).

A sinalização “*inside-out*” ocorre pelo recrutamento de diversas proteínas para a cauda citoplasmática da subunidade β , ativando a integrina pela indução da mudança de conformação, permitindo que ela se conecte ao citoesqueleto celular e aos ligantes da MEC. A ligação com as moléculas da MEC inicia a sinalização “*outside-in*”, enviando sinais para o meio intracelular. Essa sinalização bidirecional permite a modulação de diversos processos como migração, adesão, proliferação, diferenciação, sobrevivência, formação de células tronco e ativação de células inflamatórias (Figura 3) (KARIYA; NISHITA, 2025). O excesso de adesão celular mediada pelas integrinas pode promover instabilidade genômica. Estudos mostram que, além da rigidez da matriz, o aumento de integrinas $\beta 1$ nas adesões focais nas células epiteliais mamárias também promovem a EMT (HAAKE *et al.*, 2024). Por

isso, patologias como o câncer podem surgir a partir da desregulação de processos dependentes de integrinas (HAMIDI; IVASKA, 2018).

A integrina $\beta 1$ é a subunidade mais amplamente distribuída das integrinas β , formando dímeros com 12 das 18 subunidades α (SU *et al.*, 2024; PANG *et al.*, 2023). A interação de integrina $\beta 1$ com proteínas marcadoras de células tronco tumorais, proteínas associadas à resistência tumoral e proteínas condutoras associadas a mutações e metástases pode contribuir para a quimiorresistência, re-ocorrência e resultados adversos no câncer de mama (DAS *et al.*, 2023). Foi observado que a deleção de integrina $\beta 1$ nas células epiteliais mamárias leva a um atraso moderado na indução tumoral, e que, tumores com superexpressão de ErbB2 deficientes de integrinas $\beta 1$ apresentam potencial metastático significativamente comprometido (BUI *et al.*, 2015; HUCK *et al.*, 2010).

Figura 3 - Estrutura, conformação e sinalização das integrinas

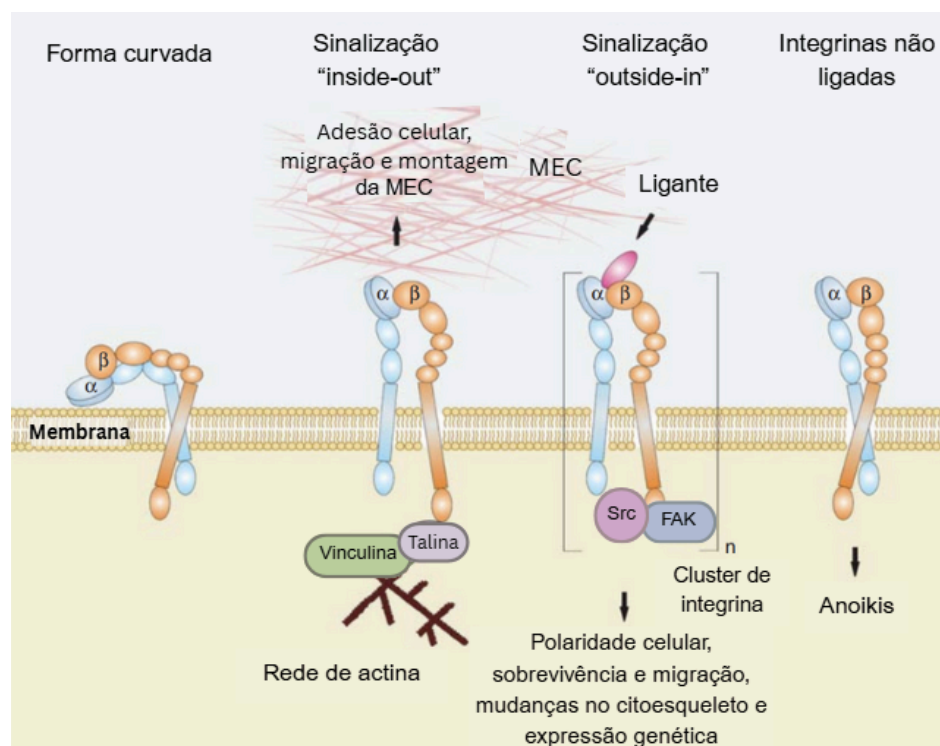


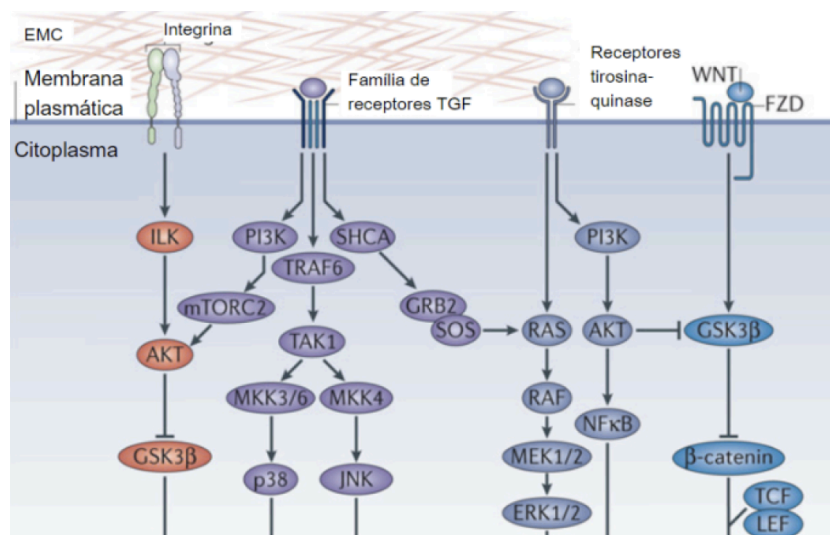
Imagem ilustrativa representando as conformações das integrinas e as sinalizações “inside-out” e “outside-in”. Adaptado de KAPP *et al.*, 2013.

O domínio RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) está presente em moléculas como a fibronectina, vitronectina, no TGF- β e osteopontina e se liga à algumas integrinas como a $\alpha v \beta 1$, $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$, $\alpha v \beta 6$, $\alpha v \beta 8$, $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha 8 \beta 1$, e $\alpha 11 \beta 3$ (KARIYA;

NISHITA, 2025). As integrinas se ligam seletivamente às diferentes moléculas da MEC que contém esse domínio e, com isso, reagem de maneira diferente dependendo da composição de proteínas da MEC do tecido tumoral (*KAPP et al., 2017*).

A linhagem de câncer de mama HCC-1954 foi isolada de um tumor ductal invasivo e apresenta a superexpressão do receptor HER2. Estudos anteriores feitos pelo nosso grupo mostram forte expressão de integrinas αv e $\beta 1$ na linhagem HCC-1954, que é resistente ao Trastuzumabe e observou-se que, após o tratamento com esse medicamento, ocorre aumento da expressão da integrina $\beta 1$, tornando a célula mais invasiva (*DE ABREU PEREIRA et al., 2022*). A sinalização cooperativa entre receptores ErbB e integrinas é comumente visualizada nos cânceres metastáticos. Embora existam evidências sobre o *crosstalk* entre as vias de HER2 e integrina $\beta 1$ (Figura 4), o mecanismo ainda não foi elucidado (*LESNIAK et al., 2009; TOSCANI et al., 2017*). Desse modo, ao inibir o receptor HER2 com Trastuzumabe nas células resistentes, é possível que a integrina $\beta 1$ possivelmente assuma a sinalização, promovendo sobrevivência e proliferação celular através da sinalização PI3K/AKT e ERK1/2 (*LESNIAK et al., 2009*).

Figura 4 - Sinalização cooperativa entre receptores tirosina-quinase e integrina



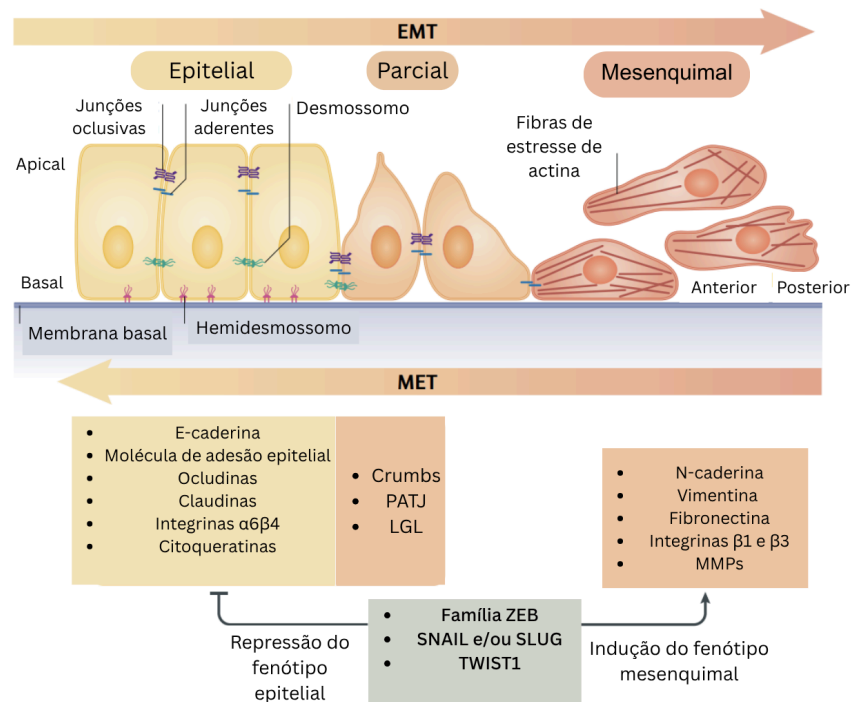
Demonstração da interação entre as vias de sinalização dos receptores tirosina-quinase, TGF e as integrinas. Adaptado de Lamouille *et al.*, 2014.

1.5 Transição Epitelial-Mesenquimal

A Transição Epitelial-Mesenquimal (EMT) é um processo de desdiferenciação que ocorre durante situações fisiológicas, como a embriogênese, cicatrização e regeneração tecidual (*HASHEMI et al., 2022; PALMA, 2019; YOUSSEF et al., 2024*). Essa transição confere fenótipo mesenquimal às células epiteliais através de modificações no citoesqueleto, na polaridade e na expressão de proteínas marcadoras, substituindo os marcadores epiteliais, E-caderina, ocludina e claudina, por marcadores mesenquimais, N-caderina, vimentina e fibronectina (*HASHEMI et al., 2022; PALMA, 2019*). A troca dessas proteínas pode ser total ou parcial, criando um estado híbrido, formando um espectro de transição dentro dessa mudança de fenótipos, fazendo com que a célula possa expressar tanto marcadores epiteliais quanto mesenquimais. Conforme o grau de transição dentro desse espectro, o comportamento celular muda, fazendo com que as células sejam capazes de migrar de forma individual ou conjunta, além de adquirirem plasticidade e resistência aos tratamentos (*YOUSSEF et al., 2024*).

Contudo, células tumorais podem vir a se beneficiar desse mecanismo, possibilitando a progressão da doença (*PALMA, 2019*), associada ao aparecimento das características clássicas do câncer, propostas por Hanahan e Weinberg, como, por exemplo, evasão da apoptose, proliferação celular, evasão do sistema imune, capacidade metastática e plasticidade (*HANAHAN, WEINBERG, 2000; HANAHAN, WEINBERG, 2011*).

Estudos mostram que as integrinas estão associadas aos *hallmarks* do câncer (*HAAKE et al., 2024*), induzindo a adesão e invasão celular através da EMT induzida pela sinalização de ILK (do inglês, *Integrin-linked kinase*). Este processo está associado à redução da expressão de E-caderina através da modulação por SNAIL/SLUG, além da indução da expressão de Metaloproteinase de Matriz 9 (MMP9) por AP1 (*LI et al., 2023*).

Figura 5 - Transição Epitélio-Mesênquima

Marcadores epiteliais e mesenquimais e moléculas necessárias para a indução da Transição Epitélio-mesênquima e o processo reverso, Transição Mesênquima-Epitelial. Adaptado de DONGRE; WEINBERG, 2019.

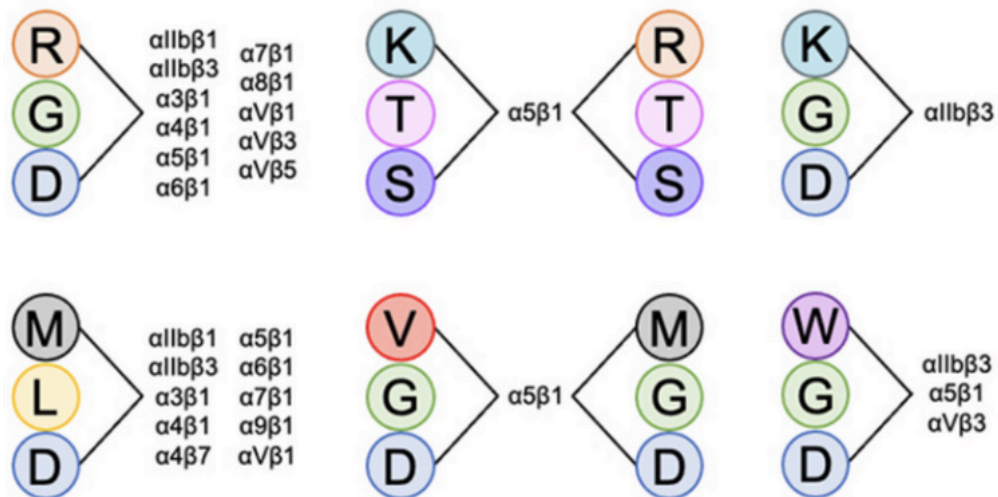
1.6 Desintegrina jararacina

As desintegrinas são polipeptídeos ricos em cisteína que derivam da clivagem das metaloproteínases do veneno da serpente Classe PII (SVMPs PII), sendo classificadas de acordo com o seu tamanho e número de pontes de dissulfeto (SS), podendo ser divididas em: desintegrinas curtas, médias, longas, diméricas e heterodiméricas. Elas apresentam domínios de reconhecimento para integrinas, como o RGD (Arg-Gly-Asp), que pode apresentar variações, conservando o aminoácido aspartato (D), como o KGD, WGD, VGD, MGD e MLD (RIVAS-MERCADO; GARZA-OCAÑAS, 2017; VASCONCELOS *et al.*, 2021).

A classificação funcional das desintegrinas se dá pela ligação do seu domínio de reconhecimento com o sítio de ligação de integrinas específicas, formando três grupos: RGD, MLD e R/KTS. O domínio RGD das desintegrinas é similar ao domínio RGD das moléculas endógenas com as quais as integrinas dependentes de RGD interagem (WALSH; MARCINKIEWICZ, 2011). O domínio

RGD é o maior e mais estudado dentre as desintegrinas e atuam inativando a ação de integrinas como $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha IIb\beta 3$ e $\alpha v\beta 5$, que são capazes de reconhecer o domínio RGD (ARRUDA-MACÊDO; FOX; DE SOUZA CASTRO, 2015).

Figura 6 - Domínios de ligação e as integrinas-alvo

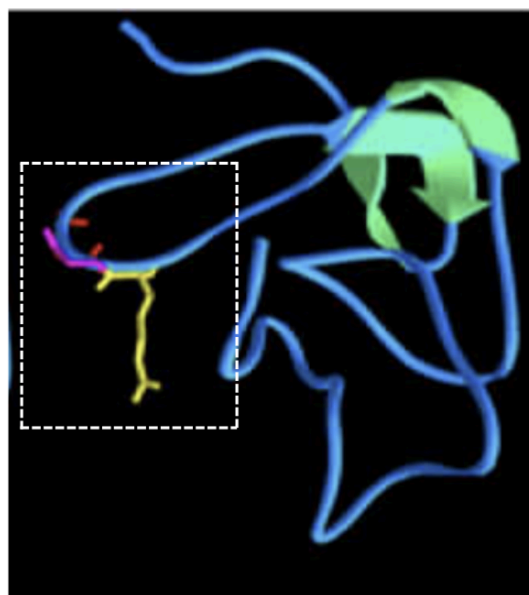


Os domínios estão presentes nas moléculas da matriz extracelular, são pequenas sequências de aminoácidos com as quais as integrinas são capazes de interagir. O reconhecimento desses domínios presentes nos ligantes pelas integrinas levam à ativação das cascatas de sinalização, induzindo a proliferação, modulando a polaridade, migração e a EMT. ALMEIDA *et al.*, 2023.

A jararacina é uma desintegrina isolada do veneno da *Bothrops jararaca* e contém o domínio RGD em sua estrutura, localizado no loop na região C-terminal. Esse loop é de extrema importância para a atividade biológica das desintegrinas (WERMELINGER, *et al.*, 2009).

A interrupção da ligação das integrinas com seus ligantes endógenos pode afetar a proliferação celular e até levar a célula à apoptose. Como as integrinas participam de processos proliferativos, migratórios e adesivos, o bloqueio desses receptores pelas desintegrinas pode vir a ser um potencial tratamento antitumoral (SHIH; CHIANG; WANG, 2013).

Figura 7 - Estrutura da jararacina



Em destaque, o domínio RGD localizado na região C-terminal, essencial para a atividade biológica da desintegrina. WERMELINGER *et al.*, 2009.

Por este motivo, decidimos avaliar o efeito do tratamento combinado entre Trastuzumabe e jararacina recombinante sobre a EMT nas de câncer de mama HER2+ HCC-1954, além de desenhar os *primers* de vimentina, integrina $\beta 1$, FAK e HER2, extrair o RNA e realizar a síntese de cDNA, padronizar as reações de RT-qPCR, avaliar a expressão de GAPDH, E-caderina e integrina $\beta 1$ por RT-qPCR e avaliar a co-localização de E-caderina, HER2 e integrina $\beta 1$ por imunofluorescência confocal.

2. METODOLOGIA

2.1 Cultura de células

A linhagem HER2+ resistente HCC-1954 foi adquirida do ATCC (ATCC®CRL-2338TM) e cultivada em meio RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e 100UI/mL de penicilina e 0,1mg/mL de estreptomicina. A troca do meio ocorreu a cada 2 dias, após lavagem com tampão fosfato-salino (PBS). As células foram mantidas na estufa a 37°C com 5% CO₂. As células foram tripsinizadas ao atingirem 80-90% de confluência.

2.2 Tratamento das células

As células HCC-1954 foram tratadas após atingirem 80% de confluência. Os grupos formados foram: um grupo tratado apenas com Trastuzumabe, outro grupo apenas com jararacina recombinante e um grupo com o tratamento combinado entre Trastuzumabe e jararacina recombinante, além de um grupo controle.

Para o tratamento com Trastuzumabe, as células foram lavadas com PBS, em seguida foi adicionado meio sem SFB, deixando-as em cultura por 24h. Após esse período, foi adicionado 20µg/mL de Trastuzumabe em meio de cultura com 10% de SFB e o meio foi colocado nas garrafas. As células, então, foram incubadas na estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 72h. O grupo controle foi incubado nas mesmas condições, com meio com 10% de SFB, sem tratamento.

O tratamento com a jararacina recombinante foi feito com 1µM de jararacina no meio com 10% de SFB, incubando as células por 24h na estufa a 37 °C com 5% de CO₂.

O tratamento combinado foi realizado com Trastuzumabe 20µg/mL e 1µM de jararacina. Primeiramente as células foram tratadas com Trastuzumabe. Após as 72h, as células foram lavadas com PBS e foi adicionado 1µM de jararacina no meio com 10% de SFB, incubando as células por 24h na estufa a 37 °C com 5% de CO₂.

O Trastuzumabe foi obtido na farmácia do Hospital do Câncer 3 (HC3), no setor de quimioterapia, onde foi manipulado para uso.

A jararacina recombinante foi obtida através da colaboração com a Profa. Russolina Zingali, Chefe do Laboratório de Hemostase e Venenos da UFRJ.

2.3 Imunofluorescência

As células foram cultivadas em lamínulas colocadas em uma placa de 24 poços. As lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS e fixadas com paraformaldeído a 4% em temperatura ambiente por 15 minutos. Após a fixação, as células foram lavadas 4 vezes com PBS e bloqueadas com BSA a 5% em PBS por 1 hora, sendo mantidas na câmara úmida em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados os anticorpos primários policlonais, diluídos 1:100 em PBS, *rabbit* anti

ErbB2 (ab2428, Abcam, Cambridge, UK), monoclonal *rabbit* anti-integrina $\beta 1$ (ab52971, Abcam, Cambridge, UK), monoclonal *mouse* anti-E-caderina (610182, BD, New Jersey, USA) e as células foram incubadas em câmara úmida a 4°C *overnight*. As células foram então lavadas 2 vezes com PBS e incubadas por 1 hora em câmara úmida e temperatura ambiente com os anticorpos secundários Alexa Fluor 546 *goat anti-rabbit* e Alexa Fluor 488 *goat anti-mouse*, diluídos 1:2000 em PBS. Para o controle do IgG da imunofluorescência, foram utilizados apenas os anticorpos secundários. Após o período de incubação, as células foram incubadas com DAPI (Invitrogen, P36931, Waltham, MA, USA), diluído 1:1000 em PBS. Em seguida, foram feitas 5 lavagens com PBS, por 5 minutos cada. Por último, as lamínulas foram distribuídas em lâminas de microscópio com 3µL de ProLong Glass Antifade (Invitrogen, P36982). As imagens foram capturadas no aumento de 63x utilizando o Leica Las X Software.

2.4 Extração de RNA

Foram utilizadas 2×10^6 células da linhagem HCC-1954, cultivadas em garrafas pequenas. A extração do RNA seguiu as instruções do fabricante TRIzol Reagent (ThermoFischer, 15596026). Foi adicionado às amostras 200µL de clorofórmio, elas foram incubadas por 2-3 min centrifugadas a 12000g por 15 min a 4°C. A fase aquosa foi separada em um novo recipiente e foi adicionado 500µL de isopropanol. As amostras foram incubadas por 10 min e centrifugadas a 12000g por 10 min a 4°C. O descarte do sobrenadante foi realizado com uma pipeta e o *pellet* foi ressuspensionado com 1mL de etanol 75%. Após breve homogeneização com o vórtex, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 7500g a 4°C. O sobrenadante foi descartado com uma pipeta e o *pellet* secou ao ar livre por 5-10 min. Em seguida foi adicionado 20-50µL de água RNase free para nova ressuspensão do *pellet*.

2.5 Desenho de *primer*

Os *primers* do HER2, integrina $\beta 1$, vimentina e FAK foram desenhados com o auxílio dos programas GeneCards, para encontrar o nome do gene, Ensembl, para encontrar a sequência do RNA e *PCR in silico*, PrimerBlast, PrimerPlus e OligoCalc para a confirmação dos parâmetros dos *primers*.

2.6 Síntese de DNA complementar

A síntese do DNA complementar (cDNA) seguiu as recomendações de uso do kit de transcrição reversa SuperScript II Invitrogen. Com a extração das células HCC-1954, foram coletadas as amostras de RNA total. A síntese de cDNA foi realizada em um termociclador programado para 50 minutos a 42°C e 15 minutos a 70°C. A qualidade do produto final foi avaliada por eletroforese em gel de agarose.

2.7 PCR convencional

Os ciclos de PCR foram programados em 40 ciclos de 94°C por 10 minutos, 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e 72°C por 10 minutos. Foi utilizado 6,85uL de H₂O, 1uL de tampão, 0,15uL de *primer* forward, 0,15uL de *primer* reverse, 0,2uL de dNTPs, 0,6uL de MgCl, 1uL de cDNA e 0,05uL de Taq polimerase. As reações de controle negativo foram realizadas sem os cDNAs sintetizados. As reações foram feitas em duplicatas. Os pares de *primers* escolhidos para E-caderina foram (5'-TGG CGT CTG TAG GAA GGC A-3' e 5'-GGC TCT TTG ACC ACC GCT CT-3'), para vimentina foram (5'-GGA CCA GCT AAC CAA CGA CA-3' e 5'-TCC TCC TGC AAT TTC TCC CG-3') e para GAPDH (5'-ATG TTC GTC ATG GGT GTG AA-3' e 5'-TGT GGT CAT GAG TCC TTC CA-3').

2.8 Transcrição Reversa com Reação em cadeia Polimerase em tempo real (RT-qPCR)

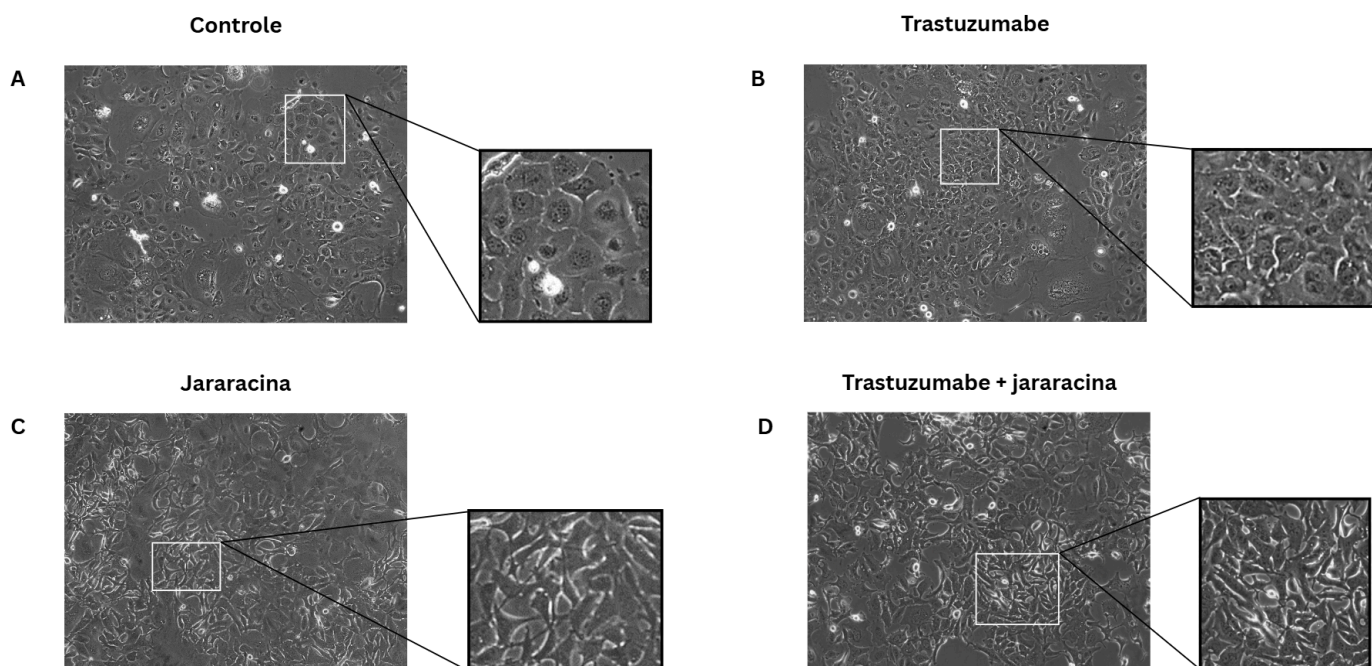
Para quantificar as amostras, foi utilizado o kit SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix da BioRad para qPCR. O termociclador utilizado foi o QIAGEN Rotor-Gene. A amplificação consistiu na ativação da polimerase a 95°C por 30 segundos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento e extensão a 60° por 30 segundos. A curva de *melting* foi performada conforme a recomendação do fabricante a fim confirmar a especificidade da amplificação das amostras.

3. RESULTADOS

3.1 Morfologia celular

As células HCC-1954 foram cultivadas e tratadas com Trastuzumabe, jararacina e o tratamento combinado entre Trastuzumabe e jararacina. Após os tratamentos, a morfologia celular foi analisada em campo claro no microscópio ZEISS AX-10. Não foram observadas mudanças significativas na morfologia das células tratadas apenas com Trastuzumabe em relação às células controle (Figura 8). Por outro lado, as células tratadas com jararacina e as tratadas com o tratamento combinado entre Trastuzumabe e jararacina apresentaram morfologia alongada e com maior número de protusões (Figura 8).

Figura 8 - Morfologia celular após os tratamentos



Morfologia celular após os tratamentos. Imagens de microscopia de campo claro das células (A) sem tratamento, (B) tratadas com Trastuzumabe, (C) tratadas com jararacina e (D) tratadas com a combinação de Trastuzumabe e jararacina.

3.2 Análise das sequências dos *primers* desenhados

Foram desenhados os *primers* para vimentina (VIM), integrina $\beta 1$, HER2 e FAK com o intuito de avaliar o processo de EMT e as vias de sinalização que podem estar ativadas após os tratamentos.

A tabela 1 mostra as sequências dos *primers* obtidos. Foram avaliados os seguintes parâmetros para a escolha dos *primers*: tamanho, CG%, temperatura de *melting*, hairpin, auto-anelamento e tamanho do produto. Os *primers* devem conter entre 18 a 24 nucleotídeos, a fim de otimizar a temperatura de anelamento. (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2016).

O conteúdo de CG (Citosina e Guanina) não deve ultrapassar 50%, visto que maiores concentrações de CG aumentam a temperatura de *melting* (THORNTON; BASU, 2011). Na tabela, é possível observar que em todos os *primers*, o conteúdo CG ficou entre 41,7% a 55%.

A temperatura de *melting* dos *primers* variou de 53.9°C a 60°C. A temperatura de *melting* do *primer* indica o momento em que 50% do duplex *primer-template* estão pareados. Os parâmetros avaliados são: a temperatura mínima de 60°C, máxima de 67°C e ótimas entre 62°C a 64°C. A diferença de temperatura entre os pares de *primers* não deve exceder 1-2°C (THORNTON; BASU, 2011).

Nenhum dos *primers* desenhados apresentou formação de estruturas secundárias como o *hairpin* e o auto-anelamento. É necessário evitar desenhar *primers* que sejam auto-complementares e/ou complementares uns aos outros, visto que essas interações podem formar estruturas como *hairpins* e auto-dímeros, que atrapalham a eficiência da qPCR, visto que o SYBR® Green se liga com estruturas que contenham dupla fita (THORNTON; BASU, 2011).

Além disso, o tamanho do produto a ser amplificado (amplicon) não deve exceder 150 pares de base, visto que isso implicaria em perda de eficiência na amplificação (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2016).

Portanto, é possível observar que todos os pares de *primers* desenhados estão de acordo com os parâmetros estabelecidos para eficácia das reações de qPCR.

Tabela 1- Tabela de informações dos *primers* desenhados.

<i>Primer</i>	Sequências	Tamanho	CG%	Tempe- ratura de melting	<i>Hairpin</i>	Auto- anelamento	Tamanho do produto formado
VIM F	5'-GGA CCA GCT AAC CAA CGA CA-3'	20	55%	60°C	Não	Não	93
VIM R	5'-TCC TCC TGC AAT TTC TCC CG-3'	20	52%	60°C	Não	Não	
ITGB1 F	5'-GAT CAG TTC AGT TTG CTG TGT GTT-3'	24	41.7%	56°C	Não	Não	104
ITGB1 R	5'-CAC AAT TTG GCC CTG CTT-3'	18	50%	53.9°C	Não	Não	
ErbB2 F	5'-CTT CCA CAA GAA CAA CCA GCT G-3'	22	50%	56.4°C	Não	Não	119
ErbB R	5'-AAT CCT CAG AAC TCT CTC CCC A -3'	22	50%	57.1°C	Não	Não	
PTK2 F	5'-TAC AAC GAG GGT GTC AAG CC-3'	20	55%	57.2°C	Não	Não	108
PTK2 R	5'-GCC CGT CAC ATT CTC GTA CA-3'	20	55%	57.2°C	Não	Não	

Avaliação dos parâmetros necessários para o funcionamento adequado dos *primers*.

3.3 Extração de RNA e Síntese de cDNA

O RNA das células HCC-1954 não tratadas (NT), tratada apenas com Trastuzumabe (T), tratadas apenas com jararacina (JC) e tratadas com o tratamento combinado entre Trastuzumabe e jararacina (T+JC) foi extraído através do protocolo do reagente TRIzol e quantificado no NanoDrop através da medida da razão de absorbância em 260 e 280 nm. A tabela 2 mostra o resultado obtido, todas as razões de absorbância variaram de 1,65 a 1,78 nm. O valor ideal de pureza para ácidos nucleicos varia de 1,8 a 2,0. Valores menores que 1,8 indicam contaminação com

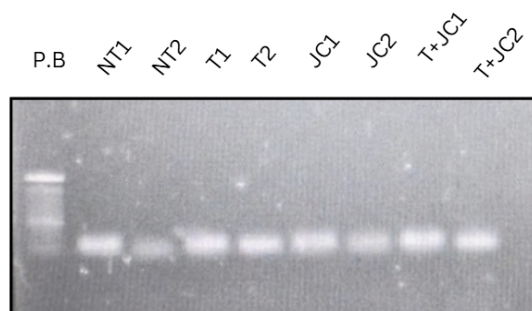
proteínas (*THERMO FISHER SCIENTIFIC*, 2016). Embora os valores de nossas amostras tenham ficado levemente abaixo do nível ideal, todas as amostras apresentaram resultados satisfatórios para a síntese de cDNA (Tabela 2). A qualidade dos cDNAs amplificados pelos *primers* da vimentina foram avaliadas na reação de RT-PCR convencional. Pode-se observar que todas as amostras foram amplificadas.

Tabela 2- Tabela da quantificação do RNA da linhagem HCC-1954.

Grupo	Pureza	Concentração
HCC-1954 (NT)	A260/280= 1,78	760,6 ng/uL
HCC-1954 (T)	A260/280= 1,66	876,5 ng/uL
HCC-1954 (JC)	A260/280= 1,71	533,6 ng/uL
HCC-1954 (T+JC)	A260/280= 1,65	605,7 ng/uL

Avaliação da concentração e da pureza das amostras não tratadas (NT), tratadas com Trastuzumabe (T), tratadas com jararacina(JC) e tratadas com o tratamento combinado entre Trastuzumabe e jararacina (T+JC).

Figura 11- Amplificação do cDNA



Confirmação da amplificação do cDNA das células HCC-1954 com o *primer* da vimentina, em duplicatas. Gel de agarose a 2%. Todas as amostras (93 pares de base (P.B.)) foram amplificadas.

3.4 Padronização das reações de RT-qPCR

A curva padrão (Figura 12A) foi construída a partir de diluições seriadas do cDNA sintetizado. Ela permite a quantificação das amostras, além de determinar a

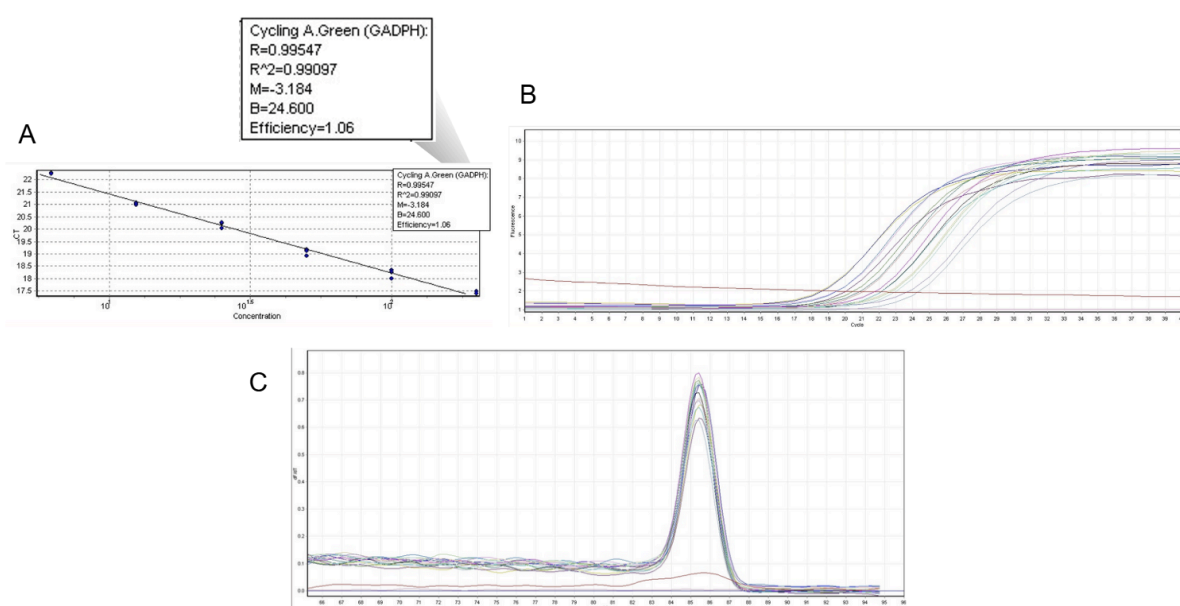
eficiência da reação através da medida da inclinação da reta (*THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2016*).

A curva de amplificação (Figura 12B) possui duas fases, uma exponencial, onde a quantidade de produtos amplificados dobra a cada ciclo, e uma fase platô, onde a quantidade de componentes torna-se limitada para a reação. A linha na base do gráfico, o *threshold* (limiar) é utilizada para determinar o ciclo em que a fluorescência começa a ser detectada, ou seja, o Ct (*BIORAD, 2006*).

A curva de *melting* (Figura 12C), confere a especificidade das reações de qPCR, verificando a formação de dímeros de *primers*. Esta curva é obtida através da análise da razão $(-\Delta F/\Delta T)$ que mede a variação da fluorescência em função da variação de temperatura. A especificidade da reação é confirmada quando apenas um pico é observado. Nossos resultados mostram que não houve reações inespecíficas uma vez que somente um pico foi observado (*THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2016*).

Todas as curvas foram feitas para os genes E-caderina e vimentina e os resultados obtidos foram satisfatórios.

Figura 12 - Padronização do gene GAPDH



(A) Curva padrão (B) Curva de amplificação (C) Curva de melting.

3.5 Avaliação da expressão dos genes, E-caderina e vimentina por RT-qPCR

Foram avaliadas as expressões do marcador epitelial E-caderina e do marcador mesenquimal vimentina nas células HCC-1954 tratadas com Trastuzumabe e jararacina com o intuito de avaliar a EMT, através de reações simples de qPCR.

A figura 13 mostra o gráfico da expressão relativa da E-caderina. É possível observar que não houve diferença de expressão relativa entre os grupos controle (C) e tratado apenas com Trastuzumabe (T). Já nos grupos tratados com jararacina (JC) e com o tratamento combinado (T+JC), foi observado uma diminuição da expressão em relação aos grupos C e T (Figura 13).

Figura 13- Expressão relativa de E-caderina

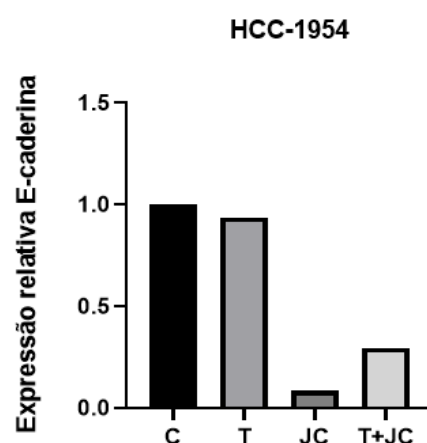


Gráfico da quantificação relativa de E-caderina nas células controle (C), tratadas com Trastuzumabe (T), tratadas com jararacina (JC) e tratadas com o tratamento combinado (T+JC) (n=1).

Por outro lado, a análise da expressão relativa de vimentina mostrou que os grupos controle (C) e tratado com Trastuzumabe (T) apresentaram baixa expressão deste gene, enquanto os grupos tratado com jararacina (JC) e tratamento combinado (T+JC) apresentaram maior expressão relativa de vimentina (Figura 14).

Figura 14- Expressão relativa de vimentina

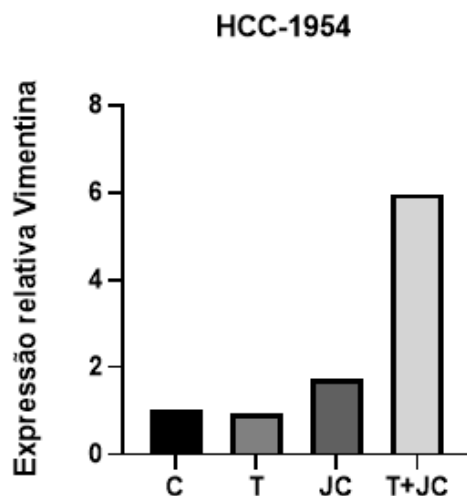


Gráfico da quantificação relativa de vimentina nas células controle (C), tratadas com Trastuzumabe (T), tratadas com jararacina (JC) e tratada com o tratamento combinado (T+JC) (n=1).

3.6 Avaliação da co-localização por imunofluorescência

Nas células HCC-1954 não tratadas, a análise da imunofluorescência por microscopia confocal indicou co-localização dos receptores E-caderina e HER2 (Figura 15) e co-localização dos receptores E-caderina e integrina $\beta 1$ (Figura 17). Os gráficos de dispersão (Figuras 16 e 18) permitem a avaliação do grau de co-localização. O eixo X representa o canal AF594-T1 (fluoróforo vermelho), marcador de HER2 e integrina $\beta 1$ e o eixo Y representa o canal AF488-T2 (fluoróforo verde), marcador da E-caderina. Os pontos se distribuem de acordo com a presença ou ausência da co-localização, se distribuindo pelas laterais quando há baixa ou nenhuma co-localização e formando uma reta a 45° quando há co-localização.

O Coeficiente de Correlação de Pearson (PCC) quantifica o gráfico de dispersão, gerando um dado estatístico. Esse método mede a covariância dos níveis de fluorescência em cada píxel da imagem, subtraindo a intensidade média do valor da intensidade de cada píxel. PCC igual a 1 demonstra intensidade de fluorescência perfeitamente linear relacionadas. Embora seja padrão que alguns *softwares* quantifiquem o PCC para a imagem completa, ele também pode ser medido a partir do desenho de uma região de interesse. Já o Coeficiente de Sobreposição de Manders (MOC) avalia a co-ocorrência dos píxels, medindo a fração de píxels positivos em ambos os canais. O valor do MOC varia de 1 a 0, onde 1 indica forte

sobreposição. O valor atinge 0 quando os sinais são completamente mutuamente exclusivos, ou seja, quando há completa ausência de pixels positivos nos canais analisados (DUNN; KAMOCKA; MCDONALD, 2011).

Para a co-localização de E-caderina e HER2, o Coeficiente de Correlação de Pearson é 0.81639 e o Coeficiente de Sobreposição de Manders é 0.9023 (Figura 16). Por outro lado, a co-localização de E-caderina e integrina $\beta 1$ mostrou que o Coeficiente de correlação de Pearson é 0.24988 enquanto o Coeficiente de Sobreposição de Manders é 0.80391 (Figura 18).

Figura 15 - Co-localização de E-caderina e HER2

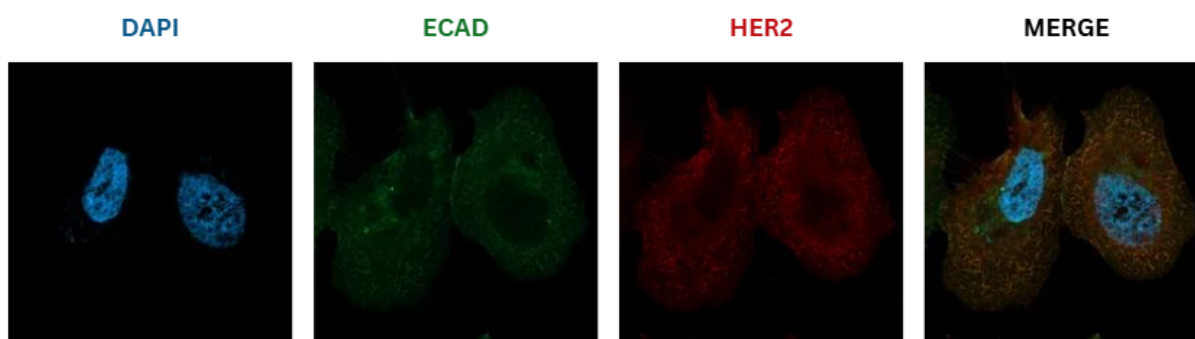


Imagem de microscopia confocal no aumento de 63x da célula HCC-1954 não tratada. Foram utilizados o marcador fluorescente DAPI para a marcação do núcleo (em azul), o anticorpo (610182, BD) para a marcação de E-caderina (em verde) e o anticorpo (ab2428, Abcam) para a marcação do HER2 (em vermelho).

Figura 16- Gráfico de dispersão da co-localização entre E-caderina e HER2

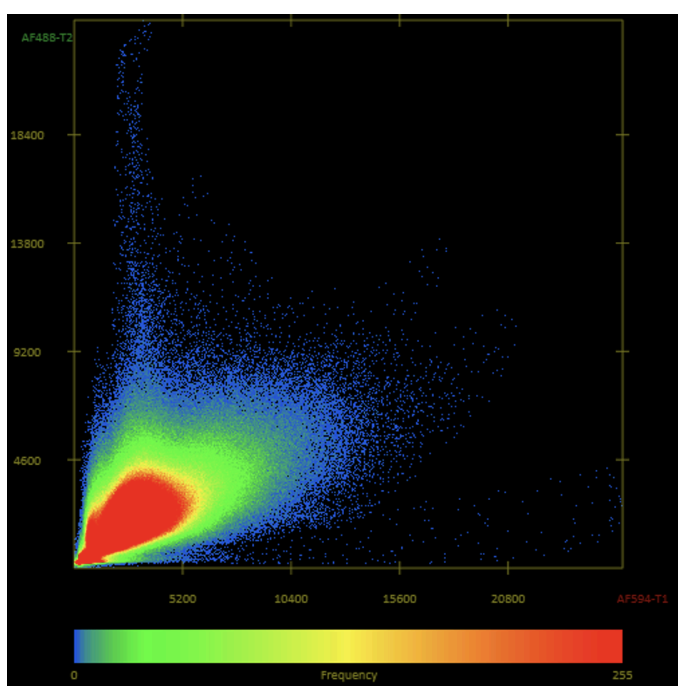


Gráfico de dispersão da co-localização entre HER2 (Eixo X - AF594-T1) e E-caderina (Eixo Y - AF888-T2). Coeficiente de correlação Pearson = 0.81639 (=1 - correlação positiva perfeita.)
Coeficiente de sobreposição de Manders = 0.9023 (=1 - sobreposição).

Figura 17- Co-localização de E-caderina e integrina $\beta 1$

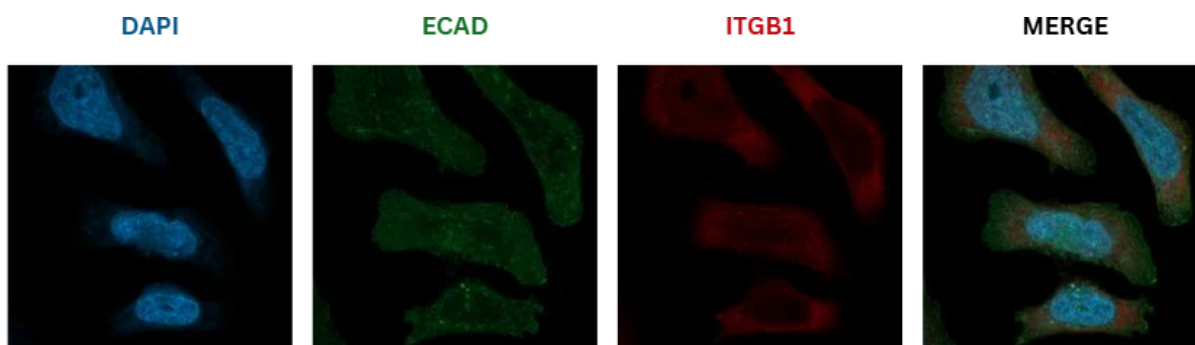


Imagem de microscopia confocal no aumento de 63x da célula HCC-1954 não tratada. Foram utilizados o marcador fluorescente DAPI para a marcação do núcleo (em azul), o anticorpo (610182, BD) para a marcação de E-caderina (em verde) e o anticorpo (ab52971, Abcam) para a marcação da integrina $\beta 1$ (em vermelho).

Figura 18 - Gráfico de dispersão da co-localização entre E-caderina e Integrina $\beta 1$

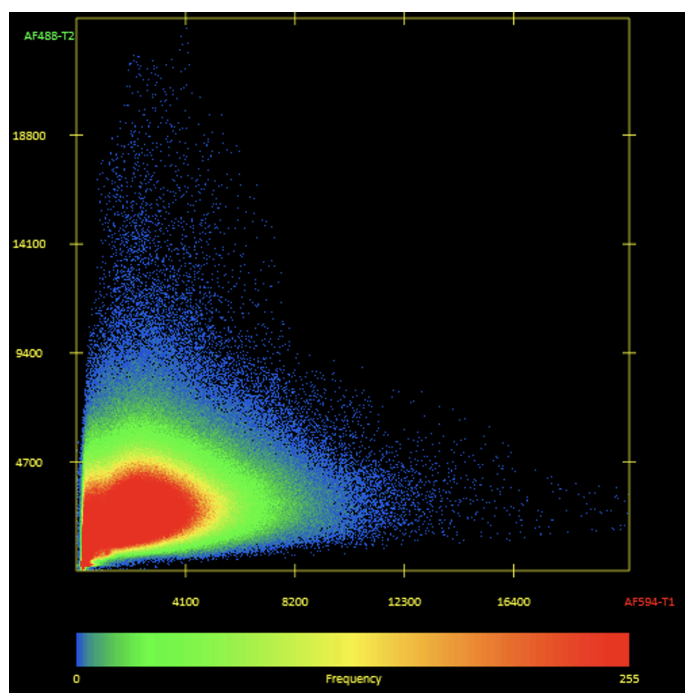


Gráfico de dispersão da co-localização entre integrina $\beta 1$ (Eixo X - AF594-T1) e E-caderina (Eixo Y - AF488-T2). Coeficiente de correlação de Pearson = 0.24988 (=1 - correlação positiva perfeita.)
Coeficiente de sobreposição de Manders = 0.80391 (=1 - sobreposição).

4. DISCUSSÃO

A Transição Epitélio-Mesênquima é um processo de desdiferenciação celular, caracterizado pela perda de marcadores epiteliais, como E-caderina, ocludina e claudina e ganho de marcadores mesenquimais, como N-caderina e vimentina, conferindo potencial metastático, plasticidade e resistência a tratamentos (HASHEMI *et al.*, 2022; YOUSSEF *et al.*, 2024).

Na RT-qPCR das células HCC-1954 foi possível observar uma diminuição da expressão de E-caderina e um aumento na expressão de vimentina nas condições tratadas com jararacina e tratadas com o tratamento combinado. Estes resultados sugerem uma mudança de fenótipo epitelial para mesenquimal após o tratamento das células. Tal mudança fenotípica pode ter sido desencadeada pelo processo de EMT, a fim de garantir maior plasticidade e sobrevivência celular. Esses resultados parciais precisam ser confirmados através da análise de outros marcadores da EMT, o que será feito com a continuidade deste trabalho.

Um estudo feito por Burnett *et al.* indicou que as células BT-474, linhagem HER2+, quando passavam por um *knockdown* de PTEN-, e eram tratadas a longo prazo com Trastuzumabe, apresentavam resistência ao tratamento (LTT) e sofriam EMT, visualizada pelo aumento de 16x do marcador N-caderina e de 266 vezes do marcador vimentina. Além disso, enquanto a linhagem original BT-474 apresentava os marcadores epiteliais E-caderina e EpCAM, a linhagem BT-474 HER2+ PTEN-LTT não apresentou esses marcadores, além de apresentar morfologia mais alongada (BURNETT *et al.*, 2015). Nosso grupo mostrou que as células HCC-1954, resistentes ao Trastuzumabe, possuem naturalmente alta expressão de integrinas αv e $\beta 1$ e que, após o tratamento, a expressão de integrina $\beta 1$ aumenta (DE ABREU PEREIRA *et al.*, 2022). BUI *et al.* demonstrou, através da ablação dos genes da integrina $\beta 1$ e $\beta 3$, que o crescimento tumoral e potencial metastático do tumor HER2+ foram comprometidos (BUI *et al.*, 2019).

A imunofluorescência das células HCC-1954 não tratadas sugere que há a co-localização entre E-caderina e HER2 e entre E-caderina e integrina $\beta 1$. Mais análises sobre esta co-localização serão feitas com a continuidade do trabalho. A quantificação da co-localização de E-caderina e HER2 pelo coeficiente de correlação de Pearson totalizou 0.81639, enquanto o coeficiente de sobreposição de Manders totalizou 0.9023. Considerando que, para ambos os coeficientes, o valor 1 significa

co-localização (DUNN; KAMOCKA; MCDONALD, 2011), esse resultado sugere uma forte co-localização destes receptores. O coeficiente de Pearson para a co-localização de E-caderina e integrina $\beta 1$ totalizou 0.24988, enquanto o coeficiente de Manders totalizou 0.80391. Embora o coeficiente de Pearson tenha ficado distante de 1, o coeficiente de Manders sugere sobreposição de fluorescência entre esses dois receptores.

Toscani *et al.*, mostrou que a co-localização de HER2 e integrina $\beta 1$ depende dos níveis de expressão desses dois receptores, ocorrendo mais facilmente em células aderentes com alta quantidade de HER2 e integrina $\beta 1$, como é o caso da célula no nosso estudo, HCC-1954. O autor ressalta que, embora haja co-localização, a interação entre esses receptores permanece incerta (TOSCANI *et al.*, 2017).

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram a importância do estudo da modulação da atividade de integrina $\beta 1$ e do receptor HER2, para a expressão dos marcadores da Transição Epitélio-Mesênquima (EMT), que podem explicar o cenário de resistência a determinadas terapias, como o Trastuzumabe, uma vez que processos como a EMT contribuem não só para a heterogeneidade como também para a progressão tumoral e a resistência à terapias.

REFERÊNCIAS

1. ALMEIDA, G. DE O. *et al.* **Snake venom disintegrins update: insights about new findings.** The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases, v. 29, 2023.
2. ARIENTI, C.; PIGNATTA, S.; TESEI, A. **Epidermal growth factor receptor family and its role in gastric cancer.** Frontiers in oncology, v. 9, p. 1308, 2019.
3. ARRUDA MACÊDO, J. K.; FOX, J. W.; DE SOUZA CASTRO, M. **Disintegrins from snake venoms and their applications in cancer research and therapy.** Current protein & peptide science, v. 16, n. 6, p. 532–548, 2015.
4. BAI, X. *et al.* **Structure and dynamics of the EGFR/HER2 heterodimer.** Cell discovery, v. 9, n. 1, p. 18, 2023.
5. BECCHETTI, A. G. *et al.* **History of trastuzumab: a case study in health technology reassessment and natural disinvestment in Veneto Region.** Frontiers in pharmacology, v. 15, p. 1406351, 2024.
6. BIORAD. **Applications Guide Real-Time PCR Applications Guide.** [s.l.: s.n.]. Acesso em: 2 nov. 2025.
7. BRAY, F. *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, v. 74, n. 3, p. 229–263, 2024.
8. BUI, T. *et al.* **Functional redundancy between $\beta 1$ and $\beta 3$ integrin in activating the IR/Akt/mTORC1 signaling axis to promote ErbB2-driven breast cancer.** Cell reports, v. 29, n. 3, p. 589- 602.e6, 2019.
9. BURNETT, J. *et al.* **Trastuzumab resistance induces EMT to transform HER2+ PTEN– to a triple negative breast cancer that requires unique treatment options.** Scientific Reports, v. 5, n. 1, 2 nov. 2015.
10. CARVALHO, E. *et al.* **Molecular subtypes and mechanisms of breast cancer: Precision medicine approaches for targeted therapies.** Cancers, v. 17, n. 7, p. 1102, 2025.
11. CRUZ DA SILVA, E. *et al.* **Role of integrins in resistance to therapies targeting growth factor receptors in cancer.** Cancers, v. 11, n. 5, p. 692, 2019.

12. DAS, S. *et al.* **A novel computational predictive biological approach distinguishes Integrin $\beta 1$ as a salient biomarker for breast cancer chemoresistance.** *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, v. 1869, n. 6, p. 166702, 2023.
13. DE ABREU PEREIRA, D. *et al.* **Proteomic analysis of HCC-1954 and MCF-7 cell lines highlights crosstalk between αv and $\beta 1$ integrins, E-cadherin and HER-2.** *International journal of molecular sciences*, v. 23, n. 17, p. 10194, 2022.
14. DERA KHSHANI, A. *et al.* **Overcoming trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancer using combination therapy.** *Journal of cellular physiology*, v. 235, n. 4, p. 3142–3156, 2020.
15. DONGRE, A., WEINBERG, R.A. **New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 69–84 (2019).
16. DUNN, K. W.; KAMOCKA, M. M.; MCDONALD, J. H. **A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy.** *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, v. 300, n. 4, p. C723–C742, abr. 2011.
17. FANG, M. **Drug Treatments for HER2 Positive Breast Cancer.** *Critical Debates in Humanities, Science and Global Justice*, v. 1, n. 1, 7 nov. 2023.
18. GUO, L. *et al.* **Correction: Breast cancer heterogeneity and its implication in personalized precision therapy.** *Experimental hematology & oncology*, v. 13, n. 1, p. 7, 2024.
19. HAAKE, S. M. *et al.* **Integrating integrins with the hallmarks of cancer.** *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology*, v. 130, p. 20–35, 2024.
20. HAMIDI, H.; IVASKA, J. **Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis.** *Nature reviews. Cancer*, v. 18, n. 9, p. 533–548, 2018.
21. HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.
22. HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **The hallmarks of cancer.** *Cell*, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.
23. HASHEMI, M. *et al.* **EMT mechanism in breast cancer metastasis and drug resistance: Revisiting molecular interactions and biological functions.**

- Biomedecine & pharmacotherapie [Biomedicine & pharmacotherapy], v. 155, n. 113774, p. 113774, 2022.
24. HUCK, L. *et al.* **β 1-integrin is dispensable for the induction of ErbB2 mammary tumors but plays a critical role in the metastatic phase of tumor progression.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 107, n. 35, p. 15559–15564, 16 ago. 2010.
 25. JURA, N. *et al.* **Mechanism for activation of the EGF receptor catalytic domain by the juxtamembrane segment.** Cell, v. 137, n. 7, p. 1293–1307, 2009.
 26. KAPP, T. G. *et al.* **A comprehensive evaluation of the activity and selectivity profile of ligands for RGD-binding integrins.** Scientific reports, v. 7, n. 1, p. 39805, 2017.
 27. KARIYA, Y.; NISHITA, M. **Integrins in cancer drug resistance: Molecular mechanisms and clinical implications.** International journal of molecular sciences, v. 26, n. 7, p. 3143, 2025.
 28. LAMOUILLE, S.; XU, J.; DERYNCK, R. **Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition.** Nature Reviews Molecular Cell Biology, v. 15, n. 3, p. 178–196, mar. 2014.
 29. LESNIAK, D. *et al.* **β 1-Integrin Circumvents the Antiproliferative Effects of Trastuzumab in Human Epidermal Growth Factor Receptor-2–Positive Breast Cancer.** Cancer Research, v. 69, n. 22, p. 8620–8628, 11 nov. 2009.
 30. LI, J.; YAN, J.; SPRINGER, T. A. **Low-affinity integrin states have faster ligand-binding kinetics than the high-affinity state.** eLife, v. 10, 2021.
 31. LI, S. *et al.* **Integrin signaling in cancer: bidirectional mechanisms and therapeutic opportunities.** Cell Communication and Signaling, v. 21, n. 1, 28 set. 2023.
 32. LI, X. *et al.* **Challenges and prospects in HER2-positive breast cancer-targeted therapy.** Critical reviews in oncology/hematology, v. 207, n. 104624, p. 104624, 2025.
 33. MAADI, H. *et al.* **Trastuzumab mechanism of action; 20 years of research to unravel a dilemma.** Cancers, v. 13, n. 14, p. 3540, 2021.
 34. MANDÓ, P. *et al.* **Targeting ADCC: A different approach to HER2 breast cancer in the immunotherapy era.** Breast (Edinburgh, Scotland), v. 60, p. 15–25, 2021.

35. NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Ductal carcinoma in situ of the breast.** [Ilustração]. USA: National Cancer Institute, 2012. Acesso em: 2 out. 2025.
36. NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Invasive ductal carcinoma of the breast.** [Ilustração]. USA: National Cancer Institute, 2019. Acesso em: 2 out. 2025.
37. NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Invasive lobular carcinoma of the breast.** [Ilustração]. USA: National Cancer Institute, 2019. Acesso em: 2 out. 2025.
38. NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Lobular carcinoma in situ of the breast.** [Ilustração]. USA: National Cancer Institute, 2022. Acesso em: 2 out. 2025.
39. NATIONAL CANCER INSTITUTE. **What Is Cancer?.** Acesso em: 2 out. 2025.
40. OBEAGU, E. I.; OBEAGU, G. U. **Breast cancer: A review of risk factors and diagnosis.** *Medicine*, v. 103, n. 3, p. e36905, 2024.
41. PALMA, C. DE S. **Avaliação de alterações proteômicas em diferentes modelos de indução da transição epitelial-mesenquimal (EMT) em células de adenocarcinoma de mama.** [s.l.] Universidade de Sao Paulo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBiUSP, 2019.
42. PANG, X. *et al.* **Targeting integrin pathways: mechanisms and advances in therapy.** *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 8, n. 1, p. 1–42, 2 jan. 2023.
43. PERRIER, A. *et al.* **The extracellular domain of Her2 in serum as a biomarker of breast cancer.** *Laboratory Investigation*, v. 98, n. 6, p. 696–707, 28 fev. 2018.
44. RIVAS-MERCADO, E. A.; GARZA-OCAÑAS, L. **Disintegrins obtained from snake venom and their pharmacological potential.** *Medicina universitaria*, v. 19, n. 74, p. 32–37, 2017.
45. RUEDAS, R. *et al.* **Structure and conformational variability of the HER2-trastuzumab-pertuzumab complex.** *Journal of structural biology*, v. 216, n. 2, p. 108095, 2024.
46. SHIH, C.-H.; CHIANG, T.-B.; WANG, W.-J. **Inhibition of integrins $\alpha v/\alpha 5$ -dependent functions in melanoma cells by an ECD-disintegrin acurhagin-C.** *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology*, v. 32, n. 3–4, p. 152–159, 2013.

47. SU, Chen; MO, Jie; DONG, Shuilin; *et al.* **Integrin β -1 in disorders and cancers: molecular mechanisms and therapeutic targets.** Cell communication and signaling: CCS, v. 22, n. 1, p. 71, 2024.
48. THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Real-Time PCR Handbook.** Thermo Fisher Scientific, 2016. Acesso em: 30 out. 2025.
49. THORNTON, Brenda; BASU, Chhandak. **Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software.** Biochemistry and Molecular Biology Education, v. 39, n. 2, p. 145–154, 2011.
50. TOSCANI, A. M. *et al.* **Distinct ErbB2 receptor populations differentially interact with beta1 integrin in breast cancer cell models.** PloS one, v. 12, n. 3, p. e0174230, 2017.
51. TURNER, K. M. *et al.* **Heterogeneity within molecular subtypes of breast cancer.** American journal of physiology. Cell physiology, v. 321, n. 2, p. C343–C354, 2021.
52. VASCONCELOS, A. A. *et al.* **Structure-function relationship of the disintegrin family: Sequence signature and integrin interaction.** Frontiers in molecular biosciences, v. 8, p. 783301, 2021.
53. VIVEKANANDHAN, S.; KNUTSON, K. L. **Resistance to trastuzumab.** Cancers, v. 14, n. 20, p. 5115, 2022.
54. WALSH, E. M.; MARCINKIEWICZ, C. **Non-RGD-containing snake venom disintegrins, functional and structural relations.** Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology, v. 58, n. 4, p. 355–362, 2011.
55. WERMELINGER, L. S. *et al.* **Integrin inhibitors from snake venom: exploring the relationship between the structure and activity of RGD-peptides.** Archives of biochemistry and biophysics, v. 482, n. 1–2, p. 25–32, 2009.
56. XU, L. *et al.* **HER2-targeted therapies for HER2-positive early-stage breast cancer: present and future.** Frontiers in pharmacology, v. 15, p. 1446414, 2024.
57. YOUSSEF, K. K. *et al.* **Two distinct epithelial-to-mesenchymal transition programs control invasion and inflammation in segregated tumor cell populations.** Nature cancer, v. 5, n. 11, p. 1660–1680, 2024.

58. ZHANG, M.; ZHANG, B. **Extracellular matrix stiffness: mechanisms in tumor progression and therapeutic potential in cancer.** Experimental hematology & oncology, v. 14, n. 1, p. 54, 2025.
59. ZHANG, X. **Molecular classification of breast cancer: Relevance and challenges.** Archives of pathology & laboratory medicine, v. 147, n. 1, p. 46–51, 2023.
60. ZHAO, J. *et al.* **Silver Jubilee of HER2 targeting: a clinical success in breast cancer.** Journal of the National Cancer Center, 2025.