

Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Doutorado

**EFEITO ANTITUMORAL DA MIRICETINA ASSOCIADO AOS
MECANISMOS DE ADESÃO CELULAR EM LINHAGEM METASTÁTICA
DE CÂNCER DE MAMA**

HIRAN REIS SOUSA

São Luís - MA

2022

HIRAN REIS SOUSA

**EFEITO ANTITUMORAL DA MIRICETINA ASSOCIADO AOS
MECANISMOS DE ADESÃO CELULAR EM LINHAGEM METASTÁTICA
DE CÂNCER DE MAMA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos.

São Luís - MA

2022

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a)
autor(a). Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Reis Sousa, Hiran.

EFEITO ANTITUMORAL DA MIRICETINA ASSOCIADO AOS
MECANISMOS DE ADESÃO CELULAR EM LINHAGEM METASTÁTICA DE
CÂNCER DE MAMA / Hiran Reis Sousa. - 2022.

84 f.

Orientador(a): Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luís, 2022.

1. Câncer de mama. 2. Interação plaqueta-célula
tumoral. 3. Metástase. 4. Miricetina. 5. Proteína Dissulfeto
Isomerase. I. Silva de Azevedo dos Santos, Ana Paula. II.
Título.

HIRAN REIS SOUSA

**EFEITO ANTITUMORAL DA MIRICETINA ASSOCIADO AOS
MECANISMOS DE ADESÃO CELULAR EM LINHAGEM METASTÁTICA
DE CÂNCER DE MAMA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Maranhão, como requisito para obtenção do título de
Doutor em Ciências da Saúde.

Aprovada em / /

Prof. Dr. Renato Simões Gaspar

Universidade de São Paulo, São Paulo (SP).
Avaliador externo

Prof. Dr. Wellyson da Cunha Araújo Firmo

Universidade CEUMA, São Luís (MA).
Avaliador externo

Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes

Universidade Federal do Maranhão, São Luís (MA).
Avaliador Interno

Prof. Dr. Andrés Ezequiel Trostchansky Vasconcellos

Universidad de la República (UdelaR), Montevideu, Uruguay.
Avaliador Externo (memória)

Não temas, porque eu sou contigo; não te assombres,
porque eu sou teu Deus; eu te fortaleço, e te ajudo, e te
sustento com a destra da minha justiça.

Isaías 41:10

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pois, sem Ele seria impossível chegar até aqui, sem seu amor, proteção e força, não teria condições de continuar nessa jornada que não foi nada fácil. Mas eu pude sentir o cuidar dEle através das pessoas que me ajudaram a passar por esse processo.

Agradeço a professora Ana Paula, a personificação da doçura, alegria e paciência, obrigado por me aceitar como seu aluno num período conturbado e cheio de incertezas em minha vida. Obrigado por me apoiar e acreditar em mim, até em momentos que eu não tinha mais forças para crer que seria possível a realização desse sonho.

Agradeço ao Professor Marcus Paes, pelo ensinamento transmitido no período em que tive sob sua orientação, externo o meu respeito e admiração como pesquisador.

Agradeço ao Professor Andrés Trostchansky, pela ajuda durante o mestrado, início e fim do doutorado, pelos conselhos e ensinamentos transmitido durante os curtos períodos que tivemos contato, mas que ficarão guardados em minha memória por toda minha vida. Obrigado por sempre estar disponível a colaborar e partilhar conhecimentos.

Agradeço aos meus pais, Ivan (*in memoriam*) e Franciíres, pelo seu amor incondicional, pelas orações e palavras de conforto. Agradeço aos meus irmãos Jerúsio, Juarez, Ivan Júnior e minha recém conhecida irmã Lea que ainda não pude conhecer pessoalmente. Obrigado por torcerem por mim e compreenderem minhas ausências nas festividades familiares durante esses anos de dedicação ao doutorado.

Agradeço a minha esposa Stefanie, pelo seu cuidar, orações, sonhar comigo, me acalantar em seus braços nos momentos de angústia e me presentear com nosso tão sonhado filho Isaías, que nos trouxe grandes alegrias em seu pouco tempo de existência.

Agradeço aos meus líderes Luiz Fernando e Izabel e meus amigos Mateus e Denise, pelas orações, conselhos e momentos agradáveis durante essa árdua jornada.

Agradeço a família LIAC, Letícia, André, Sulayne, Darley e Ana Luiza Butareli, pela ajuda nos experimentos, partilha de momentos de descontração e frustrações. Agradeço também aos meus eternos amigos da minha antiga casa científica LEFisio.

Agradeço aos órgãos de fomento FAPEMA, Capes e CNPq.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Etiologia das neoplasias	19
1.2. O papel das espécies reativas de oxigênio no microambiente tumoral.....	19
2. REFERENCIAL TEÓRICO	22
2.1. A Proteína Dissulfeto Isomerase	23
2.2. Regulação da PDI de superfície celular e seus efeitos fisiopatológicos	25
2.3. Inibidores da PDI.....	27
2.4. A miricetina e seus efeitos em células neoplásicas	29
2.5. Integrinas adesivas e seus mecanismos de regulação celular	31
2.6. Metástase de Células Cancerígenas	35
2.7. Contribuição das Plaquetas para o Desenvolvimento do Câncer	36
3. OBJETIVOS	42
3.1. Objetivo Geral	42
3.2. Objetivos Específicos.....	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1. Manutenção das linhagens celulares.....	43
4.2. Cultura 2D.....	43
4.3. Cultura 3D.....	44
4.4. Tratamento da Cultura 3D.....	44
4.5. Avaliação dos esferoides.....	44
4.5.1. Contagem dos esferoides	44
4.5.2. Diâmetro e morfologia dos esferoides	45
4.5.3. Viabilidade.	45
4.6. Análise da Interação plaquetas-células tumorais	45
4.7. Análise da produção de H₂O₂ nas células em cultivo	46
4.8. Análise da produção de NO nas células em cultivo	46
4.9. Análise Estatística	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	47
5.1. Viabilidade celular em ensaios de MTT	47
5.2. Ensaios de formação de esferoides em cultura 3D.....	51

5.3. Análise das interações plaquetas-células tumorais em co-cultura	57
5.4. Análise da produção de H₂O₂ e NO do sobrenadante da co-cultura	62
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AICR	Instituto Americano de Pesquisa do Câncer (do inglês <i>American Institute for Cancer Research</i>)
ADAM	Proteína Desintegrina e Metaloproteínase (do inglês <i>A Disintegrin And Metaloproteinase-ADAM</i>)
ADP	Adenosina Difosfato
APICT	Agregação Plaquetária Induzida por Células Tumorais (do inglês <i>Tumor Cell-Induced Platelet Aggregation-TCIPA</i>)
ATCC	Coleção Americana de Tipos Celulares (do inglês <i>American Type Culture Collection</i>)
ATP	Adenosina Trifosfato
CCL5	Ligante 5 de quimiocinas CC (do inglês <i>Chemokine (C-C motif) ligand 5-CCL5</i>)
COVID-19	Doença do coronavírus (do inglês <i>Corona Virus Disease-19</i>)
CTC	Células Tumorais Circulantes (do inglês <i>Circulating tumor cells</i>)
CTE	Cadeia Transportadora de Elétrons (do inglês <i>Electron Transport Chains-ECT</i>)
DHODH	Diidroorotato desidrogenase
DMEM	do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>)
ECM	Matriz Extracelular (do inglês <i>Extracellular Matrix</i>)
EGF	Fator de Crescimento Epidermal (do inglês <i>Epidermal Growth Factor</i>)
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês <i>Reactive oxygen Species-ROS</i>)
Ero1α	Oxidoredutina 1 α do retículo endoplasmático (do inglês <i>Endoplasmic reticulum disulphide oxidase 1α</i>)
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio (do inglês <i>Reactive Nitrogen Species-RNS</i>)

ERp	Proteína do Retículo Endoplasmático (do inglês <i>Endoplasmic Reticulum Protein</i>)
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo
GPDH2	Glicerol-3-Fosfato Desidrogenase 2
GPx	Glutationa peroxidase
HER-2	Receptor do Fator de Crescimento Epidermal Humano tipo 2 (do inglês <i>Human Epidermal growth factor Receptor-type 2-HER-2</i>)
HGF	Fator de Crescimento de Hepatócitos (do inglês <i>Hepatocyte Growth Factor-HGF</i>)
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IL-6	Interleucina 6
LPA	Ácido lisofosfatídico (do inglês <i>Lysophosphatidic acid</i>)
MAO	Monoamina Oxidase
MCF-7	Células tumorais de câncer de mama positivas para receptor de estrógeno
MCF-10	Células epiteliais de tecido mamário não tumorigênica
MDA-MB-231	Células de câncer de mama triplo negativas e invasivas
MMP	Metaloproteinase de matriz (do inglês <i>Matrix metalloproteinase</i>)
MTT	[3-(4,5-dimetiltiazol- 2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina]
NADPH	Fosfato de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo oxidase (do inglês <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate oxidase</i>)
NOX	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Oxidase (do inglês <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase</i>)
PACMA	Ácido Propinóico de Carbamoilmetilamidas (do inglês poly[acrylic acid-co-maleic acid])
PAF	Fator Ativador de Plaquetas (do inglês <i>Platelet Activating Factor-PAF</i>)
PDI	Proteína Dissulfeto Isomerase
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (do inglês <i>Platelet-derived growth fator</i>)

PG	Prostaglandina
PF4	Fator Plaquetário 4 (do inglês <i>Platelet factor 4</i> -PF4)
PRDX	Peroxirredoxina
RAO	Resposta antioxidante
RE	Retículo Endoplasmático (do inglês <i>Endoplasmic Reticulum</i> -ER)
TEM	Transição Epitelial-Mesenquimal (do inglês <i>Epithelial-Mesenchymal Transition</i> -EMT)
TGFβ	Fator de Transformação do Crescimento Beta (do inglês <i>Transforming Growth Factor-β</i> - TGFβ)
TMP3	Tropomiosina 3 (do inglês <i>Tropomyosin 3</i>)
TRX	Tiorredoxina
SARS-CoV-2	Corona Vírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (do inglês <i>Severe Acute Respiratory Syndrome Corona Virus-2</i>)
UPR	Resposta a Proteínas Mal Enoveladas (do inglês <i>unfolded protein response</i>)
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular (do inglês <i>Vascular endothelial growth fator</i>)
vWF	Fator de Von Willebrand (do inglês <i>Von Willebrand fator</i> -vWF)
WCRF	Fundo Mundial de Pesquisa do Câncer (do inglês <i>World Cancer Research Fund</i>)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Visão esquemática geral das principais fontes de ROS na célula e os inibidores correspondentes desses locais.....	20
Figura 2. Visão esquemática geral da paisagem antioxidante na célula e os moduladores correspondentes dos principais participantes.....	21
Figura 3: Domínios, composição e estrutura tridimensional da PDI.	23
Figura 4: Papéis fisiopatológicos da superfície celular e da proteína dissulfeto isomerase extracelular	25
Figura 5: Os papéis protetores ou apoptóticos de PDI são regulados pela localização subcelular de PDI, ambiente redox e grau de estresse do retículo endoplasmático.	26
Figura 6: A miricetina afeta as células cancerígenas modulando a expressão de vários alvos moleculares.	30
Figura 7: Sobrevivência mediada por integrina versus vias apoptóticas.	32
Figura 8: Integrinas na resposta do hospedeiro ao câncer.	34
Figura 9: Contribuição das plaquetas no desenvolvimento do câncer	36
Figura 10: Moléculas de Adesão Celular (MAC) contribuem para a metástase	38
Figura 11: As Células Tumorais Circulantes (CTCs) induzem a Agregação Plaquetária Induzida por Células Tumorais (APICT).....	39
Figura 12: Efeitos antiproliferativo e citotóxico agudos da miricetina em células tumorais de câncer de mama MCF-10, MCF-7 (ER positiva) e MDA-MB-231 (triplo negativa).	48
Figura 13: Efeitos antiproliferativo e citotóxico subagudos da miricetina em células tumorais de câncer de mama MCF-10, MCF-7 (ER positiva) e MDA-MB-231 (triplo negativa).....	49
Figura 14: Efeitos antiproliferativo e citotóxico crônicos da miricetina em células tumorais de câncer de mama MCF-10, MCF-7 (ER positiva) e MDA-MB-231 (triplo negativa).....	50

Figura 15: Impacto do tratamento com miricetina na formação dos esferoides em células tumorais de câncer de mama MCF-7 (ER positiva).....	52
Figura 16: Impacto do tratamento com miricetina na estabilização de interações entre células que compõem os esferoides de células tumorais de câncer de mama MCF-7 (ER positiva).....	53
Figura 17: Impacto do tratamento com miricetina na formação dos esferoides em células tumorais de câncer de mama MDA-MB-231 (triplo negativa).....	55
Figura 18: Impacto do tratamento com miricetina na estabilização de interações entre células que compõem os esferoides de células tumorais de câncer de mama MCF-7 (ER positiva).	56
Figura 19: Impacto do tratamento com miricetina na interação célula tumoral-plaquetas.....	59
Figura 20: Imagens representativas dos poços dos experimentos descritos no gráfico anterior	60
Figura 21: Impacto do tratamento com miricetina na produção de H ₂ O ₂ e NO	63
Figura 22: Mecanismo de ação da miricetina sobre PDI de superfície das células tumorais e plaquetas	66
Figura Suplementar 1: Morte induzida pela miricetina em exposição de 1 ou 2 horas	82
Figura Suplementar 2: Interferência da miricetina no ensaio de morte celular por MTT.....	82
Figura Suplementar 3: Interferência da exposição a H ₂ O ₂ no ensaio de morte celular por MTT	83

RESUMO

O câncer é uma doença pleiotrópica causada pela proliferação descontrolada de células e é a segunda causa de morte, depois das doenças cardiovasculares, em todo o mundo. Levantamentos recentes apontam aceleração nos números de casos que já chegam a causar morte em um a cada oito homens e a cada onze mulheres em todo o mundo, dos quais, o câncer de pulmão e de mama são predominantes, respectivamente. O câncer é um distúrbio multifatorial, apresentando várias terapias convencionais para o seu tratamento, que têm enormes efeitos colaterais devido à sua falta de especificidade, podendo atacar células saudáveis. Nas últimas duas décadas, os fitoquímicos têm sido estudados como forma alternativa de tratamento e adjuvante na terapia anticâncer convencional. Das várias moléculas de polifenóis que exibiram propriedades anticancerígenas potentes, a miricetina foi uma das substâncias que mais se destacou nos últimos anos, por apresentar diversas propriedades farmacológicas que também incluem atividade antioxidante, anti-inflamatórias, anticâncer e modulação epigenética. Diante disso, nosso grupo se propôs investigar o efeito antitumoral da miricetina através do mecanismo de inibição da PDI induzindo o estresse oxidativo em modelo de microambiente tumoral, utilizando técnicas de avaliação da citotoxicidade *in vitro* e técnicas de cultura celular em 3D que mimetizam tecidos tumorais mais próximo do *in vivo*, quantificação de H_2O_2 e NO e co-cultura com plaquetas. Nossos resultados mostram que a miricetina promoveu efeito citotóxico em células de tecido mamário normal, de forma discreta, e nas células de câncer de mama de forma mais acentuada e dose-dependente, principalmente na linhagem de maior poder invasivo e metastático (MDA-MB-231). Também ficou evidente, em nossos resultados, que a miricetina reduz a formação de esferoides e sua estabilização, sendo esse efeito mais expressivo nas células de câncer de mama triplo negativas MDA-MB-231, que são metastáticas. Houve um aumento na produção de H_2O_2 e NO, de forma dose-dependente e mais evidente nas células mais poder metastático e seus níveis condizentes com níveis de sinalização de morte celular. Houve redução na interação de células tumorais com plaquetas, de forma dose-dependente e mais significativo na linhagem MDA-MB-231. Os estudos são unânimes em afirmar que muito se tem a pesquisar sobre o efeito antineoplásico da miricetina, pois seu efeito é comprovadamente amplo sobre vários alvos moleculares que envolvem a progressão de diversos tipos de câncer, confirmada por diferentes estudos. Diante disso nossos próximos passos investigativos serão de avaliar o estresse oxidativo das células testadas e como a miricetina interfere nas interações celulares cruciais para a formação e estabilização dos esferoides, bem como na formação do escudo físico de plaquetas com células tumorais circulantes.

Palavras-chave: Adesão celular; Câncer de Mama; Interação plaqueta-célula tumoral; Metástase; Miricetina; Proteína Dissulfeto Isomerase.

ABSTRACT

Cancer is a pleiotropic disease caused by uncontrolled cell proliferation and is the second leading cause of death, after cardiovascular disease, worldwide. Recent surveys point to an acceleration in the number of cases that already cause death in one in eight men and in eleven women worldwide, of which lung and breast cancer are predominant. Cancer is a multifactorial disorder, presenting several conventional therapies for its treatment, which have enormous side effects due to their lack of specificity, being able to attack healthy cells. In the last two decades, phytochemicals have been studied as an alternative form of treatment and an adjunct to conventional anticancer therapy. Of the various polyphenol molecules that exhibited potent anticancer properties, myricetin was one of the substances that most stood out in recent years, as it has several pharmacological properties that also include antioxidant, anti-inflammatory, anticancer and epigenetic modulation activities. Therefore, our group set out to investigate the antitumor effect of myricetin through the mechanism of PDI inhibition by inducing oxidative stress in a tumor microenvironment model, using *in vitro* cytotoxicity assessment techniques and 3D cell culture techniques that mimic closer to *in vivo*, quantification of H₂O₂ and NO and co-culture with platelets. Our results show that myricetin promoted a cytotoxic effect in normal breast tissue cells, in a discrete way, and in breast cancer cells in a more accentuated and dose-dependent way, mainly in the lineage with greater invasive and metastatic power. It was also evident in our results that myricetin reduces the formation of spheroids and their stabilization, this effect being more expressive in MDA-MB-231 triple negative breast cancer cells, which are metastatic. There was an increase in the production of H₂O₂ and NO, in a dose-dependent manner and more evident in cells with more metastatic power and their levels consistent with levels of cell death signaling. There was a dose-dependent and more significant reduction in the interaction of tumor cells with platelets in the MDA-MB-231 lineage. Although there are many studies showing its cytotoxic effect on tumor cells, studies are unanimous in stating that there is much to be researched on the antineoplastic effect of myricetin, as its effect is proven to be broad on several molecular targets that involve the progression of different types of cancer, confirmed by different studies. Therefore, our next investigative steps will be to evaluate the oxidative stress of the tested cells and how myricetin interferes in cell interactions crucial for the formation and stabilization of spheroids, as well as in the formation of the physical shield of platelets with circulating tumor cells.

Keywords: Breast cancer; Cell adhesion; Metastasis; Myricetin; Protein Disulfide Isomerase; Platelet-tumor cell interaction.

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um dos principais problemas de saúde pública no mundo e já está entre as quatro principais causas de morte prematura (antes dos 70 anos de idade) na maioria dos países, segundo a mais recente estimativa mundial. A incidência de muitos tipos de câncer continua a aumentar, apesar de muitos sucessos nas áreas de rastreamento, prevenção e tratamento (BRAY et al., 2018).

Os tipos de câncer que afetam a população têm variado ao longo do tempo, com uma tendência a mais doenças malignas causadas por fatores de risco modificáveis relacionados a condições socioeconômicas da população, a crescente urbanização, associando-se ao sedentarismo, alimentação inadequada, dependência química, entre outras comorbidades relacionadas ao estilo de vida ocidental. Concomitante a isso, uma combinação de rastreamento populacional e terapêutica melhorada tornou a doença mais tratável (HULVAT, 2020).

Dados da Organização Mundial da Saúde (2021) apontam que em todo o mundo, só no ano de 2020, foram detectados cerca de 19,3 milhões de novos casos de câncer (18,1 milhões, excluindo câncer de pele não melanoma) e quase 10 milhões de mortes por câncer (9,9 milhões, excluindo câncer de pele não melanoma). Dentre os diferentes tipos de cânceres, o de mama feminino ultrapassou o de pulmão como o câncer mais comumente diagnosticado, com estimados 2,3 milhões de novos casos (11,7%), seguidos por câncer de pulmão (11,4%), próstata (7,3%) e colo do útero (6%). Dentre as causas de morte, o câncer de pulmão permaneceu como a principal causa de óbito, com uma estimativa de 1,8 milhão de mortes (18%), seguido por câncer de fígado (8,3%), estômago (7,7%) e câncer de mama feminino (6,9%) (SUNG et al., 2021).

No Brasil, essa situação não é diferente, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) são estimados para o ano de 2021, 625 mil casos novos de câncer (450 mil, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma) que sugere uma polarização epidemiológica em andamento (INCA, 2020). Com o recente envelhecimento da população, que projeta o crescimento exponencial de idosos, é possível identificar um aumento expressivo na prevalência do câncer (BANNA; GONDINHO, 2019). De acordo com os dados disponibilizados em 2020, pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA) como

local primário, estimou-se 65.840 notificações de neoplasia prostática, representando 29,2% e de mama feminino de 66.280 novos casos, sendo 29,7% do total de cânceres, sendo nítido o aumento da prevalência de cânceres associados ao melhor nível socioeconômico – mama, próstata e cólon e reto – simultaneamente, temos taxas de incidência elevadas de tumores geralmente associados à pobreza – colo do útero, pênis, estômago e cavidade oral. Esta distribuição certamente resulta de exposição diferenciada a fatores ambientais relacionados ao processo de industrialização, como agentes químicos, físicos e biológicos, e das condições ambientais (BRASIL, 2020). Se descontados os casos de câncer de pele não melanoma, serão 450 mil novos registros da doença para cada ano e, utilizando o cálculo global corrigido para o sub-registro, segundo Mathers et al. (2003), teremos resultados que apontam a ocorrência de cerca de 685 mil casos novos (MATHERS et al., 2003).

A Tabela 1 descreve as estimativas das taxas de incidência dos principais tipos de câncer (excluindo o câncer de pele do tipo não melanoma), por sexo. Entre os homens, os cânceres de próstata, cólon e reto, traqueia, brônquios e pulmão, estômago foram responsáveis por mais da metade de todos os cânceres diagnosticados em 2021. Só o câncer de próstata foi responsável por 29,2% (65.840) dos casos incidentes, tornando-o câncer mais comum entre os homens. Os quatro tipos de câncer mais comumente diagnosticados entre as mulheres em 2021 foram o de mama, cólon e reto, colo do útero e traqueia, brônquio e pulmão. O câncer de mama foi o responsável por 29,7% (66.280) de todos os novos casos de câncer entre as mulheres (INCA, 2020).

Ainda segundo o INCA (2020), a previsão é que haja para 2021 um número maior de novos casos nas regiões Sudeste (302.280) e Nordeste (136.210), seguidas das regiões Sul (114.570), Centro-Oeste (47.640) e do Norte do país (24.670).

No estado do Maranhão foram estimados para o ano de 2021, 8.270 novos casos de câncer para cada 100.000 mil habitantes (excetuando-se o câncer de pele do tipo não melanoma, 2.290 casos), 50,8% (4.200) ocorrendo em homens e 49,2% (4.070) nas mulheres. Os sítios de câncer mais comuns são o câncer de próstata (1.850 casos, 22,4% de todos os casos de câncer), seguido por câncer de colo do útero (890; 10,8%), câncer de mama feminina (840; 10,2%) e câncer de traqueia, brônquio e pulmão (470;

5,7%). Estes quatro representam 49,1% do encargo global estimado para o estado em 2021. Os sítios primários mais comuns em homens são os de próstata (1.850; 44%), estômago (280; 6,7%), traqueia, brônquios e pulmão (270; 6,4%) e cólon e reto (210; 5%). Nas mulheres, o câncer de colo do útero é a neoplasia mais predominante (890; 21,9%), seguido pelo câncer de mama (840; 20,6%), cólon e reto (240; 5,9%) e glândula tireoide (240; 5,9%) (INCA, 2020).

Tabela 1 - Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2021, divididos por sexo, exceto pele não melanoma.

HOMENS			MULHERES		
Localização Primária	Casos	%	Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e Reto	20.520	9,1%	Cólon e Reto	20.470	9,2%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.760	7,9%	Colo do Útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%	Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.440	5,6%
Cavidade Oral	11.180	5,0%	Glândula Tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%	Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%	Corpo do Útero	6.540	2,9%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%	Ovário	6.650	3,0%
Laringe	6.470	2,9%	Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%	Leucemias	4.890	2,2%

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Fonte: Adaptado do Instituto Nacional do Câncer, (INCA, 2020)

Com todos esses dados, percebe-se que, dentre os diferentes tipos de câncer, o de mama corresponde o mais incidente na população feminina, no Brasil. Em 2020, no mundo, aproximadamente 2,3 milhões de casos novos foram estimados, o que representou 24,5% dos casos novos por câncer em mulheres. Representando, também, a principal causa de morte por câncer nessa população, com 684.996 óbitos estimados para 2021 (15,5% dos óbitos por câncer em mulheres). Esta é uma doença multifatorial e complexa, que corresponde um problema de saúde pública global e é a neoplasia mais frequentemente diagnosticada em mulheres no mundo ocidental (SUNG et al., 2021).

Esses números poderão ser ainda maiores, considerando a pandemia da COVID-19 que impôs medidas urgentes e agressivas pelos serviços de saúde em todo o mundo, público e privado, pela ameaça representada pelo SARS-CoV-2, um vírus altamente infeccioso e com potencial para evoluir para condições graves e fatais, especialmente em idosos, pessoas imunossuprimidas e portadores de doenças crônicas.

Algumas recomendações, como o distanciamento social, levaram a um atraso no diagnóstico preciso e correto do câncer de mama, o que resulta em um pior estágio de câncer, ao ser diagnosticado, e consequentemente redução na sobrevida das pacientes (MARINGE et al., 2020).

Dentre os fatores de risco relacionados ao câncer de mama, destacam-se alimentação inadequada que contribui para obesidade ou sobrepeso, falta da prática de atividade física, consumo de bebidas alcoólicas, exposição frequente a radiações ionizantes para tratamento (radioterapia) ou exames diagnósticos, primeira menstruação antes de 12 anos, parar de menstruar (menopausa) após os 55 anos, uso de contraceptivos hormonais (estrogênio-progesterona), ter feito reposição hormonal pós-menopausa (principalmente por mais de cinco anos) e histórico familiar de câncer de ovário e mama (INCA, 2020).

De todos esses fatores de risco, sabe-se que a obesidade e certas exposições alimentares contribuem para o estresse oxidativo, fenômeno atrelado não só ao surgimento como também as recidivas do câncer de mama, uma vez que aumenta uma cascata de reações moleculares nas células e altera o estado metabólico dos tecidos. O metabolismo oxidativo e a homeostase redox são uma parte essencial da vida aeróbia. Organismos vivos não podem sobreviver sem esses processos. Sob tais condições desfavoráveis, os derivados de oxigênio podem danificar ácidos nucleicos, lipídios e proteínas, alterar o equilíbrio oxidativo, e regular a viabilidade celular, culminado com o aparecimento de células malignas (SAHA et al., 2017).

Devido a esta associação, a *World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research* (WCRF/AICR) atualizaram, em 2018, recomendações sobre prevenção ao câncer e recidiva, principalmente relacionadas ao consumo alimentar e a prática de atividade física. A adesão adequada às recomendações da WCRF/AICR parece resultar em melhora das concentrações de biomarcadores de estresse oxidativo, redução do risco, incidência e recidiva do câncer de mama, porém, mais estudos são necessários para corroborar tais associações (SCHROEDER, 2021)

1.1. Etiologia das neoplasias

O câncer surge a partir de células que sofrem uma sequência de mutações genéticas que podem ser resultados de uma variedade de fatores, tanto intrínsecos (herdadas ou erros na replicação dos ácidos nucleicos), quanto extrínsecos (dano e instabilidade genética) induzida por fatores físicos, químicos ou biológicos (MBEUNKUI; JOHANN, 2009). Uma única mutação, no entanto, dificilmente leva à formação de um tumor, para que esse processo ocorra, são necessárias mutações cumulativas que, progressivamente, irão interferir nos mecanismos de proliferação, diferenciação, morte celular e de reparo do ácido desoxirribonucleico (DNA do inglês *deoxyribonucleic acid*) (BACCELLI; TRUMPP, 2012).

Para que as células tumorais consigam progredir, é necessário romper uma série de barreiras fisiológicas (WARD, 2002), para tanto, essas células promovem interações entre elas e as mais variadas células componentes do estroma que as permeiam (WIERSMA et al., 2015). Estas interações, que compõe o microambiente tumoral, são necessárias para a ativação de fatores de transcrição que induzem a expressão de genes promotores da proliferação e migração celular (MBEUNKUI; JOHANN, 2009). Assim, no microambiente há nichos nos quais ocorrem grandes diferenças de concentrações de componentes celulares, metabólitos críticos (O_2 , glicose, lactato e íons H^+), hormônios, componentes de matriz extracelular, quimiocinas, citocinas, fatores de crescimento e espécies reativas de oxigênio (ERO do inglês *Reactive oxygen Species*) (WU et al., 2012).

1.2. O papel das Espécies Reativas de Oxigênio no microambiente tumoral

As ERO são moléculas ou radicais livres de oxigênio contendo oxigênio quimicamente reativo, podendo ser geradas dentro de um sistema biológico, em diferentes fontes, como um subproduto natural do metabolismo normal do oxigênio (Figura 1). Elas são moderadores bem conhecidos do dano oxidativo, desempenhando um papel na destruição celular e ativam vias específicas de morte (SIMON; HAJ-YEHIA; LEVI-SCHAFFER, 2000).

Um conceito básico na paisagem redox celular é a interação de três organelas: as mitocôndrias, o retículo endoplasmático (RE do inglês *Endoplasmic Reticulum*) e os peroxissomos (YOBOUE; SITIA; SIMMEN, 2018), bem como substâncias contrareguladoras desse ambiente redox celular (Figura 1). A contribuição das mitocôndrias, peroxissomos e do RE para a produção intracelular de ERO varia entre as células, tecidos e o ambiente redox geral. As fontes predominantes de ERO em células normais e cancerígenas compreendem NADPH oxidases (NOX do inglês *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase*) e as cadeias de transporte de elétrons (CTE do inglês *Electron Transport Chains*) na mitocôndria, enquanto o RE também pode servir como uma fonte substancial de ERO devido a suas oxidoredutases e NOXs (PUROHIT; SIMEONE; LYSSIOTIS, 2019). Uma vez que o aumento da produção de ERO está associado ao desenvolvimento do câncer, gerando danos celulares e induzindo mutações, a pesquisa farmacêutica visa regular o ambiente redox (Figura1) como estratégias de prevenção e tratamento do câncer (NARAYANAN; MA; ÖZCELIK, 2020).

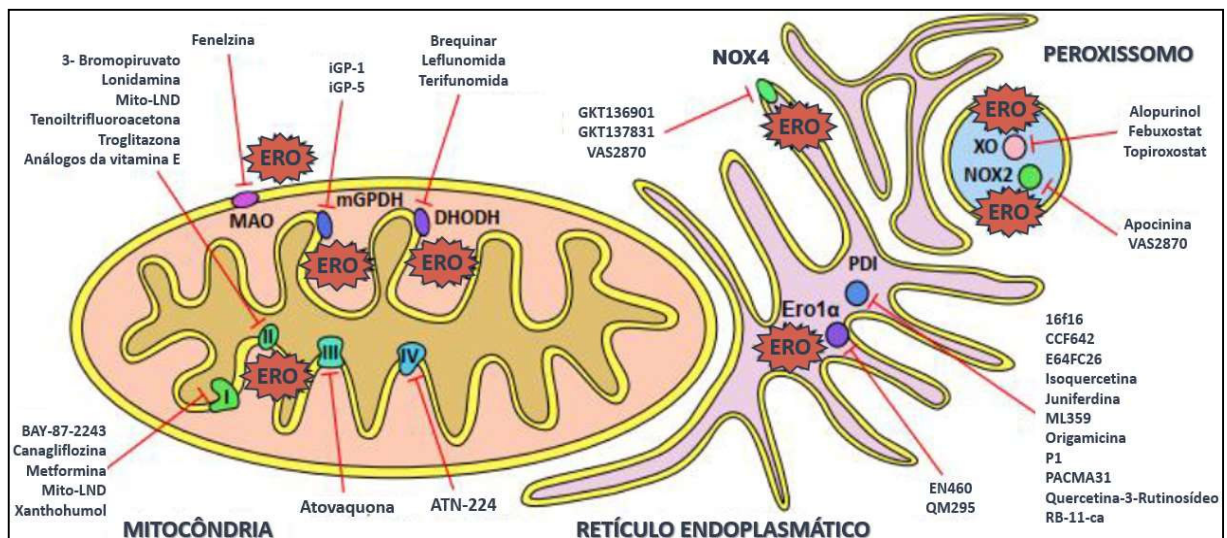


Figura 1. Visão esquemática geral das principais fontes de ERO na célula e os inibidores correspondentes desses locais. Os complexos I, II e III da CTE geram ERO diretamente, enquanto o complexo IV é a etapa de determinação da taxa da CTE. Outras enzimas que produzem ERO na mitocôndria são diidroorotato desidrogenase (DHODH), glicerol-3-fosfato desidrogenase 2 (mGPDH ou GPDH2) e monoamina oxidase (MAO). O RE compreende vários locais de produção de ERO, como NOX4 e a via de dobramento da proteína oxidativa Ero1α-PDI (Ero1α, ER oxidoredutina 1α). Os peroxissomos são outra fonte importante de produção de ERO celular devido à atividade da xantina oxidase (XO) e da NOX2. Nomes de inibidores farmacêuticos e experimentais são apresentados e os locais-alvo correspondentes de produção de ROS são indicados por linhas vermelhas. **Fonte** (NARAYANAN et al., 2020) adaptado.

Em ambientes fisiológicos, as células superam os níveis de ERO ao equilibrarem a sua geração com sua eliminação, por meio de um sistema oxidante (Figura 2), dentre eles, complexos de proteínas da família das PDI (GREK; TOWNSEND, 2014). O excesso de ERO afeta a dinâmica do citoesqueleto e pode danificar as proteínas celulares e o DNA, levando à morte celular (SIMON et al., 2000). As células tumorais, induzem altos níveis de ERO do que suas contrapartes normais, devido a seu alto metabolismo e síntese proteica, de forma que a inibição dos mecanismos oxidantes, como a inibição da PDI, são mais danosos nas células tumorais que em células normais (KAUSHIK et al., 2015).

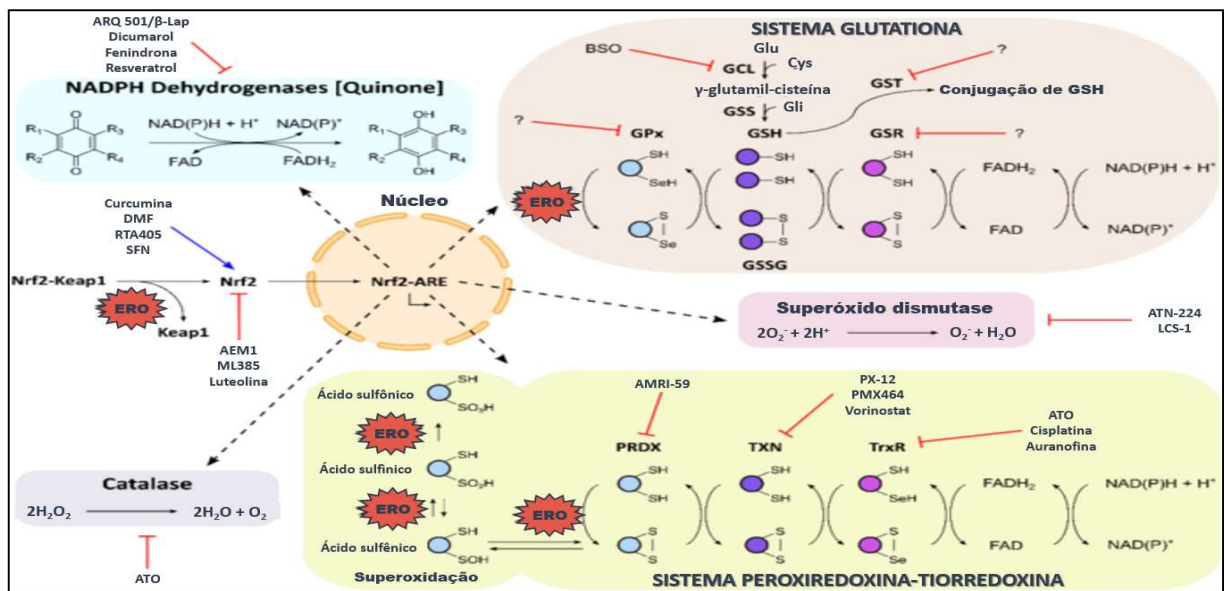


Figura 2. Visão esquemática geral da paisagem antioxidante na célula e os moduladores correspondentes dos principais participantes. As espécies reativas de oxigênio (ERO) ativam a via de sinalização Nrf2-Keap1, resultando na indução dos elementos de resposta antioxidante (RAO) por Nrf2 no núcleo. A RAO compreende o sistema glutaciona (GSH), o sistema peroxirredoxina-tiorredoxina e enzimas antioxidantes, como NADPH desidrogenases [quinona], superóxido dismutases e catalase. No sistema GSH, a atividade sequencial da glutamato cisteína ligase (GCL) e da glutaciona sintetase (GSS) produz o tripeptídeo GSH. As glutaciona peroxidases (GPx), que geralmente são selenoproteínas, usam GSH para eliminar ERO, resultando em dissulfeto de glutaciona (GSSG). A glutaciona redutase (GSR) regenera GSH usando FAD e NADPH. GSH também é usado para conjugação pela glutaciona S-transferase (GST) em processos de desintoxicação celular. No sistema peroxirredoxina-tiorredoxina, as ERO são eliminadas pela peroxirredoxina (PRDX), resultando na oxidação da cisteína peroxidática de PRDX em ácido sulfônico ou ligações dissulfeto. A superoxidação produz ácido sulfônico ou irreversível. A tiorredoxina (Txn) e a selenoproteína tiorredoxina redutase (TxnR) regeneram PRDX usando FAD e NAD (P) H. Nomes de inibidores e ativadores farmacológicos e experimentais são apresentados, e os locais-alvo correspondentes são indicados por linhas vermelhas ou setas azuis, respectivamente. **Fonte:** (NARAYANAN et al., 2020) adaptado.

O RE é uma rede intracelular de membranas que está envolvida em uma variedade de processos fisiológicos básicos: em particular, síntese de proteínas, processamento pós-tradução, dobramento e transporte de proteínas, bem como sinalização de Ca^{2+} e bioenergética em locais de contato mitocôndria-RE (FAN; SIMMEN, 2019). O RE é um componente importante no ambiente redox da célula, que compreende a NADPH oxidase e a via Ero1 α -PDI de dobramento de proteínas (ZEESHAN et al., 2016) como as duas fontes principais de ERO. Um componente dessa via é a PDI que é uma proteína abundante no RE, e é o membro fundador de uma família de 20 proteínas relacionadas no RE e essencial para o enovelamento de proteínas no RE (ALI KHAN, H.; MUTUS, B., 2014).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. A Proteína Dissulfeto Isomerase

A PDI é o membro protótipo de uma família de enzimas oxidorreductase, denominadas como família das PDIs, cuja função principal é catalisar o enovelamento redox de proteínas no lúmen do RE (ELLGAARD; RUDDOCK, 2005) além da atividade de chaperona. Com base numa estrutura multi-domínio, as funções de oxidação, redução e isomerização de pontes dissulfeto realizadas pela PDI requerem tióis vicinais nos seus motivos catalíticos, determinados pela sequência de aminoácidos CGHC, localizados nos domínios **a** e **a'** (NOIVA, 1999), além da ligação do substratos a um bolsão hidrofóbico localizado no domínio **b'** (PIRNESKOSKI et al., 2004) como descritos na figura 3.

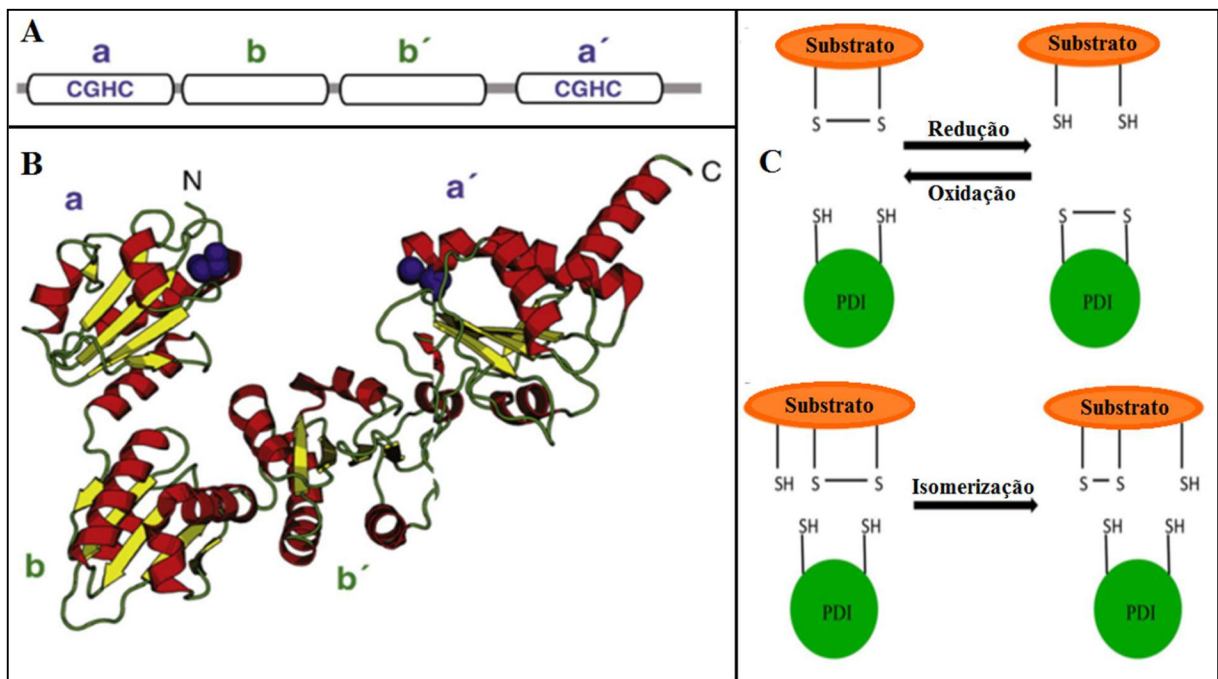


Figura 3: Domínios, composição e estrutura tridimensional da PDI. (A) Os Domínios semelhantes à tioredoxina são mostrados como retângulos arredondados, os domínios de cor roxa são domínios catalíticos (**a** e **a'**) e os de cor verde, domínios não catalíticos (**b** e **b'**). As sequências do local ativo estão evidenciadas. **(B)**. As hélices (α) são mostrados em vermelho, os fios (β) em amarelo e as conexões em verde. As cisteínas do sítio ativo estão representadas como esferas roxas. **Fonte:** (APPENZELLER-HERZOG; ELLGAARD, 2008) Adaptado. **(C)** Reações de oxidação, redução e isomerização promovidas pela PDI. **Fonte:** (ALI KHAN, HYDER; MUTUS, BULENT, 2014) adaptado.

As proteínas da família PDI compartilham pelo menos um domínio semelhante à tioredoxina que contém um par de cisteína catalítica como parte de um motivo CXXC canônico (DARBY; CREIGHTON, 1995). Os domínios cataliticamente ativos de PDI catalisam uma reação de troca tiol-dissulfeto com cisteínas de proteínas clientes nascentes (Figura 3), resultando na quebra, formação ou isomerização de ligações dissulfeto (HATAHET; RUDDOCK, 2009).

Esta reação catalisada pela oxidoredutase também requer a atividade da dissulfeto oxidase 1 α ligada à membrana do retículo endoplasmático (Ero1 α do inglês *Endoplasmic Reticulum Disulphide Oxidase 1 α*), uma oxidoredutase dependente de Flavina Adenina Dinucleotídeo (FAD) (BENHAM et al., 2013; TU; WEISSMAN, 2002; WANG et al., 2009). Um subproduto da via de dobramento da proteína oxidativa Ero1 α -PDI é H₂O₂, que contribui para um ambiente ligeiramente oxidativo dentro do RE, caracterizado por uma alta proporção GSSG:GSH (APPENZELLER-HERZOG, 2011).

Em condições fisiológicas, a expressão de PDI é rigidamente regulada, no entanto, as células cancerígenas exigem níveis mais elevados de PDI para lidar com o estresse significativo do retículo e um aumento global na síntese de proteínas para sustentar a rápida proliferação (GREK; TOWNSEND, 2014).

O envolvimento fisiopatológico da PDI extracelular e intracelular fornece uma oportunidade para tratar doenças pela inibição da PDI (Figura 4), gerando um interesse crescente no desenvolvimento terapêutico e no conhecimento cada vez maior da estrutura e propriedades dela, havendo um avanço significativo na descoberta de novos inibidores da PDI nos últimos anos.

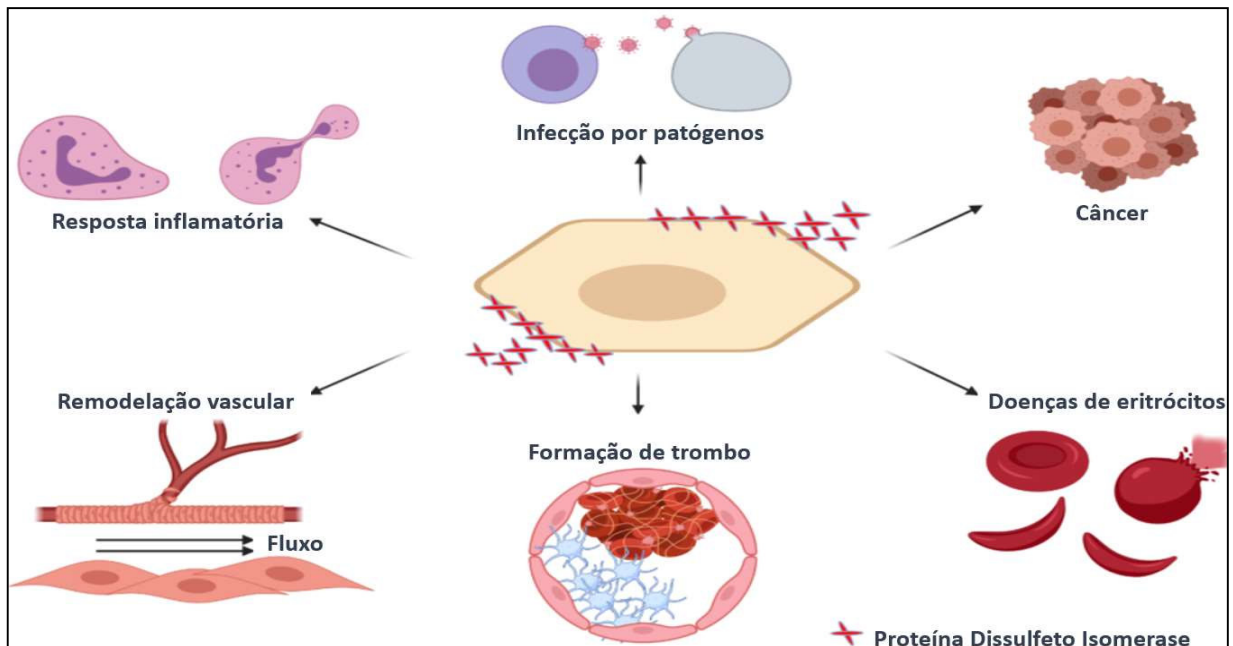


Figura 4: Papéis fisiopatológicos da superfície celular e da proteína dissulfeto isomerase extracelular. PDI na superfície celular e em compartimentos extracelulares constituem um pool único de tiol isomerase e oxidoreductase. As alterações das ligações dissulfeto por PDI nestes locais representam um novo mecanismo pelo qual a regulação redox de sulfidrilas críticas em diferentes componentes moleculares controla sinergicamente as atividades celulares e supracelulares sob várias condições fisiológicas e fisiopatológicas, incluindo, mas não se limitando a formação de trombo, progressão do câncer, infecção por patógenos, respostas inflamatórias, remodelação vascular e doenças eritrocitárias. **Fonte:** (XU, X. et al., 2021) adaptado.

Até o momento, vários agentes foram identificados para inibir as funções de PDI, isso inclui compostos sintéticos, antibióticos, metabólitos vegetais, anticorpos neutralizantes e hormônios (XU, S.; SANKAR; NEAMATI, 2014). Esses inibidores têm como alvo as cisteínas do sítio ativo, interferem com a interação PDI-substrato ou induzem mudança conformacional alostérica para amortecer a atividade da PDI (FLAUMENHAFT; FURIE; ZWICKER, 2015).

2.2. Regulação da PDI de superfície celular e seus efeitos fisiopatológicos

Em estudos recentes realizados por XU e colaboradores (2021) concluíram que a localização peculiar de PDI na superfície celular e compartimentos extracelulares confere papéis únicos em diferentes cenários fisiopatológicos e com o surgimento de novos substratos da PDI, o significado biológico e clínico da PDI extracelular será mais

apreciado pela compreensão do seu envolvimento na mediação de vias moleculares e progressão da doença. Um mecanismo comum que emerge de diferentes configurações fisiopatológicas é que a PDI extracelular comanda sinergicamente a regulação redox de sulfidrilas críticas de proteínas da superfície celular, alterando sua fisiologia.

A regulação positiva de PDI, foi documentada em várias células de câncer humano, incluindo ovário, próstata, pulmão, linfoma, glioma, leucemia mielocítica aguda e melanoma (GOPLIN et al., 2006). A PDI da superfície celular está associada a tumores invasivos e seu bloqueio, com anticorpos anti-PDI ou inibidores de PDI, reduziram a migração e invasão de células tumorais (Figura 5), mostrando a PDI da superfície celular como ativadora de vias apoptóticas induzidas por bloqueio da adesão celular mediada por integrinas de adesão (SLISKOVIC; MUTUS, 2006).

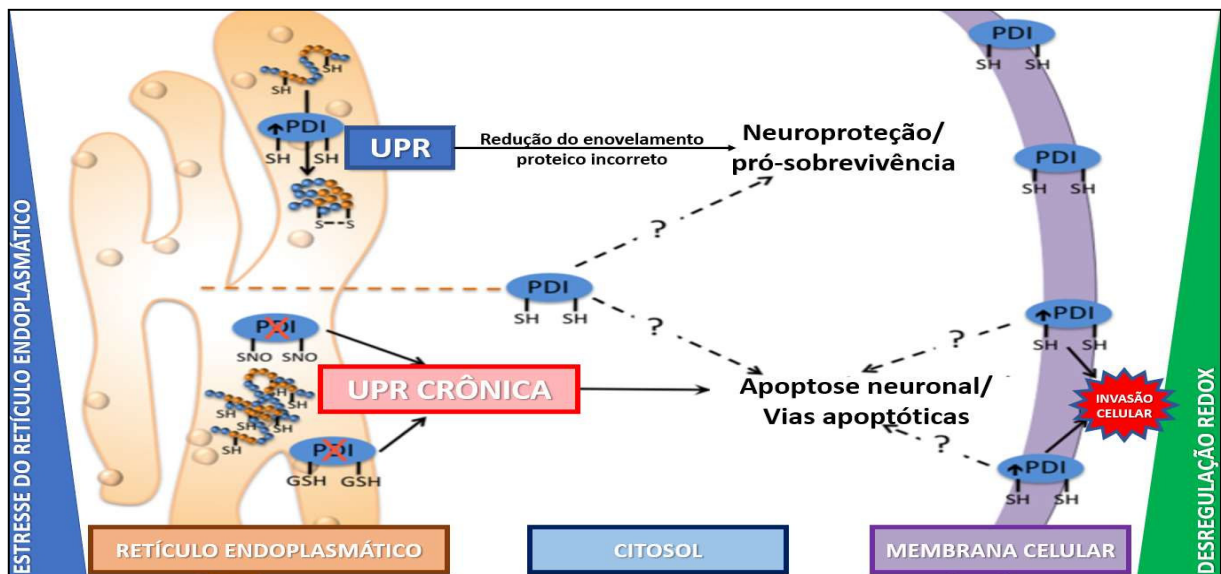


Figura 5: Os papéis protetores ou apoptóticos de PDI são regulados pela localização subcelular de PDI, ambiente redox e grau de estresse do retículo endoplasmático. Quando proteínas não dobradas/dobradas incorretamente se acumulam no lúmen do RE, o estresse do RE dispara a UPR. UPR transitente induz vias de sobrevivência celular, enquanto uma UPR prolongada induz vias apoptóticas. PDI medeia o dobramento adequado de proteínas. Sob estresse oxidativo ou nitrosativo (como visto em distúrbios neuronais), a S-glutathionilação ou S-nitrosilação de PDI inibe o dobramento de proteína normal e induz a ativação de estresses de RE. UPR prolongado contribui para o acúmulo de proteínas aberrantes e apoptose celular. Chaperonas luminais do RE localizados fora do lúmen do RE podem ter papéis pró-apoptóticos. No entanto, em algumas linhas celulares, a superexpressão de construtos de PDI sem a sequência de retenção KDEL RE aumentou a sobrevivência celular após a indução de estímulos apoptóticos. A expressão elevada de PDI de superfície celular está associada a tumores invasivos de alta geração, sugerindo que PDI de superfície celular pode ter função na mediação de vias apoptóticas. **Fonte:** (GREK; TOWNSEND, 2014) adaptado.

Em contrapartida, Inibidores da PDI permeáveis à membrana celular podem levar à inibição intracelular de PDI no RE e UPR (UPR - do inglês *unfolded protein response*), o que é necessário para os efeitos antineoplásicos de alguns inibidores de PDI (XU, S. et al., 2014). À medida que nosso conhecimento sobre os papéis fisiopatológicos da PDI extracelular continua crescendo, uma triagem e caracterização de novos inibidores seletivos para PDI extracelular estabelecerão as bases para o desenvolvimento terapêutico futuro para direcionar a PDI em mais condições de doença (XU, X. et al., 2021) com o direcionamento para a via de dobramento da proteína Ero1 α -PDI no câncer.

Mais recentemente, várias moléculas pequenas e compostos naturais foram identificados como novos inibidores de PDI, como os bepristats, uma classe de pequenas moléculas que visam reversivelmente o domínio **b'** de PDI foi identificada (BEKENDAM et al., 2016). Da mesma forma, ML359, um inibidor PDI reversível de segunda geração que tem como alvo o fragmento **b'x**, foi relatado como sendo 10 vezes mais potente do que a quercetina-3-rutinosídeo (FLAUMENHAFT et al., 2015). Outro exemplo recente de inibidor natural de PDI é a miricetina, um dos principais flavonoides encontrados na planta medicinal *Syzygium cumini*. A miricetina inibe PDI e ERp5, mas não ERp72 ou ERp57, potencialmente por meio de uma interação não covalente com o domínio catalítico da PDI ou ERp5 (GASPAR et al., 2019).

2.3. Inibidores da PDI

Estudos tem mostrado que os inibidores de PDI: (i) induzem ERO; (ii) acumulam ERO nos tecidos tumorais; (iii) mostram a eficácia *in vivo* em xenoenxertos em camundongos; e (iv) não apresentam toxicidade em animais. Portanto, acredita-se que a PDI é um alvo importante para tratamento antineoplásico (XU, S. et al., 2014). Uma série sintetizada de compostos de PACMA (ácido propinóico de carbamoilmetilamidas) demonstrou atividade citotóxica em câncer de ovário humano *in vitro* e *in vivo* por um mecanismo envolvendo a inibição de PDI (XU, S. et al., 2012). Inibidores da PDI de baixo peso molecular, que se ligam ao seu sítio ativo, mostraram ter potencial para melhorar a eficácia da quimioterapia no melanoma, pois a inibição da PDI nessas células induz a

sua apoptose (LOVAT et al., 2008) e inibe a invasão de células de glioma (GOPLIN et al., 2006). Evidências crescentes sugerem que a inibição da PDI tem um papel terapêutico contra a progressão do câncer (XU, S. et al., 2014).

A quercetina-3-rutinosídeo, um flavonoide naturalmente encontrado nas plantas, é identificado como um inibidor reversível de PDI (JASUJA et al., 2012), ele bloqueia o reconhecimento do substrato ligando-se ao fragmento **b'x** da PDI, inibindo assim sua atividade de oxidoredutase (LIN et al., 2015), além disso, a quercetina-3-rutinosídeo bloqueia seletivamente a PDI sobre outras tiol isomerases, como ERp57, ERp5 e ERp72. Dada a sua baixa permeabilidade da membrana, a quercetina-3-rutinosídeo tem como alvo predominantemente PDI extracelular e inibe a formação de trombos (JASUJA et al., 2012).

De forma semelhante ao da quercetina-3-rutinosídeo, o peptídeo sintético CxxCpep, mimético ao motivo catalítico da PDI (CGHC), se liga à cisteína 400 do domínio **a'** da PDI da superfície plaquetária ativada e promove atividade antiagregante plaquetária (SOUSA et al., 2017). PACMA 31 (carbamoil-metil-amidas de ácido propinóico) é um inibidor de PDI irreversível ao direcionar as cisteínas do sítio ativo no domínio **a'** (XU, S. et al., 2012), sendo permeável às células e induz citotoxicidade ao inibir a PDI intracelular para suprimir o crescimento do tumor ovariano. Avaliações mais abrangentes sobre os inibidores de PDI, suas estruturas e propriedades moleculares foram publicadas (FLAUMENHAFT et al., 2015; XU, S. et al., 2014).

Apesar do progresso substancial na descoberta de novos inibidores de PDI, o desenvolvimento terapêutico de inibidores reversíveis que são seletivos para PDI extracelular permanece um desafio. Em primeiro lugar, a estrutura altamente homóloga dos domínios TRX catalíticos compartilhados entre diferentes membros da família das tiol isomerase é um problema pois embora haja sobreposição funcional entre PDI extracelular e outras tiol isomerases em alguns cenários fisiopatológicos, como trombose (ESSEX; WU, 2018), um inibidor seletivo de PDI, mas não das outras tiol isomerases, seria útil para bloquear eventos que envolvem apenas PDI. Em segundo lugar, a permeabilidade celular associada a muitas pequenas moléculas inibidoras de PDI pode ser um risco pois, uma vez que PDI no espaço extracelular pode ser mais receptivo às

suas contrapartes intracelulares no ER, onde são enriquecidos em altas concentrações (FLAUMENHAFT et al., 2015), a inibição de PDI extracelular não requer permeabilidade celular ou alta dose de inibidor.

2.4. A miricetina e seus efeitos em células neoplásicas

A miricetina, um dos polifenois mais estudados, está presente em abundância em várias frutas e vegetais e apresenta diversas propriedades farmacológicas. A ação biológica multifacetada da miricetina contra a heterogeneidade do tumor torna-a um agente anticâncer impressionante, cuja eficácia foi confirmada por um número esmagador de estudos (BARZEGAR, 2016). A miricetina mostra seu potencial terapêutico ao direcionar e modular a expressão de vários alvos moleculares (Figura 6) que estão envolvidos na inflamação, proliferação celular, apoptose, angiogênese, invasão e metástase (DEVI et al., 2015). A miricetina impede a progressão do tumor induzindo a apoptose por via intrínseca e extrínseca, ativando/inativando várias vias de sinalização e reativando vários genes supressores de tumor (STOLL et al., 2019). Além disso, a biodisponibilidade aumentada de miricetina por meio de conjugação e sua eficácia aumentada como um agente anticâncer quando usado em combinação também são destacadas (HASSAN et al., 2017).

A miricetina tem o potencial de direcionar vários eventos para obstruir a progressão do tumor, induzir a morte celular e prevenir metástases conforme estabelecido de estudos *in vitro*. Com a pesquisa em andamento sobre a miricetina, estão surgindo novas moléculas derivadas da miricetina através de ensaios *in silico* (JIANG et al., 2019) e alvo que levarão a quimioprevenção ao próximo nível no tratamento do câncer (AFROZE et al., 2020). Mas ainda há um número limitado de estudos disponíveis para validação de seus efeitos *in vitro* no modelo *in vivo*. A miricetina foi considerada eficaz e mostrou sinergismo com vários outros polifenois, bem como quimioterápicos quando usados em combinação (AMARARATHNA; JOHNSTON; RUPASINGHE, 2016).

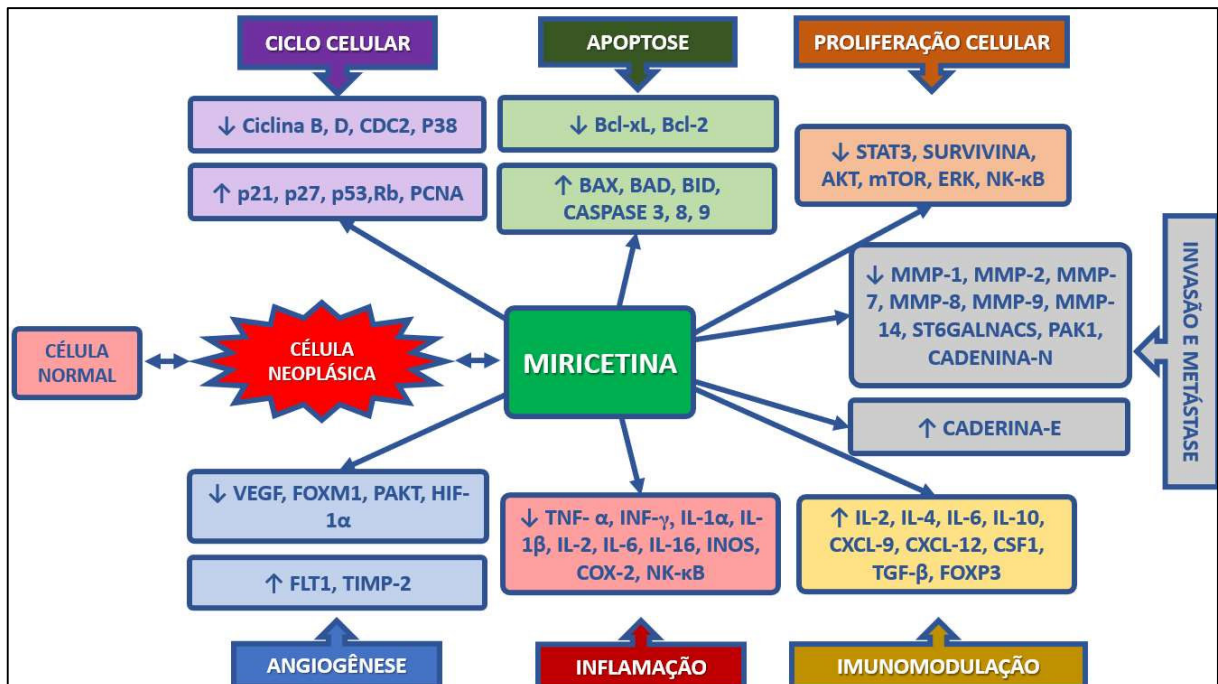


Figura 6: A miricetina afeta as células cancerígenas modulando a expressão de vários alvos moleculares. A miricetina altera a regulação de proteínas que controlam a atividade de várias características do câncer, como angiogênese, proliferação celular, inflamação, ciclo celular, apoptose, metástase e imunomodulação. Fonte: (AFROZE et al., 2020). Adaptado.

No entanto, mais estudos precisam ser executados para avaliar seu índice quimioterápico, melhorar sua biodisponibilidade e solubilidade aquosa que limitam a aplicação da miricetina como um agente anticâncer em testes *in vivo*, bem como o perfil de toxicidade da miricetina contra células normais precisa ser mais explorado (NOWAK; OLECH; NOWACKA, 2014). Mesmo que existam rotas alternativas para aumentar sua entrega e melhorar sua biodisponibilidade, ou seja, a inclusão de HP-β-CD/miricetina e forma encapsulada (YAO et al., 2014), mais estratégias precisam ser desenvolvidas para otimizar a entrega e avaliar a farmacocinética para melhorar seu potencial terapêutico (AFROZE et al., 2020). Uma estratégia que vem ganhando destaque é a exploração de seu efeito inibitório sobre a PDI de superfície celular que regula as integrinas adesivas de células tumorais e, consecutivamente, indução da apoptose (SUYENAGA et al., 2014).

Sob o aspecto molecular, a inibição da PDI superficial e extracelular incluem (mas não se limitam) a transporte de espécies redox ativas e dissociação de complexos de proteínas, regulação da proteólise, controle alostérico de receptores de adesão,

principalmente a classe de selectinas, integrinas adesivas e proteínas de matriz. São necessárias mais investigações para caracterizar as interações PDI-proteínas de adesão no contexto de condições fisiopatológicas e sua relevância clínica (XU, X. et al., 2021).

2.5. Integrinas adesivas e seus mecanismos de regulação celular

A invasão das células tumorais circulantes depende de sua capacidade de se anexar ao endotélio vascular de diferentes órgãos distantes e essas interações são suportadas por moléculas de adesão embutidas na membrana celular. Duas famílias ganham protagonismo como moléculas cruciais na adesão celular envolvidas da invasão de células tumorais e metástase, a saber: (i) as selectinas (LÄUBLI; BORSIG, 2010) e (ii) integrinas (DESGROSELLIER; CHERESH, 2010). As integrinas são receptores de glicoproteínas responsáveis pela fixação das células às proteínas da matriz extracelular (MEC do inglês *Extracellular Matrix*), como a fibronectina, fibrinogênio, vitronectina, lamininas, colágenos, plasminogênio, osteopontina e fator de von Willebrand (PLOW et al., 2000).

A ligação celular dependente das integrinas às proteínas MEC inicia a ativação das vias de sinalização que regulam o comportamento e a motilidade das células (HEGERFELDT et al., 2002). Entre as diferentes integrinas, são principalmente as expressões de $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 5$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ e $\alpha 6\beta 4$ que estão associadas à progressão metastática em melanoma, carcinoma de mama, próstata, pâncreas e câncer de pulmão (DESGROSELLIER; CHERESH, 2010). Apesar das funções que desempenham no contato com as proteínas da MEC, as integrinas são importantes mediadores da adesão celular a ligantes extracelulares e podem transduzir sinais bioquímicos para dentro (*outside in*) e para fora (*inside out*) das células e regular mecanismos de sobrevivência e apoptose (Figura 7).

Os domínios citoplasmáticos das integrinas interagem com diversas proteínas estruturais e de sinalização e conseqüentemente participam da regulação da forma, motilidade, crescimento e diferenciação celular (WIERSMA et al., 2015). Células de câncer de mama altamente metastáticas (MDA-MB-231), expressam níveis mais elevados de $\alpha 2\beta 1$ em comparação com células de câncer de mama não invasivas MCF-

7 (TAHERIAN et al., 2011). Além disso, $\alpha\beta 1$ simula a ligação de MDA-MB-231 às células endoteliais, promovendo a fosforilação de VE-Caderina e a dissociação de β -catenina do complexo VE-Caderina (Figura 8). Este processo está envolvido na interação célula-célula e pode ser promovido pela cascata de sinalização H-Ras/Raf/MEK/ERK. Foi sugerido que a diferença na expressão da integrina de $\alpha\beta 1$ é uma das inúmeras características responsáveis pelo caráter altamente metastático do MDA-MB-231 (HAIDARI et al., 2012).

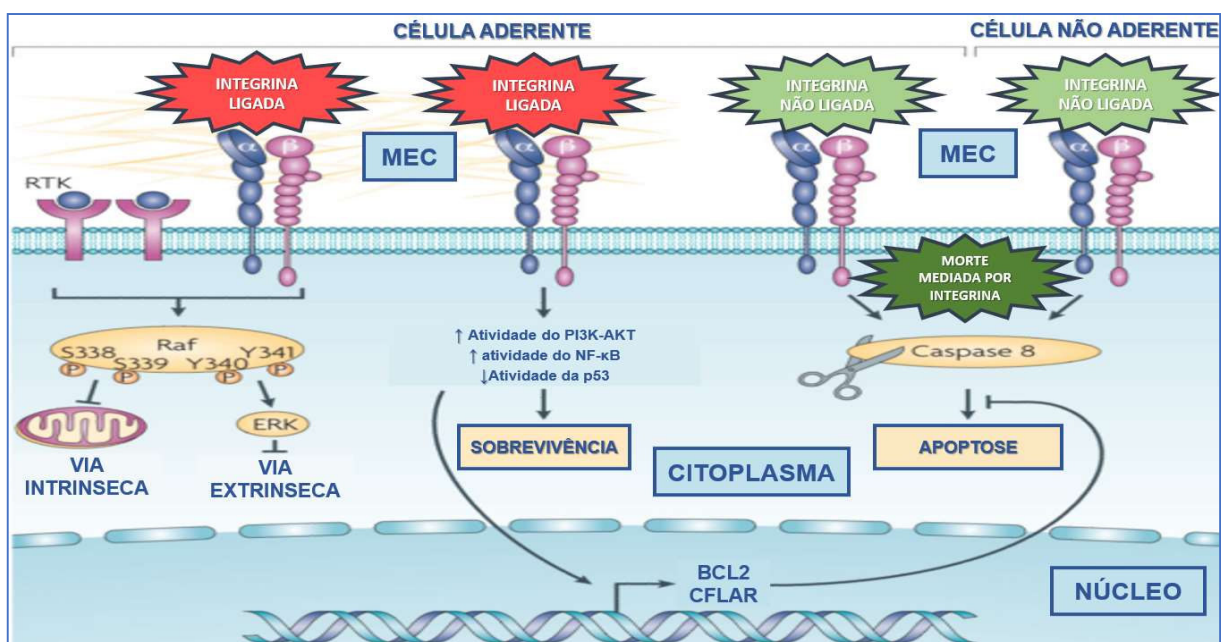


Figura 7: Sobrevivência mediada por integrina versus vias apoptóticas. As integrinas podem, paradoxalmente, iniciar sinais pró-sobrevivência, bem como pró-apoptóticos. A via mais ativa depende do estado de ligação das integrinas de superfície expressas por uma determinada célula. Em uma célula na qual a maioria das integrinas estão ligadas, uma via pró-sobrevivência é iniciada através do aumento do fator nuclear- κ B (NF- κ B) ou atividade PI3K-AKT, diminuição da ativação de p53 e aumento da expressão das moléculas pró-sobrevivência BCL-2 e FLIP (também conhecido como CFLAR). A sinalização cooperativa entre os receptores do fator de crescimento e as integrinas também ativa o Raf diferencialmente, levando a mecanismos distintos de sobrevivência celular. A sinalização através da integrina $\alpha\beta 3$ e do receptor do fator de crescimento de fibroblastos promove a fosforilação de Ser338 e Ser339 de Raf, protegendo as células da via intrínseca de apoptose, e a integrina $\alpha\beta 5$ e o receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular fosforilam Tyr340 e Tyr341 de Raf, evitando a apoptose pela via extrínseca. Em células aderentes nas quais muitas das integrinas não estão ligadas, as integrinas não ligadas iniciam a clivagem da caspase 8, desencadeando a apoptose através da morte mediada por integrina (MMI). Na perda completa de adesão, a morte celular é iniciada por meio de um processo denominado *anoikis*. A apoptose induzida por *anoikis* pode prosseguir pelas vias intrínsecas ou extrínsecas. Matriz extracelular (MEC); Receptor Tirosina Quinase (RTK), desencadeiam a apoptose através da morte mediada por integrina (MMI). Na perda completa de adesão, a morte celular é iniciada por meio de um processo denominado *anoikis*. **Fonte:** (DESGROSELLIER; CHERESH, 2010) adaptado.

A natureza invasiva do MDA-MB-231 também pode estar relacionada à expressão da integrina $\alpha V\beta 3$, que é muito pouco expressa no MCF-7 (TAHERIAN et al., 2011). A integrina $\alpha V\beta 3$ demonstrou estar envolvida no crescimento e na capacidade de invasão do melanoma pulmonar metastático (FILARDO et al., 1995), câncer de mama (FELDING-HABERMANN et al., 2001) e câncer de próstata (MANES et al., 2003). Em células MDA-MB-231, $\alpha V\beta 3$ desempenha um papel importante na adesão celular e ativação dependente da tensão de cisalhamento de $\alpha V\beta 3$, a integrina leva à imitação do sinal PI3K/AKT, resultando consequentemente na superexpressão de MMP-2, MMP-9 e VEGF. Um efeito semelhante pode ser observado na presença de plaquetas ativadas por trombina (ZHAO et al., 2014).

As integrinas também estão envolvidas nas interações entre as células cancerígenas e as plaquetas, que é outro estágio importante do processo metastático (DARDIK et al., 1998), gerando uma camada protetora de plaquetas ao redor da massa de células metastáticas, evitando o reconhecimento imune das células neoplásicas pelas células NK e linfócitos TCD8 positivas, um importante mecanismo de destruição de células tumorais pelo sistema imune (MENTER et al., 2017).

As células tumorais circulantes reengajam plaquetas adicionais, o que facilita a adesão parada e extravasamento das células tumorais e metástases, mediadas pelas integrinas $\alpha IIb\beta 3$ plaquetária e $\alpha V\beta 3$ de células tumorais (MDA-MB-231), intercalados por uma molécula de fibrinogênio (Figura 8). Este processo, junto com os estados hipercoaguláveis associados à malignidade, é amplificado pela produção de IL-6 em tumores que estimulam a produção de trombopoietina no fígado e elevam o número de plaquetas circulantes por trombopoiese na medula óssea. Essas interações complexas e o papel de "primeira resposta" das plaquetas durante diversos estresses fisiológicos fornecem um alvo terapêutico útil que merece uma exploração mais aprofundada

A ativação das integrinas são intensamente influenciadas pelas isomerizações de pontes dissulfeto, demonstrado nos receptores $\alpha V\beta 3$ (SWIATKOWSKA et al., 2008), $\alpha IIb\beta 3$ (SWIATKOWSKA et al., 2010) $\alpha 11$ (POPIELARSKI et al., 2018) e $\beta 1$ (CHEN et al., 2015). A ativação dessas integrinas pode ser desencadeada por modificações das ligações dissulfeto extracelulares. Este processo é promovido pela PDI ou pelas próprias

integrinas, uma vez que alguns receptores de integrina têm uma atividade de tiol isomerase endógena (ZHU, G. et al., 2017).

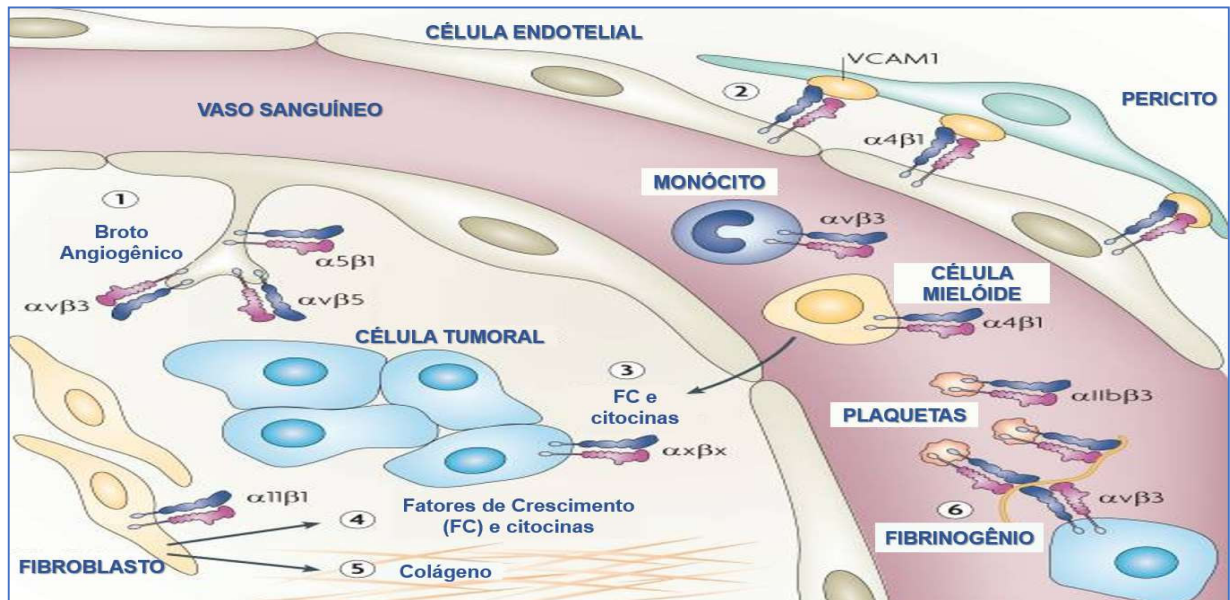


Figura 8: Integrinas na resposta do hospedeiro ao câncer. As integrinas expressas em muitos tipos de células associadas a tumores têm papéis cruciais no aumento da progressão e metástase do tumor. Nas células endoteliais, as integrinas regulam a migração, proliferação e sobrevivência necessárias para a angiogênese (etapa 1). A interação entre pericitos e células endoteliais é crucial para a estabilização dos vasos neoformados durante a angiogênese. A ligação da integrina $\alpha 4 \beta 1$ em células endoteliais à molécula de adesão de células vasculares 1 (VCAM1) em pericitos desempenha um papel importante no recrutamento de pericitos para a neovascularização (etapa 2). Células mielóides e monócitos em tumores primários contribuem para a progressão da doença pela secreção de citocinas e fatores de crescimento (GFs) que iniciam a angiogênese e a migração de células tumorais (etapa 3). Vários estudos demonstraram que as integrinas têm um papel essencial no direcionamento de células mielóides e monócitos a tumores. A infiltração de fibroblastos no tumor primário, conhecida como desmoplasia, também contribui para a progressão do tumor por meio do aumento da secreção do fator de crescimento (etapa 4). Além disso, os fibroblastos invasores depositam grandes quantidades de colágeno que pode resultar em resistência à terapia em alguns tumores (etapa 5). Um estudo recente mostrou que integrinas, como $\alpha 11 \beta 1$, são reguladores cruciais da secreção de fator de crescimento por esses fibroblastos. A expressão plaquetária de $\alpha 11 \beta 3$ pode ser importante para interagir com as células tumorais através de uma ponte de fibrinogênio, possivelmente auxiliando na disseminação metastática (etapa 6). **Fonte:** (DESGROSELLIER; CHERESH, 2010) adaptado.

Popielarski e colaboradores (2019) analisaram três linhas de células cancerígenas: MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231 foram analisadas para explorar o papel das trocas de tiol-dissulfeto na adesão e migração do câncer de mama para o endotélio. O efeito de bloqueio de inibidores de PDI e bloqueadores de tiol livre na adesão e migração do câncer de mama sugere que PDI ou talvez outras dissulfeto isomerases

semelhantes à tioredoxina estão envolvidas na metástase do câncer de mama mediada por integrinas (POPIELARSKI et al., 2019).

2.6. Metástase de Células Cancerígenas

Uma vez que o tumor foi estabelecido e progrediu de forma eficaz, o próximo passo natural é desenvolver metástase. A metástase é um processo formado por uma sequência complexa de eventos envolvendo múltiplas interações entre células cancerígenas e outros tipos celulares e biomoléculas encontradas no microambiente tumoral, que é delimitado pela MEC. Dentre a diversas interações, se destacam a interação mútua das células cancerígenas, com células endoteliais e plaquetas (BURR et al., 2020; MASSAGUÉ; OBENAU, 2016).

Os tumores sólidos têm sido associados à formação de trombos, embora a patogênese dessa associação não tenha sido totalmente elucidada e seja provavelmente diversa. Sabe-se que os êmbolos de células tumorais na corrente sanguínea não são formados apenas por células neoplásicas, mas também por plaquetas e fibrina, com as quais formam um complexo (ARORA et al., 2017).

As células cancerígenas também podem formar estruturas de membrana celular na forma de protuberâncias dinâmicas ricas em actina, chamadas invadopódios, que lhes conferem motilidade. Além do núcleo de actina, os invadopódios contêm outras proteínas relevantes, como contractina, cofilina, talinas, vinculinas e integrinas, (ALBIGES-RIZO et al., 2009). Eles também contêm várias enzimas MMP, como MMP-2 e MMP-9 e proteínas da família ADAM que podem degradar a matriz extracelular e penetrar no estroma da MEC circundante e nas membranas basais, uma etapa essencial no processo metastático (JACOB; PREKERIS, 2015). O ativador dessas alterações na membrana celular é a ligação inicial à MEC e os fatores que regulam a formação de invadopódios dentro do tumor que incluem fatores de crescimento, hipóxia, quimiocinas, atividade enzimática degradante e receptores de adesão (MASI et al., 2020).

A metástase começa quando as células cancerígenas invadem a matriz extracelular do tumor e migram para locais distantes através dos vasos sanguíneos ou linfáticos após a quebra desse tecido adjacente (FARES et al., 2020). As células cancerígenas migratórias já passaram por um processo no qual perdem suas junções intracelulares e polaridade apical, mudando morfológicamente para um tipo mesenquimal e adquirindo novas capacidades metabólicas e funcionais invasivas. Este processo é chamado de Transição Epitelial-Mesenquimal (TEM). Gandalocová e colaboradores demonstraram que as células cancerígenas têm contato com as plaquetas, bem como elas suportam a TEM das células às qual as plaquetas fazem contato (GANDALOVÍČOVÁ et al., 2016).

Outro estudo mostrou que as células cancerígenas só foram geradas quando as plaquetas foram liberadas e que as assinaturas de expressão gênica associadas à TEM e à progressão do tumor foram enriquecidas. Esses mesmos autores demonstraram por microscopia eletrônica que as células tumorais que entram em contato direto com as plaquetas podem incorporar partes delas, incluindo o Complexo de Histocompatibilidade Maior de classe I (MCH do inglês *Major Histocompatibility Complex*) e integrinas plaquetárias como a $\alpha\text{IIb}\beta 3$ e $\alpha\text{V}\beta 3$ (LABELLE; BEGUM; HYNES, 2011).

Um estudo mais recente demonstrou que o contato direto entre plaquetas isoladas de pacientes com câncer gástrico avançado e células tumorais de câncer gástrico induziu processos de migração, invasão, adesão e expressão de MMP-9 em células tumorais. Agregados plaquetários extravasados foram evidenciados em partes invasivas de amostras clínicas de biópsias de câncer pancreático humano. Esses agregados estão associados a marcadores para os primeiros passos da TEM, como o aumento da expressão de Snail1 e a redução da E-caderina. Ishikawa e colaboradores relataram que em 60% das amostras de uma coorte japonesa de pacientes com câncer de mama HER-2 negativo (amostras de biópsia), as plaquetas foram encontradas diretamente ao redor das células tumorais primárias e que essas células tumorais mostraram a expressão de marcadores de TEM (SAITO et al., 2021)

Graças ao revestimento de plaquetas nas Células Tumorais Circulantes (CTCs), a TEM pode ocorrer através do contato direto entre receptores e ligantes que se

encontram na superfície da membrana de ambas as células, como a integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ - $\alpha\text{V}\beta 3$ e com a P-selectina plaquetária (Figura 10). Uma vez que os CTCs conseguem sobreviver no sistema circulatório com a ajuda das plaquetas, eles cumprem o objetivo de criar focos metastáticos. As plaquetas suportam o processo de angiogênese por meio de fatores como o VEGF-A expresso nas plaquetas. As interações entre plaquetas e células tumorais desencadeia a ativação plaquetária pela integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$, onde pode se ligar ao fibrinogênio, fibrina ou vWF (DURÁN-SÁENZ et al., 2022).

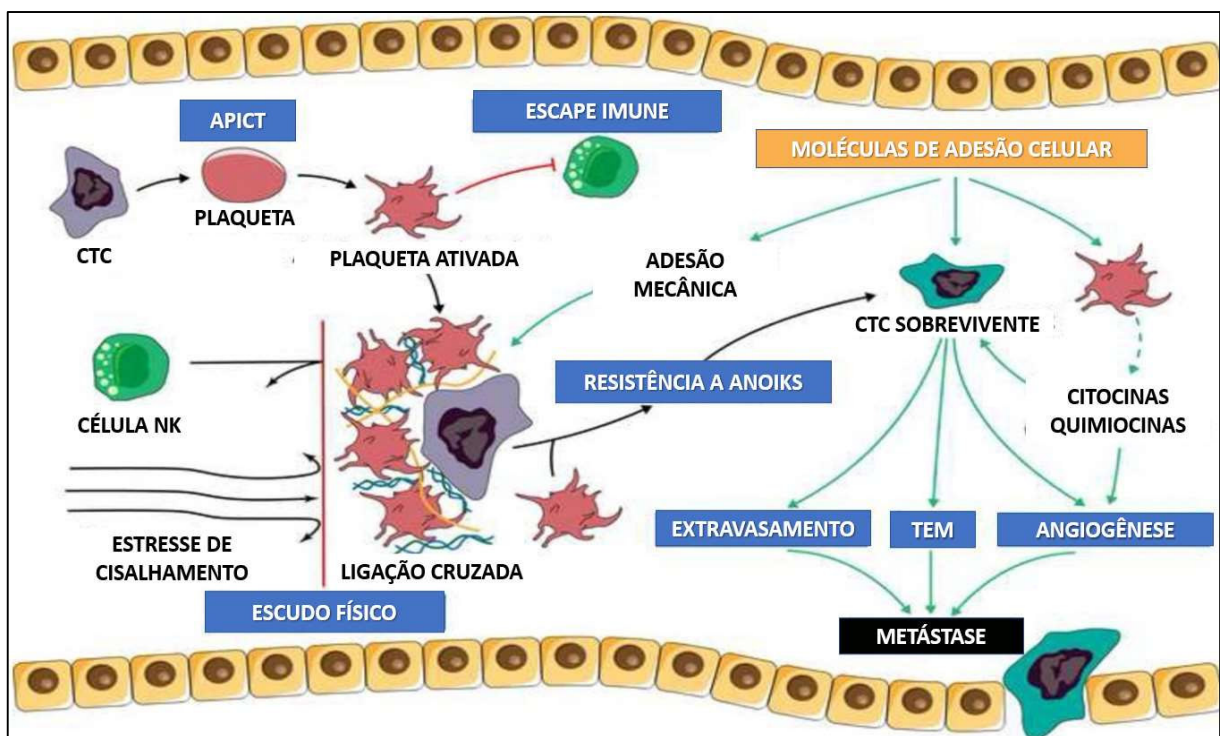


Figura 10: As Células Tumorais Circulantes (CTCs) induzem a Ativação Plaquetária Induzida por Células Tumorais (APICT). e as plaquetas ativadas reúnem e protegem as CTCs do estresse de cisalhamento e das células natural killer. Finalmente, as plaquetas estimulam a resistência ao CTC *anoikis*, transição epitelial-mesenquimal, angiogênese, extravasamento e, eventualmente, metástase. **Fonte:** (LIU et al., 2021) adaptado.

Para que a vasculatura prolifere no tumor, é necessária a proliferação de células endoteliais, que são dependentes de VEGF-A. O regulador primário do VEGF-A são as plaquetas que desempenham um papel crítico na angiogênese e no extravasamento de células cancerígenas no sistema circulatório (VAN ZIJL; KRUPITZA;

MIKULITS, 2011). Uma vez que as células cancerígenas atingem a morfologia mesenquimal, sua passagem entre a camada endotelial da vasculatura tumoral e o lúmen vascular é muito mais fácil. Esta etapa de extravasamento é suportada pela sinalização localizada e transitória de TGF- β e pela expressão de VEGF por plaquetas e seus receptores em células tumorais (CHIANG; CABRERA; SEGALL, 2016).

Quando as células cancerígenas conseguem entrar na corrente sanguínea, as plaquetas são seu principal mecanismo de defesa contra a força de cisalhamento e o sistema imunológico circulante (figura 11), principalmente as natural killers (DASGUPTA; LIM; GHAJAR, 2017). A forma como as plaquetas cobrem a CTC começa com o reconhecimento entre os receptores e os ligantes encontrados na superfície da membrana de ambas as células (LOU et al., 2015; MENDOZA-ALMANZA et al., 2020).

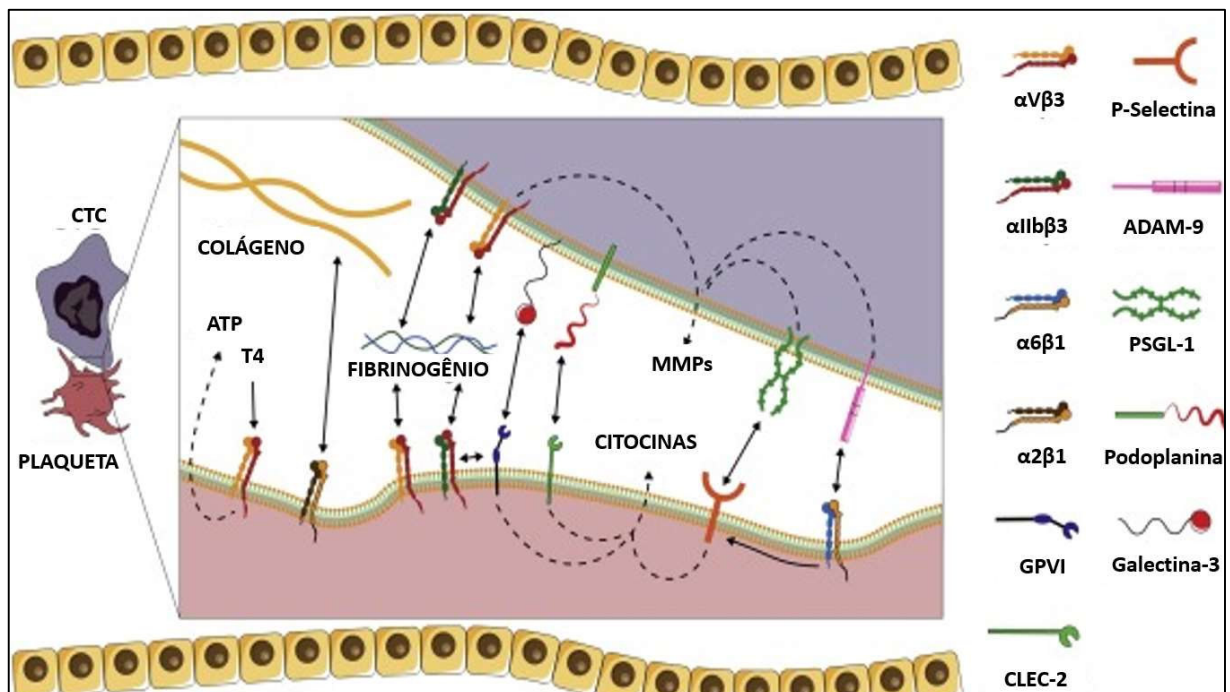


Figura 11: Moléculas de Adesão Celular (MAC) contribuem para a metástase. As MACs promovem metástases das seguintes maneiras: 1. medeiam a adesão mecânica entre plaquetas e entre plaquetas e CTCs, como integrina, $\alpha V\beta 3$, $\alpha IIb\beta 3$, $\alpha 2\beta 1$ e GPVI; 2. promover a degranulação plaquetária para liberar citocinas ou ATPs, como GPVI, podoplanina, P-selectina e $\alpha V\beta 3$; e 3. promover CTC para regular positivamente os genes associados à metástase e liberar metaloproteinases da matriz (MMPs), como $\alpha V\beta 3$, $\alpha 6\beta 1$ e P-selectina. **Fonte:** (LIU et al., 2021) adaptado.

As plaquetas transferem moléculas de MHC classe I para a superfície da célula tumoral através do eixo GARP/TGF β para evitar o ataque do sistema imunológico às CTC. Este revestimento de CTCs por plaquetas pode formar micro coágulos intravasculares. Todos os fatores conferidos pela plaqueta para a CTC proporcionam firmeza na proliferação celular e na formação de vasos sanguíneos no microambiente tumoral (LIU et al., 2021).

Uma vez que as CTCs tenham conseguido sobreviver no sistema circulatório com a ajuda das plaquetas (Figura 10), eles devem cumprir o objetivo de criar focos metastáticos, de modo que devem deixar o sistema sanguíneo e semear um segundo tumor metastático (LIU et al., 2021). As plaquetas estimulam o extravasamento liberando ATP de seus grânulos densos após a ativação, que modula as junções endoteliais e o citoesqueleto endotelial para induzir a quebra da barreira endotelial (STRILIC; OFFERMANN, 2017). Por fim, com toda a assistência recebida das plaquetas, as CTC colonizam os locais dos tumores secundários.

Desta forma, o presente trabalho levanta a hipótese que a inibição da PDI pode ser um mecanismo potencial de atividade antitumoral, evitando o escape tumoral por indução de apoptose nas células neoplásicas induzidas pelo estresse oxidativo, redução da adesão celular e interação plaqueta-célula tumoral em metástase. Diante disso, utilizamos linhagens tumorais humanas de células mamárias, a saber: células epiteliais de tecido mamário MCF-10 (não tumorigênica), células tumorais das linhagens de câncer de mama MCF-7 (ER positiva), e MDA-MB-231 (triplo-negativa e invasivas) em culturas 3D, avaliando o impacto produzido pela inibição da PDI na viabilidade celular e adesão celular, interação célula tumoral-plaqueta e avaliação da produção de H₂O₂ e NO associados aos mecanismos de apoptose.

CAPÍTULO 2 - TESE EM MODELO TRADICIONAL

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Investigar o efeito antitumoral através do mecanismo de inibição da PDI induzindo o estresse oxidativo em modelo de microambiente tumoral.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a capacidade de indução de morte da miricetina em células tumorais
Estratégia de investigação: Avaliação de citotoxicidade aguda, subaguda e crônica em cultura de células de câncer de mama por MTT.
- Estabelecer o modelo de microambiente com linhagem humana normal e tumoral.
Estratégia de investigação: Aplicação de modelo de cultura de células 3D.
- Aferir a produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio.
Estratégia de investigação: Sobrenadante das culturas das células para análise colorimétrica de H_2O_2 e NO.
- Determinar o impacto na interação de plaquetas com células tumorais pelo tratamento com a miricetina.
Estratégia de investigação: Avaliar microscopicamente a relação de plaquetas aderidas às células tumorais, tratadas ou não com miricetina.
- Determinar o nível de apoptose e autofagia em células tumorais e suas contrapartes normais após inibição por miricetina.
Estratégia de investigação: Determinação das células apoptóticas por marcação da fosfatidilserina pelo indicador Anexina V e determinação da autofagia com a marcação por laranja de acridina por citometria de fluxo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Manutenção das linhagens celulares

As linhagens humanas de células epiteliais de tecido mamário não tumorigênica (MCF10), células tumorais das linhagens de câncer de mama MCF-7 (ER positiva) e MDA-MB-231 (triplo-negativa) e invasiva, foram mantidas conforme as especificações descritas pela Coleção de Culturas Celulares Americana (*American Type Culture Collection-ATCC*). De forma geral, as células foram mantidas em frasco de poliestireno de 75 e 150 cm², em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) a 10%, incubadas a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂. No período de confluência as células foram tripsinizadas, contadas, determinada a viabilidade e concentrações ajustadas para uso em ensaios subsequentes.

4.2. Cultura 2D

Após uma confluência celular adequada, de acordo com as recomendações da ATCC, as células cultivadas foram transferidas da garrafa de cultivo para uma placa de 96 poços de fundo chato, que foi utilizada para a cultura da suspensão de células tumorais, com uma concentração inicial ajustada para 5x10⁴ células por poço. Após o período de 24 horas necessário para a adesão celular em monocamada no fundo do poço, os grupos de poços foram tratados com concentrações crescentes de miricetina (3, 10, 30 e 100 µM), comparados com o grupo controle de morte (CP-DMSO 10%) e não tratado (CN). O efeito citotóxico de curto, médio e longo prazo foram avaliados com a exposição das células por períodos de 24, 48 e 72 horas ao tratamento, respectivamente. O número total de células vivas foi estimado usando o ensaio de MTT.

4.3. Cultura 3D

Para o estabelecimento da cultura 3D foi usado o modelo esferoide tumoral multicelular 3D e executado conforme descrito por Friedrich e colaboradores (FRIEDRICH et al., 2009), com modificações. Ao fundo de cada poço da placa uma

camada de gel de agarose a 2% em placa de 96 poços, no volume de 50 µL/poço. Para a padronização da densidade celular, as linhagens foram cultivadas isoladamente, como monoesferoides, nas densidades de 5×10^4 células/mL. As células foram cultivadas por quatro dias em atmosfera de 5 % de CO₂ a 37°C para a formação dos esferoides. Após esse período, com os esferoides já formados, os poços foram fotografados no microscópio Nikon Eclipse TS100 nos aumentos de 40 e 100x. Após mais três dias (fase de estabilização) os esferoides foram novamente fotografados, tripsinizados ou fixados e o sobrenadante celular foi armazenado em freezer -80°C até a realização das análises (SALEH, 2017).

4.4. Tratamento da Cultura 3D

Durante o processo de estabelecimento da cultura 3D, foram empregados dois tratamentos distintos: (i) tratamento no dia zero (dia de montagem da placa) com meio acrescido de miricetina em concentrações finais de 3, 10, 30 e 100 µM, além do controle positivo de morte (DMSO 10%), com o objetivo de verificar o impacto do bloqueio da PDI na formação das ligações entre proteínas adesivas e seus substratos na formação dos esferoides (ii) tratamento no dia quatro (início da estabilização do esferoide) com meio acrescido de miricetina em concentrações finais de 3, 10, 30 e 100 µM, além do controle positivo de morte (DMSO 10%), com o objetivo de verificar o impacto do bloqueio da PDI na estabilização das ligações entre proteínas adesivas e seus substratos.

4.5. Avaliação dos esferoides

4.5.1. Contagem dos esferoides: A contagem dos esferoides foi realizada pelas imagens da cultura no quarto e sétimo dia de cultivo no microscópio Nikon Eclipse Ti-U nos aumentos de 40 e 100x. A contagem dos esferoides foram realizadas utilizando o *software* ImageJ (Wayne Rasband do *National Institute of Health, USA*).

4.5.2. Diâmetro e morfologia dos esferoides: A avaliação do crescimento dos esferoides foi realizada pelas imagens da cultura para analisar a área e o diâmetro das estruturas no quarto e sétimo dia de cultivo microscópio Nikon Eclipse Ti-U nos aumentos de 40 e 100x. A análise do diâmetro e da morfologia dos esferoides foram realizadas utilizando o *software* ImageJ (Waine Rasband do *National Institute of Helth,USA*)

4.5.3. Viabilidade: Após sete dias de cultivo os esferoides foram dissociados por tripsinização e as células dissociadas foram marcadas com iodeto de propídio. Para o controle positivo foi adicionado DMSO 10% no meio de cultura. A análise foi realizada por citometria de fluxo (HSUCHEN; FEINGOLD, 1973; WEN et al., 2013; WENG et al., 2012).

4.6. Análise da interação plaquetas-células tumorais

Foram usados Plasma Rico em Plaquetas (PRP) com concentração ajustada para $2,5 \times 10^4$ plaquetas/mm³ de voluntários autodeclarados saudáveis e isentos de uso de anti-inflamatórios por, no mínimo 10 dias, para o co-cultivo com células de linhagens de câncer de mama em placas de 96 poços. Após o tempo de exposição entre células de 1 hora e administração ou não com miricetina, os poços foram fotografados e seus sobrenadantes separados para análises posteriores de interação plaqueta-célula tumoral e produção de H₂O₂ e NO.

A divisão dos grupos experimentais, como descrito acima, teve a finalidade de responder se as plaquetas, as células tumorais ou ambas, teriam sua capacidade adesiva comprometida sob o efeito da miricetina, nas doses descritas acima. Os resultados foram gerados com a contagem das células tumorais visualizadas em cada campo de cada poço, bem como as respectivas plaquetas aderidas nas células tumorais, gerando uma relação plaquetas aderidas/células tumorais.

4.7. Análise da produção de H₂O₂ nas células em cultivo

O teor de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi quantificado de acordo com a metodologia proposta por ALEXIEVA et al. 2001 (ALEXIEVA et al., 2001). Para a quantificação foi utilizado uma alíquota de 45 μL do extrato mais o meio de reação, composto por tampão fosfato de potássio 10 mM (pH7,0) e iodeto de potássio 1 M. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 390nm. O teor de H_2O_2 foi obtido por meio de cálculos, baseados na curva padrão de peróxido de hidrogênio.

4.8. Análise da produção de NO nas células em cultivo

Para a dosagem do óxido nítrico, foi utilizada a reação colorimétrica de Griess (GRIESS, 1879), que consiste na detecção de nitrito (NO^{2-}), resultante da oxidação do NO nos sobrenadantes de cultura previamente coletados. Adicionou-se à uma placa de ELISA de 96 poços, 50 μL do sobrenadante de cultura em quadruplicata, seguido do mesmo volume do reagente de Griess. Para a confecção de uma curva-padrão, uma solução de nitrito de sódio na concentração inicial de 200 μM passou por diluições seriadas. Após incubação de 1 hora ao abrigo da luz, a leitura no espectrofotômetro foi realizada a 570nm.

4.9. Análise estatística

Os resultados quantitativos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média de 3 a 6 experimentos independentes por protocolo. Foram realizados testes paramétricos (One way ANOVA) e pós teste de comparações múltiplas de Turkey e correção de Bonferroni para comparações múltiplas, considerado significativo quando $p < 0,05$. Toda a análise estatística foi feita utilizando o programa GraphPad Prism 8.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Viabilidade celular em ensaios de MTT

O efeito da inibição da PDI por miricetina na viabilidade de linhagens humanas de células epiteliais de tecido mamário não tumorigênica (MCF-10), células tumorais das linhagens de câncer de mama MCF-7 (ER positiva) e MDA-MB-231 (triplo-negativa) e invasiva, foi avaliado expondo as células a concentrações de miricetina de 3, 10, 30, 100 e 300 μM , em placas de 96 poços por 24 horas (efeito citotóxico agudo), 48 horas (efeito citotóxico subagudo) e 72 horas (efeito tóxico crônico).

A citotoxicidade aguda, de forma dose-dependente, não foi evidenciada em linhagens de células humanas de tecido mamário normal MCF-10 ($\text{IC}_{50} = 0,003 \mu\text{M}/\text{IC}_{90} = \text{n.a.}$), houve uma redução da viabilidade dos tratamentos quando comparado ao controle negativo, mas não houve diferença estatística entre os tratamentos, diferente das linhagens humanas de células de tecido mamário neoplásicas MCF-7 ($\text{IC}_{50} = 696,8 \mu\text{M}/\text{IC}_{90} = \text{n.a.}$) e MDA-MB-231 ($\text{IC}_{50} = 13,45 \mu\text{M}/\text{IC}_{90} = 81,74 \mu\text{M}$) apresentaram no tratamento agudo, uma citotoxicidade evidente (Figura 12), condizente com os dados dos estudos de Knickle e colaboradores (2018) que comprovaram a inefetividade da miricetina em promover danos e pouca citotoxicidade em células normais de tecido mamário e sua grande citotoxicidade em células de câncer de mama triplo negativas (MDA-MB-231), sendo seu efeito comparável ao galato de epigallocatequina e doxorubicina, e maior do que o resveratrol e a cisplatina (KNICKLE et al., 2018). Esses resultados corroboram com dados da literatura (POPIELARSKI et al., 2019) onde nenhum dos bloqueadores de tiol ou inibidores de PDI analisados exibiram citotoxicidade aguda nas células MCF-10A.

Maggiolini e colaboradores (2005), em seus trabalhos, comprovaram que a atividade citotóxica de compostos fenólicos de vinhos, dentre eles a miricetina, estão relacionados a sua atividade agonista do receptor de estrogênio, com base em sua capacidade de: (1) ativar o $\text{ER}\alpha$ endógeno em células MCF-7 dependentes de hormônio e células de câncer uterino e de mama de Ishikawa respectivamente; (2) ativar o domínio AF2 dependente de ligante de $\text{ER}\alpha$ e $\text{ER}\beta$ no contexto de proteínas quiméricas com Gal4

DBD em células de câncer de mama SKBR3 negativas para ER; (3) induzir respostas semelhantes a E2 usando diferentes vetores de expressão para ER α mutado no domínio AF2; (4) induzir rapidamente uma imunodeteção nuclear de ER α ; (5) regular os níveis de proteína e mRNA de ER α , bem como a expressão de genes alvo de estrogênio (6) competir com E2 pela ligação às proteínas ER α e ER β (MAGGIOLINI et al., 2005).

Nossos resultados mostram uma atividade ainda mais expressiva em células de câncer de mama triplo negativa e invasiva, comprovando que a atividade antineoplásica da miricetina em células tumorais de câncer de mama, está relacionada também a outros mecanismos, independentes da inibição da regulação estrogênica, uma vez que as células MDA-MB-231 sem receptores para estrogênio, foram mais afetadas.

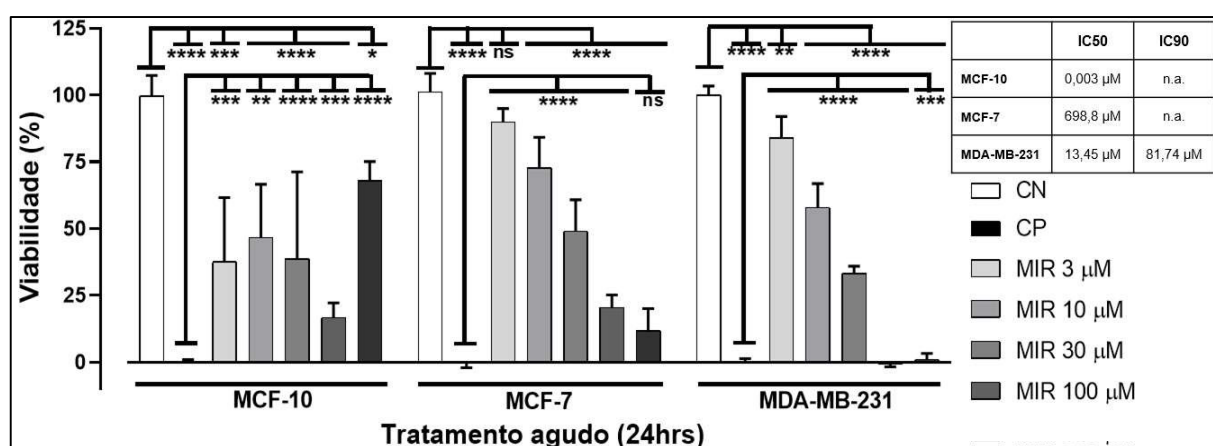


Figura 12: Efeitos antiproliferativo e citotóxico agudos da miricetina em células tumorais de câncer de mama MCF-10, MCF-7 (ER positiva) e MDA-MB-231 (triplo negativa). Uma placa de 96 poços de fundo chato foi utilizada para a cultura da suspensão de células tumorais com uma concentração inicial ajustada para 5×10^4 células por poço. Após o período de 24 horas necessário para a adesão celular em monocamada no fundo do poço, os grupos de poços foram tratados com concentrações crescentes de miricetina (3, 10, 30 e 100 µM), comparados com o grupo controle de morte (CP-DMSO 10%) e não tratado (CN). Os efeitos antiproliferativo e citotóxico de curto prazo foram avaliados com a exposição das células por um período de 24 horas ao tratamento. O número total de células vivas foi estimado usando o ensaio de MTT e analisados no programa Prism GraphPad 8.0. A significância das diferenças foi calculada usando one-way ANOVA e o pós-teste de comparações múltiplas de Tukey com a correção de Bonferroni para comparações múltiplas. Dados apresentados como média + DP de três experimentos independentes e os valores representados por ns, *, **, *** e ****, representam valores de $p > 0,05$, $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente.

Segundo Vukovic e colaboradores, a citotoxicidade celular da miricetina em células da linhagem MDA-MB-231, também está correlacionada com a apoptose seletiva

induzida decorrente de propriedades pró-oxidativas da miricetina 24 h após o tratamento, por indução do estresse oxidativo agudo ao inibir a PDI celular (VUKOVIC et al., 2018)

No tratamento subagudo, houve um efeito citotóxico nas células de tecido mamário normal MCF-10, porém, não houve dose-dependência do efeito. Nas linhagens tumorais MCF-7 e MDA-MB-231 o efeito citotóxico foi evidenciado a partir da menor dose testada (Figura 13), nas linhagens tumorais MCF-7 ($IC_{50} = 29,27 \mu M / IC_{90} = 316,7 \mu M$) e MDA-MB-231 ($IC_{50} = 10,32 \mu M / IC_{90} = 49,32 \mu M$) semelhante aos resultados de IC_{50} obtidos nos trabalhos de Sajedi e colaboradores (2020). Efeitos citotóxicos subagudos também foram obtidos por Ci e colaboradores (2018) quando avaliaram o efeito da miricetina na regulação negativa da metaloproteinase de matriz (MMP)-2/9 em linhagem de células MDA-MB-231 (Ci et al., 2018; JIAO; ZHANG, 2016; SAJEDI et al., 2020).

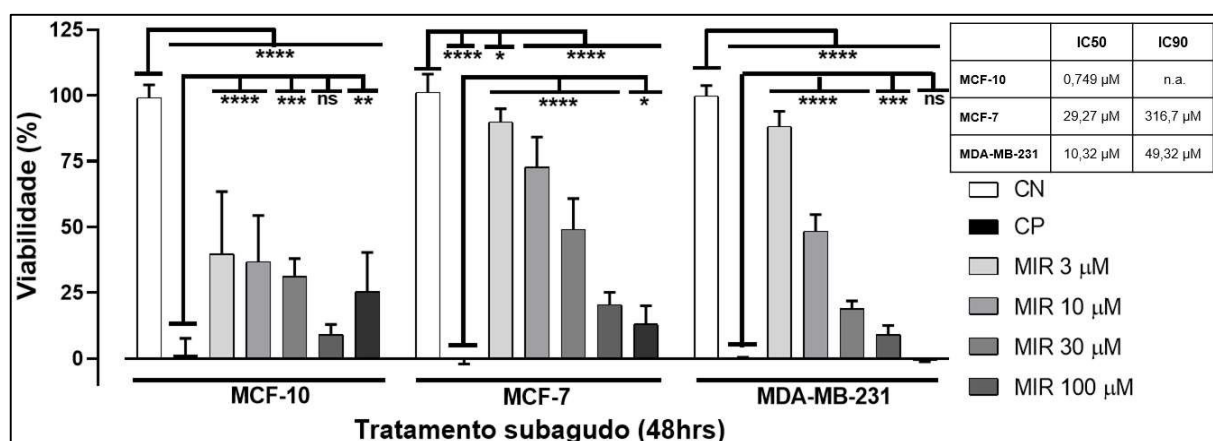


Figura 13: Efeitos antiproliferativo e citotóxico subagudos da miricetina em células tumorais de câncer de mama MCF-10, MCF-7 (ER positiva) e MDA-MB-231 (triplo negativa). Uma placa de 96 poços de fundo chato foi utilizada para a cultura da suspensão de células tumorais com uma concentração inicial ajustada para 5×10^4 células por poço. Após o período de 24 horas necessário para a adesão celular em monocamada no fundo do poço, os grupos de poços foram tratados com concentrações crescentes de miricetina (3, 10, 30 e 100 μM), comparados com o grupo controle de morte (CP-DMSO 10%) e não tratado (CN). Os efeitos antiproliferativo e citotóxico de médio prazo foram avaliados com a exposição das células por um período de 48 horas ao tratamento. O número total de células vivas foi estimado usando o ensaio de MTT e analisados no programa Prisma GraphPad 8.0. A significância das diferenças foi calculada usando one-way ANOVA e o pós-teste de comparações múltiplas de Tukey com a correção de Bonferroni para comparações múltiplas. Dados apresentados como média + DP de três experimentos independentes e os valores representados por ns, *, **, *** e ****, representam valores de $p > 0,05$, $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente.

Quando avaliado o efeito crônico da miricetina, o seu efeito citotóxico sobre as células de tecido mamário normal MCF-10 se manteve, porém sem dose-dependência. Nas linhagens tumorais, o efeito citotóxico se mostrou mais evidente, com diferenças estatísticas com maior nível de confiança (Figura 14), tanto nas células de linhagens MCF-7 (IC₅₀ = 23,80 µM/IC₉₀ = 475,1 µM), quanto em MDA-MB-231 (IC₅₀ = 5,707 µM/IC₉₀ = 50,57 µM). Dados semelhantes foram obtidos por Ci e colaboradores, onde a miricetina suprimiu em parte a viabilidade celular das células MCF-7 de câncer de mama por indução da apoptose (Ci et al., 2018).

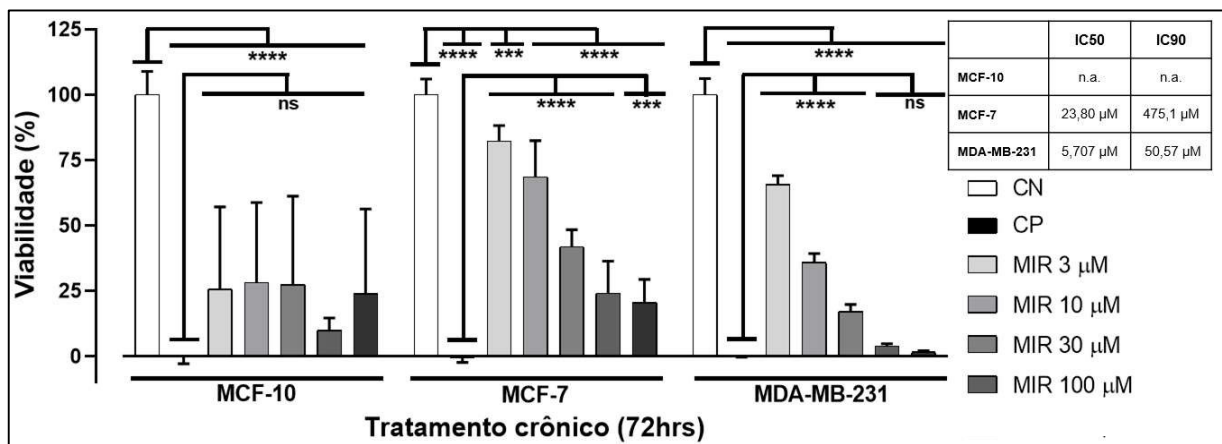


Figura 14: Efeitos antiproliferativo e citotóxico crônicos da miricetina em células tumorais de câncer de mama MCF-10, MCF-7 (ER positiva) e MDA-MB-231 (triplo negativa). Uma placa de 96 poços de fundo chato foi utilizada para a cultura da suspensão de células tumorais com uma concentração inicial ajustada para 5×10^4 células por poço. Após o período de 24 horas necessário para a adesão celular em monocamada no fundo do poço, os grupos de poços foram tratados com concentrações crescentes de miricetina (3, 10, 30 e 100 µM), comparados com o grupo controle de morte (CP-DMSO 10%) e não tratado (CN). Os efeitos antiproliferativo e citotóxico de longo prazo foram avaliados com a exposição das células por um período de 72 horas ao tratamento. O número total de células vivas foi estimado usando o ensaio de MTT e analisados no programa Prisma GraphPad 8.0. A significância das diferenças foi calculada usando one-way ANOVA e o pós-teste de comparações múltiplas de Tukey com a correção de Bonferroni para comparações múltiplas. Dados apresentados como média + DP de três experimentos independentes e os valores representados por ns, *, **, *** e ****, representam valores de $p > 0,05$, $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente.

Dados similares foram obtidos por Vukovic e colaboradores (2018) onde os flavonoides, luteolina e miricetina tiveram um efeito citotóxico pronunciado 72 horas após o tratamento, onde a miricetina promoveu um forte efeito citotóxico nas células MDA-MB-231 (VUKOVIC et al., 2018). Estudos de modificação molecular e ensaios *in silico* da

miricetina (1 e 10 μM) e de alguns de seus compostos derivados, comparados com o controle de tratamento doxorrubicina, mostraram atividade antineoplásica ao exercerem alta atividade contra as células humanas do câncer de mama MDA-MB-231 em tratamento agudos, subagudos e crônicos, decorrentes da inibição da telomerase, interrompendo o ciclo celular nas fases G0/G1 (XUE et al., 2015).

5.2. Ensaios de formação de esferoides em cultura 3D

Testamos o efeito da miricetina na formação e estabilização de esferoides em cultura 3D pois estes, podem fornecer um microambiente que imita mais de perto o microambiente observado nos tecidos tumorais. Esse recurso é crucial para o teste de drogas, uma vez que condições do microambiente celular podem ter efeitos profundos no comportamento e funções das células neoplásicas, afetando as respostas celulares às drogas e oferecendo um meio mais próximo do *in vivo*, incluindo o controle de moléculas sinalizadoras, de agentes terapêuticos, composição e estrutura da matriz extracelular em torno das células cancerígenas e a morfologia e arranjo de células individuais (FRIEDRICH et al., 2009).

Para tanto, utilizamos as linhagens tumorais de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231, para induzir a formação dos esferoides sob uma camada de gel de agarose 2% nas placas de 96 poços, numa quantidade ajustada de 5×10^4 células por poço, e expondo as células a concentrações de miricetina de 3, 10, 30 e 100 μM , em dois momentos, no dia zero que correspondente ao início da formação dos esferoides e no dia quatro que correspondente ao início da formação de interações celulares que estabilizam o esferoide inicialmente formado. Os ensaios foram feitos em placas de 96 poços e analisados no dia sete, momento que os esferoides estão totalmente formados e estabilizados e comparando os grupos tratados aos grupos controles negativos (não tratados) e controles positivos (DMSO 10%).

A análise dos esferoides de células MCF-7 tratados com miricetina no tempo zero (Figura 15) mostrou que o tratamento com a miricetina não foi eficaz em reduzir a quantidade de esferoides, nem seu diâmetro médio, quando comparado com o grupo controle negativo, mostrando que a droga, provavelmente não interfere em processos

vitais para a construção dos esferoides. Jiang e colaboradores (2019) em seus estudos mostraram que a miricetina (40 μM e 80 μM) suprimiu as expressões de proteínas envolvidas nos eventos que controlam o ciclo celular (PAK1, MEK, fosforilado (p)-ERK1/2, β -catenina, ciclina D1, PCNA e survivina), enquanto ativa GSK-3 β , Bax e caspase-3, em células de câncer de mama humano MCF-7 (JIANG et al., 2019). Nossos resultados mostram que o tratamento com miricetina nas doses testadas, não foram eficazes em reduzir a formação dos esferoides em tamanho (diâmetro) e quantidade, mesmo dados da literatura apontando seu efeito sobre o ciclo celular e mecanismos de apoptose em células de câncer de mama MCF-7.

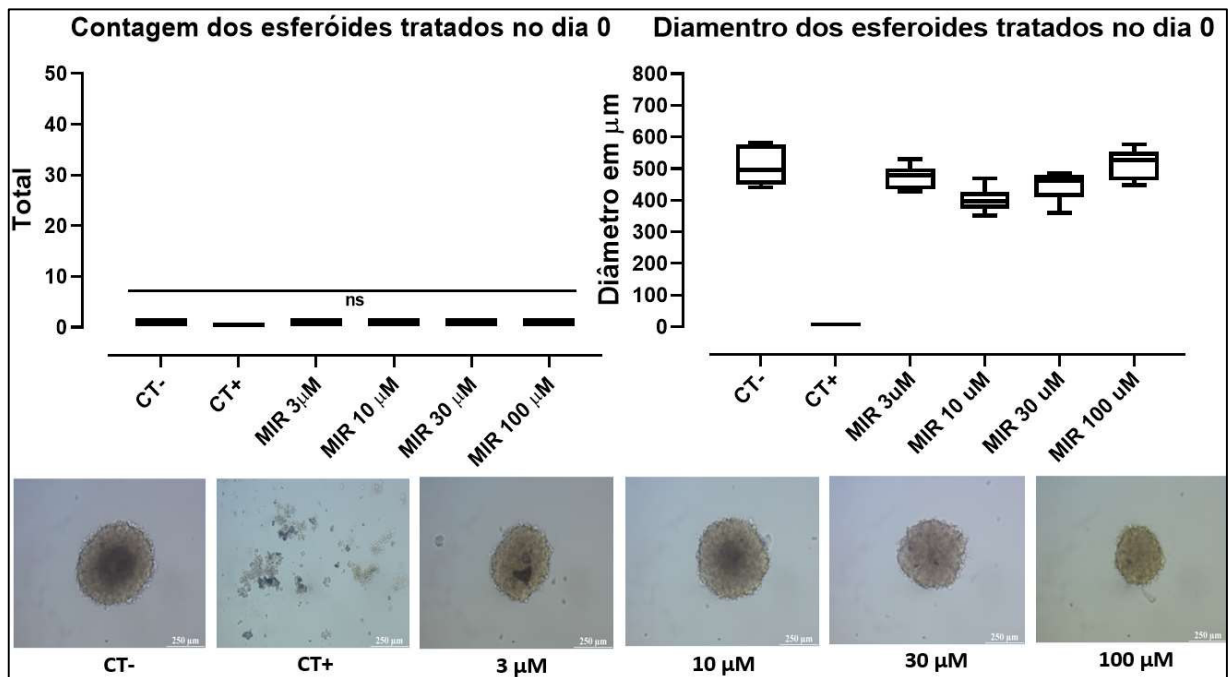


Figura 15: Impacto do tratamento com miricetina na formação dos esferoides em células tumorais de câncer de mama MCF-7 (ER positiva). Uma placa de 96 poços foi utilizada para deposição de 50 μL de gel fundido de agarose 2% para acomodar a da suspensão de células tumorais com uma concentração inicial ajustada para 5x10⁴ células por poço. Imediatamente após a deposição da suspensão das células, os grupos de poços foram tratados com concentrações finais crescentes de miricetina (3, 10, 30 e 100 μM), comparados com o grupo controle de morte (CP-DMSO 10%) e não tratado (CN). O número total de esferoides e seus respectivos diâmetros foram obtidos utilizando o programa ImageJ para analisar as imagens dos poços no aumento de 20x e 100x e analisados no programa Prisma GraphPad 8.0. A significância das diferenças foi calculada usando one-way ANOVA e o pós-teste de comparações múltiplas de Tukey com a correção de Bonferroni para comparações múltiplas. Dados apresentados como média + DP de três experimentos independentes e os valores representados por ns, *, **, *** e ****, representam valores de p>0,05, p<0,05, <0,01, <0,001 e <0,0001, respectivamente.

Na análise da estabilização dos esferoides de células de câncer de mama MCF-7, tratados ou não com miricetina, apenas o tratamento com miricetina na concentração de 100 μ M, diferiu dos demais tratamentos e do controle negativo nos parâmetros contagem de esferoides e diâmetro médio (figura 16).

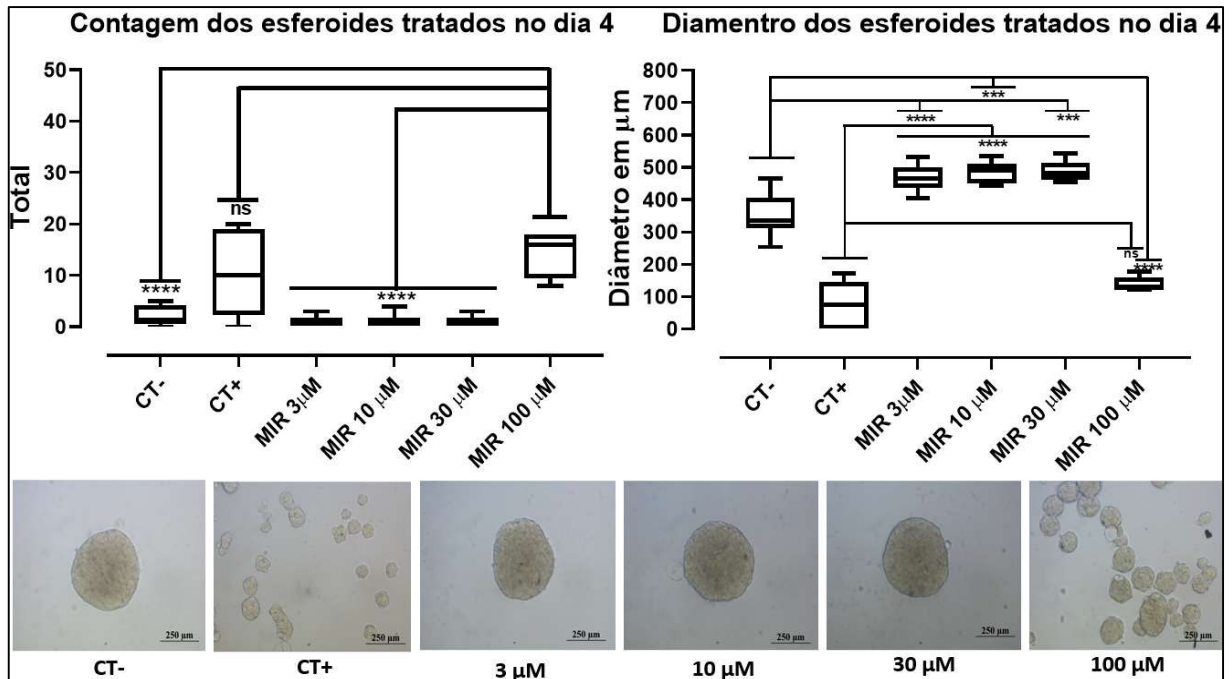


Figura 16. Impacto do tratamento com miricetina na estabilização de interações entre células que compõem os esferoides de células tumorais de câncer de mama MCF-7 (ER positiva). Uma placa de 96 poços foi utilizada para deposição de 50 μ L de gel fundido de agarose 2% para acomodar a da suspensão de células tumorais com uma concentração inicial ajustada para 5 $\times$ 10⁴ células por poço. Imediatamente após a deposição da suspensão das células, os grupos de poços foram tratados com concentrações finais crescentes de miricetina (3, 10, 30 e 100 μ M), comparados com o grupo controle de morte (CP-DMSO 10%) e não tratado (CN). O número total de esferoides e seus respectivos diâmetros foram obtidos utilizando o programa ImageJ para analisar as imagens dos poços no aumento de 20x e 100x e analisados no programa Prisma GraphPad 8.0. A significância das diferenças foi calculada usando one-way ANOVA e o pós-teste de comparações múltiplas de Tukey com a correção de Bonferroni para comparações múltiplas. Dados apresentados como média + DP de três experimentos independentes e os valores representados por ns, *, **, *** e ****, representam valores de p>0,05, p<0,05, <0,01, <0,001 e <0,0001, respectivamente.

Esses resultados apontam que a miricetina reduz as interações mais fortes (integrinas adesivas de superfície), que estão mais evidentes após o quarto dia de formação dos esferoides (Figura 16), gerando desintegração dos esferoides, evidenciado principalmente na concentração de 100 μ M, culminando num aumento do número de

esferoides e consequente redução do diâmetro nesse grupo tratado, quando comparado aos demais tratamentos e ao grupo controle negativo (não tratado), não diferindo do grupo controle positivo (DMSO 10%). Os grupos tratados com miricetina 3, 10 e 30 μM , quando comparado com o controle negativo apresentam uma redução da adesão entre as células que compõem os esferoides e, consequentemente, maior dispersão das células que culmina em maior diâmetro médio.

Outra linhagem de células de câncer de mama analisado em nosso trabalho foi a MDA-MB-231, que consiste em células de câncer de mama triplo negativas e invasivas. Suas características de baixa adesão fazem com que seu comportamento em cultura 3D se diferencie das células normais e das com maior adesão, como no caso das MCF-7, que formam esferoides únicos e coesos (esferoides compactos). As células da linhagem MDA-MB-231, tendem a formar esferoides menos regulares e menos coesos (agregados soltos), segundo protocolos padronizados (SOŚNIAK; OPIELA, 2021), mimetizando a baixa capacidade de adesão do tumor sólido e, consequentemente, sua alta capacidade de invasividade e metástase (Figura 17).

Os resultados, descritos na figura 17, mostram que o tratamento da miricetina no dia zero, reduz a capacidade das células MDA-MB-231 de formarem esferoides, gerando estruturas menos coesas em baixas doses de tratamento (3 μM), formando esferoides menores, porém em maior quantidade. Nas concentrações de 10, 30 e 100 μM , a miricetina reduziu, de forma dose-dependente, a quantidade e diâmetro médio dos esferoides dos grupos tratados.

Esse fato se apoia em dados da literatura que mostram a capacidade de inibidores da PDI na superfície celular, de induzirem a apoptose por bloquear a ativação de integrinas adesivas, reguladas pela PDI, gerando sinalização *outside in* para apoptose (AFROZE et al., 2020; DESGROSELLIER; CHERESH, 2010; POPIELARSKI et al., 2019). Dados semelhantes obtidos por Yingqian e colaboradores (2018) descobriram que miricetina em baixas concentrações (2,5 μM , 5,0 μM e 10,0 μM por 24 e 48 horas) inibiu a invasão, metástase e adesão de células de câncer de mama MDA-MB-231 por reduzir a atividade de MMP-2/9 e a expressão de genes específicos associados a metástase do câncer de mama no cérebro (CI et al., 2018).

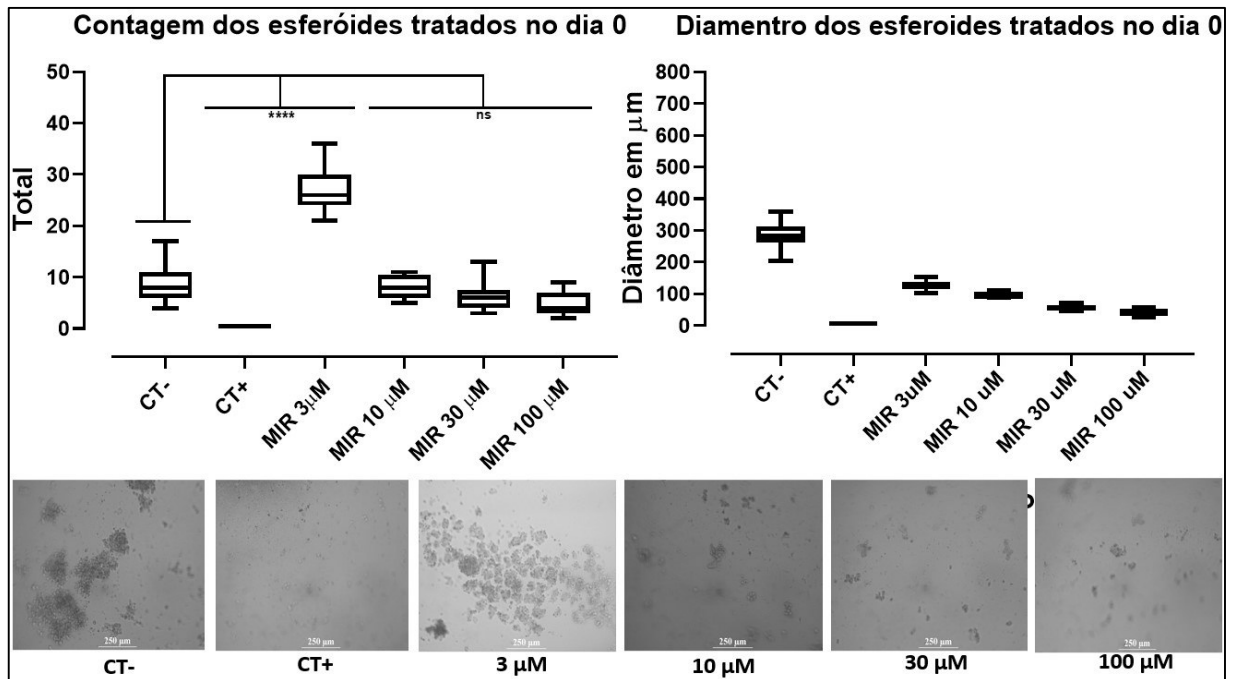


Figura 17. Impacto do tratamento com miricetina na formação dos esferóides em células tumorais de câncer de mama MDA-MB-231 (triplo negativa). Uma placa de 96 poços foi utilizada para deposição de 50μL de gel fundido de agarose 2% para acomodar a da suspensão de células tumorais com uma concentração inicial ajustada para 5×10^4 células por poço. Imediatamente após a deposição da suspensão das células, os grupos de poços foram tratados com concentrações finais crescentes de miricetina (3, 10, 30 e 100 μM), comparados com o grupo controle de morte (CP-DMSO 10%) e não tratado (CN). O número total de esferóides e seus respectivos diâmetros foram obtidos utilizando o programa ImageJ para analisar as imagens dos poços no aumento de 20x e 100x e analisados no programa Prism GraphPad 8.0. A significância das diferenças foi calculada usando one-way ANOVA e o pós-teste de comparações múltiplas de Tukey com a correção de Bonferroni para comparações múltiplas. Dados apresentados como média + DP de três experimentos independentes e os valores representados por ns, *, **, *** e ****, representam valores de $p > 0,05$, $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente.

Já na avaliação da capacidade da miricetina impedir as interações mais estáveis na formação mais avançada dos esferóides, quando o tratamento é realizado no dia quatro, os experimentos mostraram uma redução na quantidade de esferóides mas não reduziu o diâmetro médio dos grupos tratados com 3, 10 e 30 μM, mostrando que a miricetina nessas concentrações geram esfacelamento do esferoide inicialmente formado, causando a degradação do mesmo, provavelmente por indução da apoptose mediada pela inibição da adesão celular, através do bloqueio das PDI de superfície (Figura 18), como evidenciado por Popielarski e colaboradores (POPIELARSKI et al., 2019).

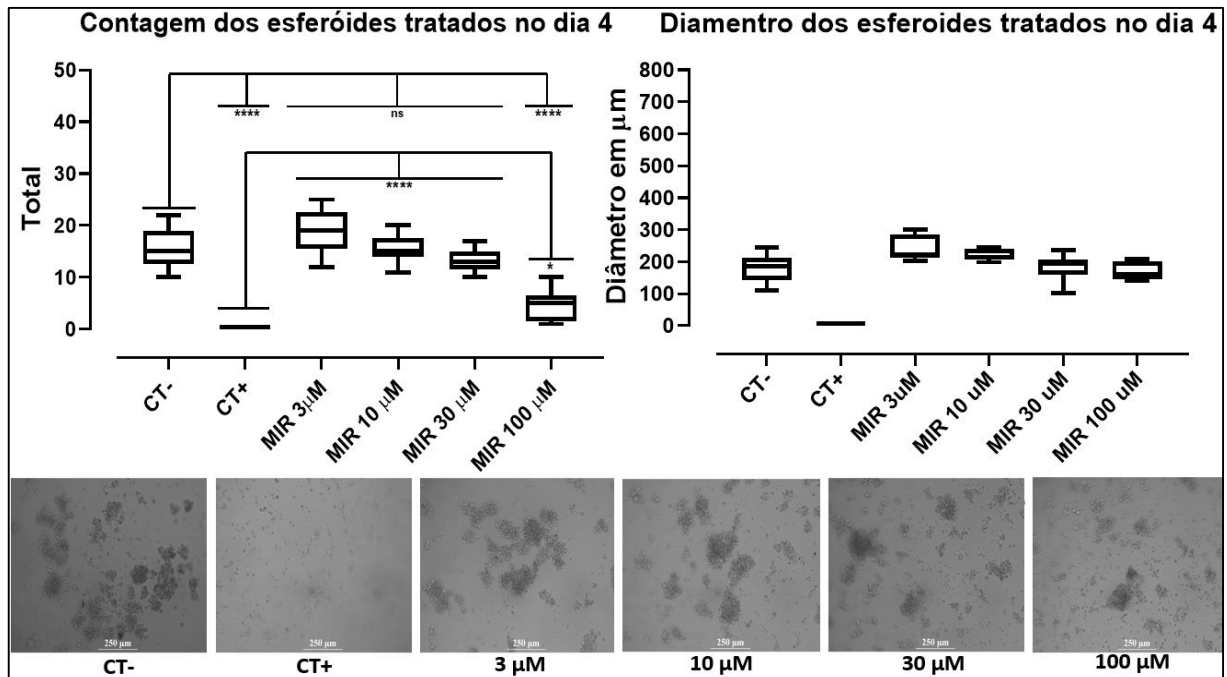


Figura 18. Impacto do tratamento com miricetina na estabilização de interações entre células que compõem os esferóides de células tumorais de câncer de mama MCF-7 (ER positiva). Uma placa de 96 poços foi utilizada para deposição de 50µL de gel fundido de agarose 2% para acomodar a da suspensão de células tumorais com uma concentração inicial ajustada para 5×10^4 células por poço. Imediatamente após a deposição da suspensão das células, os grupos de poços foram tratados com concentrações finais crescentes de miricetina (3, 10, 30 e 100 µM), comparados com o grupo controle de morte (CP-DMSO 10%) e não tratado (CN). O número total de esferóides e seus respectivos diâmetros foram obtidos utilizando o programa ImageJ para analisar as imagens dos poços no aumento de 20x e 100x e analisados no programa Prisma GraphPad 8.0. A significância das diferenças foi calculada usando one-way ANOVA e o pós-teste de comparações múltiplas de Tukey com a correção de Bonferroni para comparações múltiplas. Dados apresentados como média + DP de três experimentos independentes e os valores representados por **ns**, *****, ******, ******* e ********, representam valores de $p > 0,05$, $p < 0,05$, $< 0,01$, $< 0,001$ e $< 0,0001$, respectivamente.

Comparando as duas linhagens de células utilizadas em nosso trabalho, podemos verificar que as células da linhagem MCF-7 têm a tendência a formar agregado único em matriz de ágar, onde as células apresentam alta adesão, formando esferóides compactos. Já as células da linhagem MDA-MB-231 possuem baixa adesão, formando esferóides soltos, sendo uma característica intrínseca desta linhagem, que a torna invasiva e podendo responder a tratamentos que têm como alvo as proteínas adesivas de superfície de forma diferente das células MCF-7.

Dessa forma, a análise comparativa entre essas duas linhagens, pode ajudar a entender melhor como a miricetina atua na redução da viabilidade celular dessas células, sendo seu efeito mais proeminente na MDA-MB-231, apontando o papel adicional da miricetina (que possui atividade inibidora da PDI), nas proteínas adesiva e na regulação redox dessas células (metabolismo elevado), onde a PDI é essencial em ambos mecanismos (GREK; TOWNSEND, 2014).

Durante a formação dos esferoides, a linhagem MCF-7, não apresentou diferença dos grupos tratados com o controle negativo, divergindo da linhagem MDA-MB-231 onde, o tratamento reduziu o número e o diâmetro médio dos grupos quando comparado com o controle negativo, mostrando haver um efeito aditivo da miricetina nessa linhagem que não está presente na linhagem MCF-7, ou está presente em menor expressão. Esse efeito aditivo da miricetina na linhagem MDA-MB-231, foi capaz de reduzir a formação dos esferoides, quando o tratamento se iniciou no tempo zero e, causou a desintegração dos esferoides inicialmente formados, quando tratados no dia quatro com miricetina.

Além disso, a maior estabilidade do esferoide da linhagem de MCF-7 pode resultar num tempo maior para a miricetina promover seu efeito ou necessitar de maior dose para que tenha quantidade de moléculas suficientes para agir sobre as proteínas adesivas, sobre a PDI de superfície celular e adentrar o esferoide, promovendo assim, um efeito citotóxico mais expressivo e atuando de forma mais significativa na redução da formação dos esferoides das células MCF-7.

5.3. Análise das interações plaquetas-células tumorais em co-cultura

As plaquetas são pequenas células anucleadas presentes na corrente sanguínea, seu papel típico na hemostasia primária é bem descrito, no entanto, novas evidências sugerem que elas têm papéis criticamente importantes na progressão e inflamação do câncer. As células cancerosas podem ativar as plaquetas, usando-as como escudos físicos das forças de cisalhamento do sangue e das células natural killer (NK). As plaquetas ativadas também podem regular a migração de células hematopoiéticas e imunes em direção ao local do tumor, contribuindo para a inflamação

associada ao câncer. A ativação de plaquetas por células cancerígenas também pode contribuir para a metástase e progressão do câncer, estimulando a trombose venosa profunda e as formações de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) que “escondem” as células cancerígenas (PALACIOS-ACEDO et al., 2019)

Para avaliar o efeito da miricetina, um flavonoide comprovadamente inibidor da ativação e agregação plaquetárias por inibição da PDI de sua superfície, expusemos as linhagens de células tumorais de mama ao contato com plaquetas de doadores saudáveis e isentos de uso de anti-inflamatórios por 10 dias.

Em uma placa de 96 poços, foram colocadas suspensões de células tumorais com concentração final de 1×10^3 células por poço das linhagens tumorais MCF-7 e MDA-MB-231 em quatro grupos experimentais, a saber: (1) MCF-7 previamente expostas à miricetina nas concentrações de 3, 10, 30 e 100 μM por uma hora e, após a exposição prévia, postas em contato por uma hora, ao PRP de concentração ajustada para $2,5 \times 10^4$ plaquetas/ mm^3 ; (2) MCF-7 postas em contato por uma hora, ao PRP de concentração ajustada para $2,5 \times 10^4$ plaquetas/ mm^3 que foi previamente exposto à miricetina nas concentrações de 3, 10, 30 e 100 μM por uma hora; (3) MDA-MB-231 previamente expostas à miricetina nas concentrações de 3, 10, 30 e 100 μM por uma hora e, após a exposição prévia, postas em contato por uma hora, ao PRP de concentração ajustada para $2,5 \times 10^4$ plaquetas/ mm^3 ; (4) MDA-MB-231 postas em contato por uma hora, ao PRP de concentração ajustada para $2,5 \times 10^4$ plaquetas/ mm^3 que foi previamente exposto à miricetina nas concentrações de 3, 10, 30 e 100 μM por uma hora.

A concentração de PRP foi ajustada para uma concentração equivalente a 10% da concentração fisiológica, para evitar uma quantidade excessiva de plaquetas nos poços que, poderiam dificultar na análise das plaquetas que estariam interagindo efetivamente com a superfície das células de tumor de mama. Além disso, o ajuste de concentração do PRP, foi eficaz para evitar a formação da malha de fibrina por ativação da cascata de coagulação, gerando morte quando expostas por 24 horas, além de dificultar a análise desejada e, ao mesmo tempo, ofertar fibrinogênio para o meio, necessário para algumas interações entre células.

Os resultados foram expressos em percentual de perda da interação com as plaquetas, onde cada grupo experimental teve seu valor associado ao seu grupo controle negativo (CN) cujo valor foi ajustado para 100% de interação com plaquetas (Figura 19).

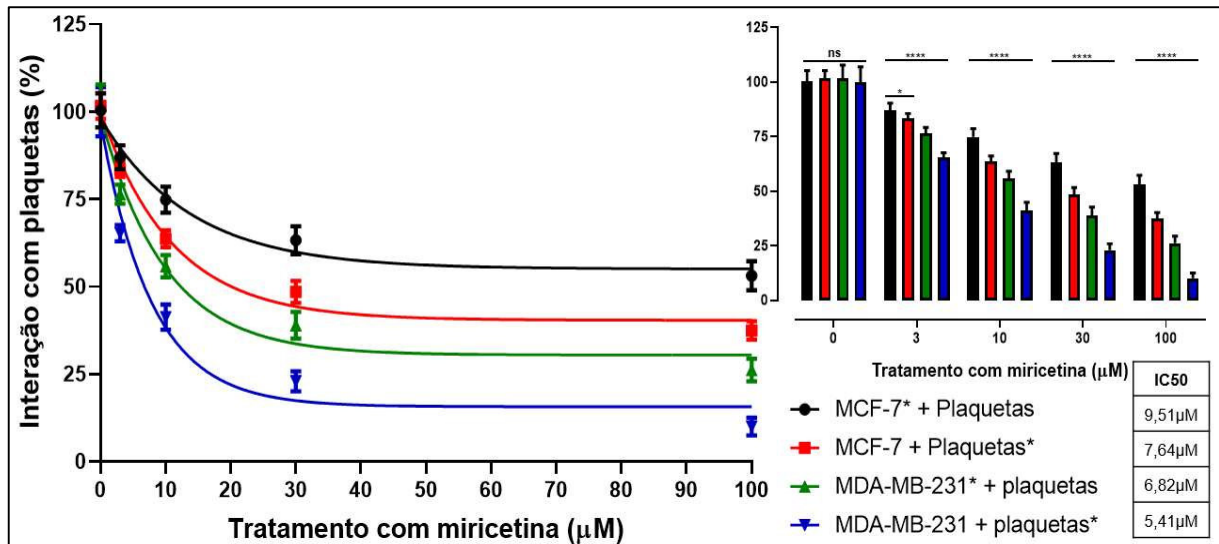


Figura 19. Impacto do tratamento com miricetina na interação célula tumoral-plaquetas. Uma placa de 96 poços foi utilizada para acomodar a suspensão de células tumorais (MCF-7 ou MDA-MB-231) com uma concentração inicial ajustada para 1×10^3 células por poço e dividido em quatro grupos. Dois grupos (MCF-7* e MDA-MB-231*) foram previamente expostos à miricetina, por uma hora, em concentrações finais crescentes de 3, 10, 30 e 100 μM e depois expostos a PRP, por uma hora, em concentração ajustada de $2,5 \times 10^4$ plaquetas/ mm^3 , comparados com o grupo controle de morte (CP-DMSO 10%) e não tratado com miricetina (CN). Os dois grupos restantes (MCF-7 e MDA-MB-231) foram expostos a PRP, em concentração de $2,5 \times 10^4$ plaquetas/ mm^3 , previamente expostas à miricetina, por uma hora, em concentrações finais crescentes de 3, 10, 30 e 100 μM , comparados com o grupo controle de morte (CP-DMSO 10%) e não tratado com miricetina (CN). Após o tempo de exposição final das células tumorais com plaquetas, os poços foram lavados três vezes e a interação célula tumoral-plaqueta foram realizadas, utilizando o programa ImageJ para avaliar as imagens dos poços no aumento de 40x e analisados no programa Prisma GraphPad 8.0. A significância das diferenças foi calculada usando one-way ANOVA e o pós-teste de comparações múltiplas de Tukey com a correção de Bonferroni para comparações múltiplas. Dados apresentados como média + DP de três experimentos independentes, com três doadores sadios e os valores representados por ns, *, **, *** e ****, representam valores de $p > 0,05$, $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente. Os IC50 apresentados são estatisticamente significantes e correspondem à média dos experimentos independentes.

Os resultados obtidos mostram que as plaquetas foram as células que tiveram maior redução da sua capacidade adesiva, quando exposta previamente a concentrações de miricetina (MCF-7 + Plaquetas* e MDA-MB-231 + Plaquetas*), sendo o efeito dose-dependente, com IC50 de 7,64 e 5,41 μM , respectivamente. Sendo o IC50 correspondente à concentração responsável pela perda da interação com plaquetas a

50% do controle negativo. Os grupos em que as células tumorais foram expostas previamente à miricetina (MCF-7* + Plaquetas e MDA-MB-231* + Plaquetas), também obtiveram efeitos satisfatórios, com IC50 de 9,51 e 6,82 μ M, respectivamente (figura 20).

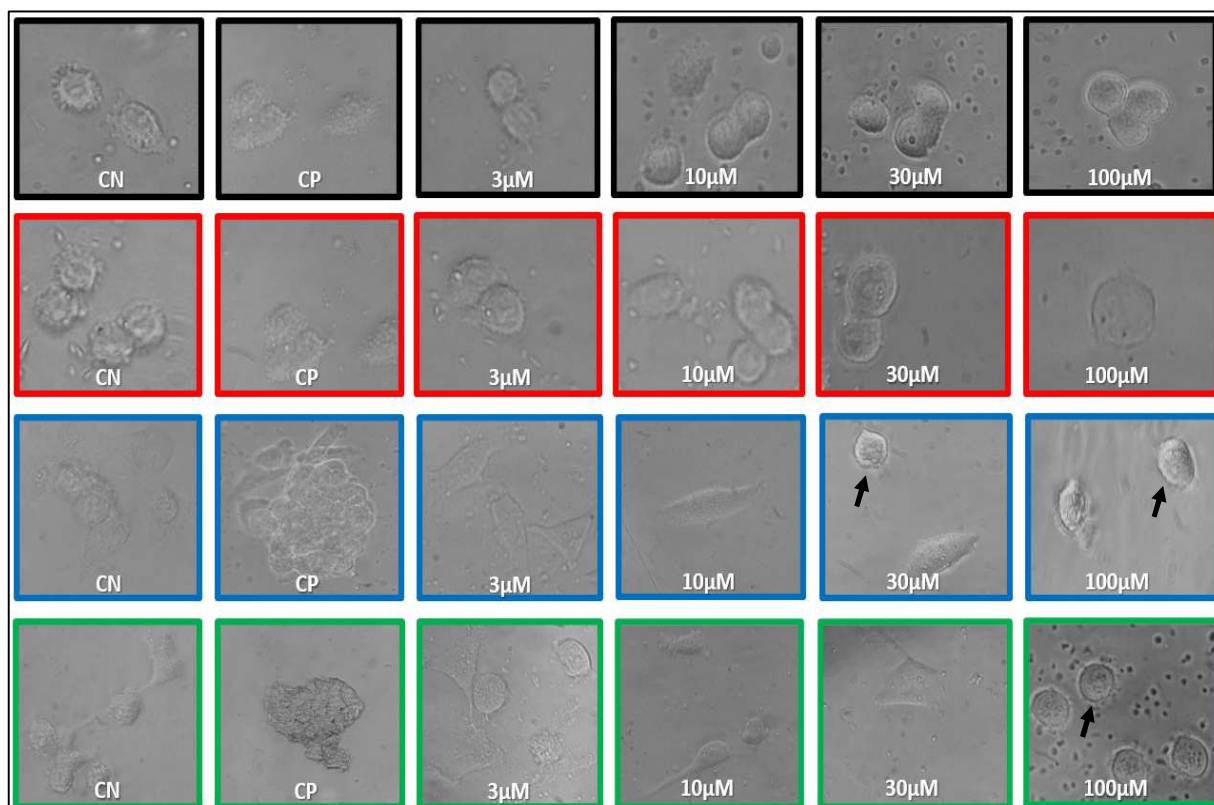


Figura 20. Imagens representativas dos poços dos experimentos descritos no gráfico anterior. Na primeira linha, com a borda em preto (■), o grupo MCF-7* + plaquetas. Na segunda linha, com borda em vermelho (■), o grupo MCF-7 + plaquetas*. Na terceira linha, com borda em azul (■), o grupo MDA-MB-231* + plaquetas. Na quarta linha, com borda em verde (■), o grupo MDA-MB-231 + plaquetas*. As setas pretas (→), indicam células tumorais com morfologia condizente com células em sofrimento ou mortas.

Nas doses mais elevadas, as células mostraram mudança de padrão morfológico condizente com células que apresentam sofrimento e perda de adesão ao fundo da placa, como formato esférico e bordas refringentes, semelhantes aos descritos por Banerjee e colaboradores em seus trabalhos (BANERJEE et al., 2017) e condizentes com os experimentos anteriores da formação e estabilização de esferoides (Figura 20) e essas alterações condizentes com morte celular, não foram causadas pela exposição a miricetina por 1 ou 2 horas nas concentrações *supra citadas* (Figura suplementar 1) ou por interferência da cor da miricetina na análise (figura suplementar 2).

Esses resultados reforçam a hipótese que a miricetina também pode ter como alvo, proteínas adesivas das células tumorais, como a integrina $\alpha V\beta 3$ (uma integrina heterodimérica cuja subunidade $\beta 3$ sofre influência da PDI para sua ativação) como comprovado pelos estudos de Mor-Cohen e colaboradores (MOR-COHEN, 2016), onde a interação da célula tumoral com a plaqueta via ligação $\alpha V\beta 3$ - $\alpha IIb\beta 3$ sofre intermediação de uma molécula de fibrinogênio.

Até agora, cinco integrinas foram identificadas em plaquetas: $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha IIb\beta 3$ e $\alpha 2\beta 1$, sendo que as quatro últimas estão relacionadas à metástase tumoral (XIONG et al., 2020). As células tumorais também expressam integrinas, que desempenham um papel importante na progressão do tumor (LAVERGNE et al., 2017).

A $\alpha v\beta 3$ está presente principalmente no endotélio, músculo liso e células cancerígenas (LAVERGNE et al., 2017). É um importante receptor que participa da angiogênese tumoral, invasão, inflamação, cicatrização de feridas e coagulação sanguínea (BI; YI, 2014). Apenas algumas centenas de cópias de $\alpha v\beta 3$ estão presentes na superfície das plaquetas (LAVERGNE et al., 2017). As integrinas $\alpha v\beta 3$ se ligam ao fibrinogênio para promover a ligação cruzada entre plaquetas e CTCs, com a $\alpha IIb\beta 3$, facilitando a interação entre plaquetas e CTCs (DAVIS et al., 2020), formando assim um forte escudo plaquetário. Além de sua função adesiva física, $\alpha v\beta 3$ fornece sinais bioquímicos que promovem a degranulação plaquetária e a liberação de ATP (DAVIS et al., 2020). Além disso, o $\alpha v\beta 3$ se liga ao CD97 na superfície dos CTCs e auxilia a resistência ao *anoikis* mediada por ácido lisofosfatídico (LPA) (SMEDA et al., 2020).

A $\alpha IIb\beta 3$, também conhecido como GPIIb/IIIa, complexo CD41/D61 e receptor de fibrinogênio (HUANG et al., 2019), é a integrina mais comum e importante nas plaquetas e responsável por mediar a deformação plaquetária, adesão irreversível e crescimento do trombo. A Ativação Plaquetária Induzida por Células Tumorais (APICT) é regulada principalmente por $\alpha IIb\beta 3$ e muitos agonistas podem ativá-la, como TXA_2 , trombina, ADP GPIIb-IX-V e GPVI. (BECKER et al., 2017), Após a ativação, a afinidade de $\alpha IIb\beta 3$ e fibrinogênio aumenta, o que ajuda na formação do escudo do trombo (MAMMADOVA-BACH et al., 2020).

A $\alpha\text{IIb}\beta 3$ também é expresso na superfície dos CTCs e plaquetas que são reticulados através de $\alpha\text{IIb}\beta 3$ e $\alpha\text{v}\beta 3$ em suas superfícies (LAVERGNE et al., 2017). Além da adesão, $\alpha\text{IIb}\beta 3$ também ativa várias vias de sinalização que aumentam a produção de ROS e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN). $\alpha\text{IIb}\beta 3$ promove a liberação de VEGF plaquetário (HUANG et al., 2019) e auxilia CTC a aumentar a expressão de VEGF, $\alpha\text{v}\beta 3$ e MMPs pela via de sinalização PI3K-Akt (ZHAO et al., 2014)

5.4. Análise da produção de H_2O_2 e NO do sobrenadante da co-cultura

O papel das ERO e ERN na produção de danos ao DNA e instabilidade genômica é amplamente reconhecido e sua relação com o início do tumor está bem estabelecida. No entanto, as EROs e ERN podem afetar direta ou indiretamente um número surpreendente de vias moleculares relacionadas à proliferação celular, motilidade, angiogênese e invasão. Pequenas concentrações de EROs podem estimular a proliferação, pela inativação oxidativa de proteínas fosfatases. (VALKO et al., 2006). A presença de ERO e ERN em quantidades elevadas estão relacionadas com sofrimento celular e mecanismos de morte celular por apoptose (AL-FAHAD et al., 2021).

Paralelo ao experimento anteriormente descrito, de interação plaquetas-células tumorais, o sobrenadante da co-cultura foi transferido para outras placas a fim de se fazer o doseamento de H_2O_2 e NO, para verificar se a exposição da co-cultura promoveria uma alteração da produção dessas substâncias, que são elevadas em condições de sofrimento celular, inclusive em etapas anteriores à morte celular por apoptose (Figura 21).

Os resultados mostraram um aumento da produção de H_2O_2 e NO, de forma dose-dependente, e os resultados mais expressivos foram obtidos pelos grupos de linhagens celulares com maior capacidade metastática (MDA-MB-231), quando comparados com as de menor capacidade (MCF-7) e quando postas em co-cultura com plaquetas pré-incubadas com miricetina (MDA-MB-231+plaquetas*), quando comparadas a que foram postas em co-cultura com plaquetas não previamente incubadas com miricetina (MDA-MB-231+plaquetas). Nossos testes controles mostraram

que a técnica adotada não é influenciada pela coloração do composto miricetina (Figura suplementar 2).

Em relação à angiogênese, tanto o H_2O_2 exógeno quanto o ânion superóxido derivado de mitocôndrias são capazes de estabilizar o HIF1- α , promovendo a expressão de efetores pró-angiogênicos a jusante (NIECKNIG et al., 2012). Além disso, a TEM, envolvida na aquisição do fenótipo metastático, é orquestrada por várias vias e moléculas reguladas em nível de expressão ou atividade por EROs, como TGF β /Smad, Snail, E-Cadherin, β -catenina e matriz metaloproteinases (MMP) (GIANNONI; PARRI; CHIARUGI, 2012).

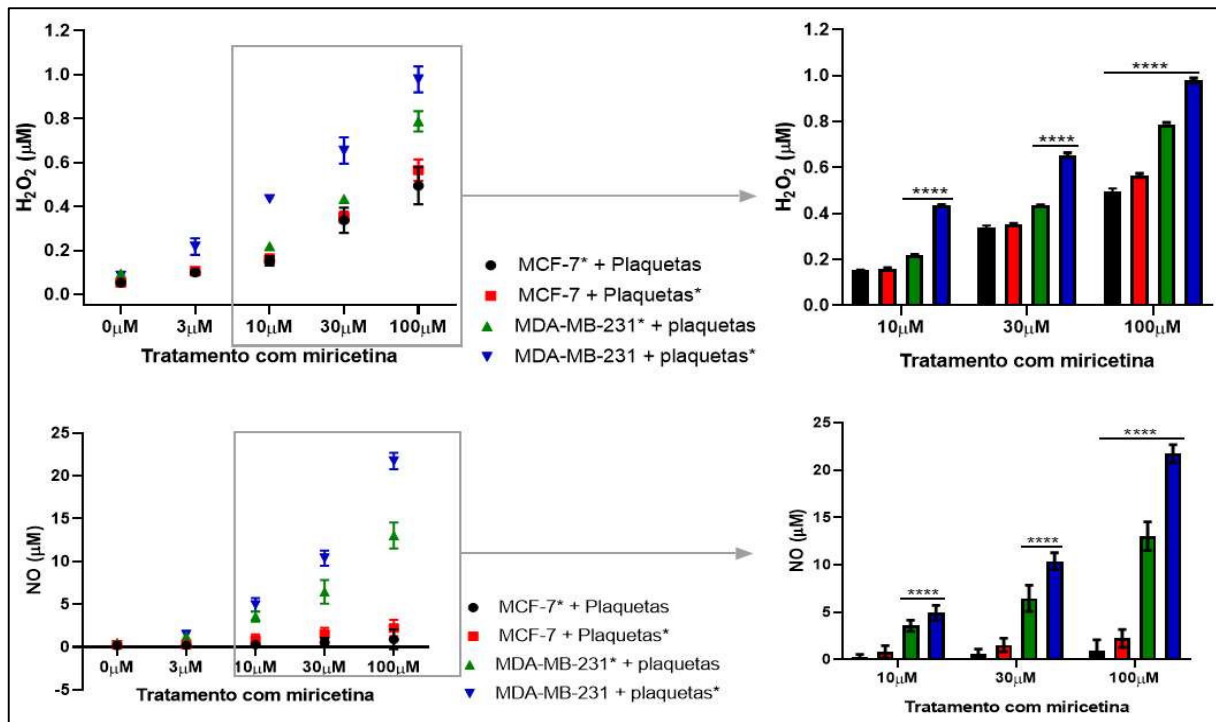


Figura 21. Impacto do tratamento com miricetina na produção de H_2O_2 e NO. O sobrenadante do experimento descrito na figura 19 foi retirado dos poços e transferido para novas placas de 96 poços a fim de mensurar a concentração de H_2O_2 e NO de cada poço. Os resultados foram analisados no programa Prisma GraphPad 8.0. A significância das diferenças foi calculada usando one-way ANOVA e o pós-teste de comparações múltiplas de Tukey com a correção de Bonferroni para comparações múltiplas. Dados apresentados como média + DP de três experimentos independentes, com três doadores saudáveis e os valores representados por ns, *, **, *** e ****, representam valores de $p > 0,05$, $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente.

O NO pode exercer uma resposta bifásica, de modo que quando os níveis de NO estão além de uma concentração crítica que seria adequada para o crescimento e sobrevivência do tumor, a parada do crescimento e/ou vias apoptóticas são iniciadas (HU et al., 2020). Vale a pena notar que as células tumorais têm requisitos de concentração de NO bastante diferentes que causam um fenótipo pró-tumoral ou antitumoral. Portanto, identificar o estado estacionário do NO é particularmente importante. Experimentalmente, a ativação de vias de sinalização específicas ocorreu em células de câncer de mama MCF7 em resposta a fluxos distintos de NO (THOMAS et al., 2004). Além disso, um baixo nível de NO (<50 nM) foi associado ao aumento da fosforilação de ERK mediada por cGMP, enquanto um nível intermediário de NO (> 100 nM) levou à estabilização do fator-1 α induzível por hipóxia. No entanto, o efeito pró-sobrevivência do NO foi significativamente comprometido em altas concentrações (>400 nM) e foi acompanhado por um aumento na fosforilação de p53 (THOMAS et al., 2004).

O tratamento de células de câncer de mama com 30 a 60 μ M, por 48 horas, de NO doador DETA/NO aumentou os níveis de pAkt e pERK e interrompeu a proliferação de células de câncer de mama inibidas pela fosforilação de ERK/Akt (PERVIN et al., 2007). Além disso, a exposição prolongada de células de câncer de mama a 1 mM, por 48 horas, de DETA/NO resultou na desfosforilação de pERK e pAkt mediada por proteína quinase fosfatase 1 ativada por mitógeno, juntamente com a indução subsequente de apoptose. Embora a expressão de NO seja transitória, o fluxo sustentado de NO gerado pela iNOS varia em duração de segundos a dias, determinando assim os efeitos anti ou pró-apoptóticos do NO (HU et al., 2020).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos dados mostram que a miricetina tem efeito citotóxico em diferentes linhagens de câncer de mama, mesmo em tratamentos agudos, sendo esse efeito potencializado à medida que a exposição da célula é prolongada. Também ficou evidente que a miricetina tem a capacidade de interferir nas proteínas adesivas da superfície das células de câncer de mama de baixa capacidade de invasão e metástase (MCF-7) na maior dose testada. Esse mesmo efeito se mostrou mais expressivo, nas células de câncer de mama com alta capacidade invasiva e de metástase, reduzindo as interações celulares imprescindíveis para a formação dos esferoides e escudo plaquetário das células tumorais circulantes, bem como as interações de estabilização e manutenção.

Nossos estudos apontam ser a porção $\beta 3$ das integrinas, o principal alvo da miricetina, por essa porção abrigar pontes dissulfetos que são isomerizadas pela PDI, durante o processo de ativação das integrinas. Esse processo de ativação das integrinas é reduzido quando tais integrinas são expostas à miricetina, reduzindo os mecanismos fisiopatológicos desencadeados pela sua ativação, como a ativação plaquetária, imprescindível na formação do escudo plaquetário das CTCs, resumidos na figura 22.

A integrina $\alpha \text{IIb} \beta 3$ é a principal integrina plaquetária com um alto número de cópias na superfície, mudando de uma conformação de ligação de ligante inativa para ativa após estimulação agonista, regulando assim a agregação plaquetária, trombose e hemostasia (DURRANT; VAN DEN BOSCH; HERS, 2017). Essa transformação permite que a integrina $\alpha \text{IIb} \beta 3$ se ligue ao fibrinogênio e ao vWF e a essas plaquetas em ponte (XU, X. R. et al., 2016).

Antagonistas da integrina $\alpha \text{IIb} \beta 3$ já utilizados no tratamento de pacientes com doenças coronarianas agudas (GACHET, 2015) como a integrilina, um potente bloqueador de integrina $\alpha \text{IIb} \beta 3$, pode efetivamente inibir APICT e metástase óssea associada ao câncer de mama (BOUCHARABA et al., 2004). Consistentemente, a ablação genética de integrinas $\beta 3$ em camundongos inibiu a metástase óssea (BOUCHARABA et al., 2004). É importante notar que a deficiência da subunidade αIIb em camundongos também diminuiu as etapas iniciais da metástase pulmonar, mas

efeitos surpreendentemente opostos foram observados em estágios posteriores da metástase (ECHTLER et al., 2017).

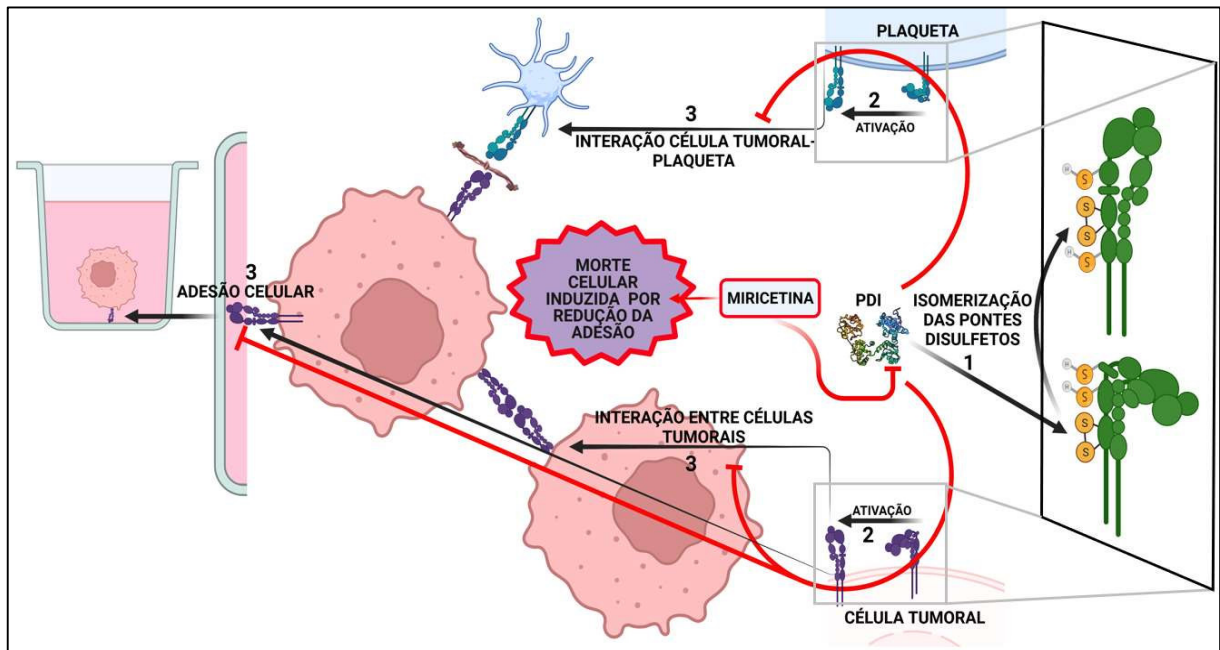


Figura 22. Mecanismo de ação da miricetina sobre PDI de superfície das células tumorais e plaquetas. A Proteína Dissulfeto Isomerase (PDI) possui a propriedade de promover trocas de pontes dissulfeto críticas em diversas integrinas (em verde), inclusive nas integrinas $\alpha V\beta 3$ (em lilás) e $\alpha IIb\beta 3$ (em azul) presentes abundantemente em células tumorais e plaquetas, respectivamente. O processo de ativação das integrinas de superfície celular, intermediada pela PDI, se dá em três etapas básicas (setas em preto), a saber: (1) isomerização das pontes dissulfeto presentes nas subunidades $\beta 3$ das integrinas; (2) alteração da conformação tridimensional, com exposição da porção RGD das integrinas (sítio de interação com moléculas-alvo); (3) Interação com moléculas-alvo, com ou sem intermédio de proteínas adesivas, como o fibrinogênio (em laranja). A inibição da PDI, promovida pela miricetina, dificulta a ativação das integrinas de superfície (setas em vermelho), culminando na redução da interação das células tumorais, entre si, com plaquetas e com substratos, ativando vias de apoptose por perda da adesão celular.

A expressão da integrina $\alpha IIb\beta 3$ não é exclusiva das plaquetas, também é detectada na superfície das células do câncer de mama após a incorporação de conteúdo plaquetário pelas células tumorais, formando um mimetismo. Portanto, o bloqueio da função da porção $\beta 3$ das integrinas tem sido sugerido como uma abordagem terapêutica benéfica contra células tumorais. No entanto, o bloqueio das funções da integrina $\alpha IIb\beta 3$ na terapia do câncer pode resultar em sérios efeitos colaterais na hemostasia, com complicações hemorrágicas com consequências fatais (TÍMÁR et al., 2005).

Uma possível estratégia, para burlar os efeitos hemorrágicos colaterais, seria desenvolver inibidores mais específicos que tenham como alvo apenas a forma ativa das integrinas $\alpha\text{IIb}\beta 3$, reduzindo o risco de complicações hemorrágicas. Recentemente, vários grupos têm proposto uma estratégia alternativa para provar este conceito, e deletar parcialmente as funções da integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$. Uma estratégia baseada em anticorpos bloqueando a função tiol-isomerase de integrinas $\alpha\text{IIb}\beta 3$ poderia inibir a trombose sem induzir sangramento (KIM et al., 2013; ZHU, GUANGHENG et al., 2017).

Alternativamente, usando um anticorpo de cadeia simples (ScFv) direcionado contra a forma ativa da integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$, efeitos antitrombóticos semelhantes foram observados sem qualquer complicação hemostática (ZHU, GUANGHENG et al., 2017). Em consonância com isso, em modelos de xenoenxerto de câncer humano (mama: MDA-MB-231, SKBr3; fibrossarcoma: HT-1080; linfoma de Burkitt: Ramos) o anticorpo ScFv direcionou efetivamente a forma ativa das integrinas $\alpha\text{IIb}\beta 3$ plaquetárias (YAP et al., 2017).

Recentemente, um conjugado anticorpo-droga (ADC) foi desenvolvido, ligando ScFv a um potente inibidor quimioterápico de microtúbulos monometil auristatina E (MMAE), contra a forma ativa de integrinas $\alpha\text{IIb}\beta 3$ plaquetárias e simultaneamente bloqueando o crescimento tumoral e a metástase por MMAE (YAP et al., 2019). No microambiente tumoral, o MMAE é clivado do ADC pela catepsina B, liberando localmente a forma bioativa do MMAE, matando as células cancerígenas sem complicações hemorrágicas (YAP et al., 2019). Esta promissora ferramenta terapêutica seria importante seguir no futuro usando modelos de camundongos imunocompetentes de câncer.

Embora haja muitos estudos mostrando seu efeito citotóxico, os estudos são unânimes em afirmar que muito se tem a pesquisar sobre o efeito antineoplásico da miricetina pois seu efeito é comprovadamente amplo sobre vários alvos moleculares que envolvem a progressão de diversos tipos de câncer, confirmada por diferentes estudos (AFROZE et al., 2020). Esses estudos são cruciais para o entendimento da biologia das células neoplásicas e, por se tratar de um reconhecido inibidor da PDI, seus estudos nos ajudam a entender melhor o envolvimento das integrinas e o papel da PDI na biologia do câncer. A ampliação desse conhecimento é de suma importância para traçar novas

estratégias farmacoterapêuticas e profiláticas, que levarão o tratamento e a prevenção das neoplasias a níveis de maior eficácia.

Como perspectivas futuras, pretendemos analisar amostras de co-cultura de células tumorais e plaquetas com incubação prévia ou não em microscopia de fluorescência para avaliar a interação plaqueta-célula tumoral na formação dos invadipódios e transferências de componentes da superfície plaquetária (integrinas $\alpha\text{IIb}\beta 3$) para as células tumorais, passo crucial na TEM e sobrevivência das CTCs na circulação sanguínea.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFROZE, N. et al. A review on myricetin as a potential therapeutic candidate for cancer prevention. **3 Biotech**, v. 10, n. 5, p. 211, 2020/04/24 2020.
- AL-FAHAD, D. et al. Nitric oxide may regulate focal adhesion turnover and cell migration in MDA-MB-231 breast cancer cells by modulating early endosome trafficking. **Medical Journal of Cell Biology**, v. 9, n. 2, p. 60-72, 2021.
- ALBIGES-RIZO, C. et al. Actin machinery and mechanosensitivity in invadopodia, podosomes and focal adhesions. **Journal of cell science**, v. 122, n. 17, p. 3037-3049, 2009.
- ALEXIEVA, V. et al. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell & Environment**, v. 24, p. 1337-1344, 12/01 2001.
- ALI KHAN, H.; MUTUS, B. Protein disulfide isomerase a multifunctional protein with multiple physiological roles. **Front Chem**, v. 2, p. 70, 2014.
- ALI KHAN, H.; MUTUS, B. Protein disulfide isomerase a multifunctional protein with multiple physiological roles. **Frontiers in Chemistry**, v. 2, 2014-August-26 2014.
- AMARARATHNA, M.; JOHNSTON, M. R.; RUPASINGHE, H. Plant polyphenols as chemopreventive agents for lung cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 8, p. 1352, 2016.
- APPENZELLER-HERZOG, C. Glutathione-and non-glutathione-based oxidant control in the endoplasmic reticulum. **Journal of cell science**, v. 124, n. 6, p. 847-855, 2011.
- APPENZELLER-HERZOG, C.; ELLGAARD, L. The human PDI family: Versatility packed into a single fold. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1783, n. 4, p. 535-548, 4// 2008.
- ARORA, J. et al. Inflammatory breast cancer tumor emboli express high levels of anti-apoptotic proteins: use of a quantitative high content and high-throughput 3D IBC spheroid assay to identify targeting strategies. **Oncotarget**, v. 8, n. 16, 2017.
- BACCELLI, I.; TRUMPP, A. The evolving concept of cancer and metastasis stem cells. **The Journal of Cell Biology**, v. 198, n. 3, p. 281-293, 2012.
- BANERJEE, P. P. et al. Mentha arvensis (Linn.)-mediated green silver nanoparticles trigger caspase 9-dependent cell death in MCF7 and MDA-MB-231 cells. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, v. 9, p. 265, 2017.

BANNA, S. C.; GONDINHO, B. V. C. Assistência em oncologia no sistema único de saúde (SUS). **JMPHC| Journal of Management & Primary Health Care| ISSN 2179-6750**, v. 11, 2019.

BARZEGAR, A. Antioxidant activity of polyphenolic myricetin in vitro cell-free and cell-based systems. **Molecular Biology Research Communications**, v. 5, n. 2, p. 87, 2016.

BECKER, K. A. et al. Melanoma cell metastasis via P-selectin-mediated activation of acid sphingomyelinase in platelets. **Clinical & experimental metastasis**, v. 34, n. 1, p. 25-35, 2017.

BEKENDAM, R. H. et al. A substrate-driven allosteric switch that enhances PDI catalytic activity. **Nature communications**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2016.

BENHAM, A. M. et al. Ero1–PDI interactions, the response to redox flux and the implications for disulfide bond formation in the mammalian endoplasmic reticulum. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 368, n. 1617, p. 20110403, 2013.

BI, J.-J.; YI, L. Effects of integrins and integrin $\alpha v \beta 3$ inhibitor on angiogenesis in cerebral ischemic stroke. **Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]**, v. 34, n. 3, p. 299-305, 2014.

BOUCHARABA, A. et al. Platelet-derived lysophosphatidic acid supports the progression of osteolytic bone metastases in breast cancer. **The Journal of clinical investigation**, v. 114, n. 12, p. 1714-1725, 2004.

BRASIL, I. E. incidência de câncer no Brasil| INCA-Instituto Nacional de Câncer. 2020. 2020.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

BURR, R. et al. Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Circulating Tumor Cells, the Precursors of Metastasis. **Adv Exp Med Biol**, v. 1220, p. 11-34, 2020.

CHEN, I. H. et al. 3,4-Methylenedioxy- β -nitrostyrene inhibits adhesion and migration of human triple-negative breast cancer cells by suppressing $\beta 1$ integrin function and surface protein disulfide isomerase. **Biochimie**, v. 110, p. 81-92, Mar 2015.

CHIANG, S. P.; CABRERA, R. M.; SEGALL, J. E. Tumor cell intravasation. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 311, n. 1, p. C1-C14, 2016.

CI, Y. et al. Myricetin suppresses breast cancer metastasis through down-regulating the activity of matrix metalloproteinase (MMP)-2/9. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 7, p. 1373-1381, 2018.

DARBY, N. J.; CREIGHTON, T. E. Functional properties of the individual thioredoxin-like domains of protein disulfide isomerase. **Biochemistry**, v. 34, n. 37, p. 11725-11735, 1995.

DARDIK, R. et al. Thrombin promotes platelet-mediated melanoma cell adhesion to endothelial cells under flow conditions: role of platelet glycoproteins P-selectin and GPIIb-IIIa. **Br J Cancer**, v. 77, n. 12, p. 2069-75, Jun 1998.

DASGUPTA, A.; LIM, A. R.; GHAJAR, C. M. Circulating and disseminated tumor cells: harbingers or initiators of metastasis? **Molecular Oncology**, v. 11, n. 1, p. 40-61, 2017/01/01 2017.

DAVIS, P. J. et al. Platelet ATP, thyroid hormone receptor on integrin $\alpha v \beta 3$ and cancer metastasis. **Hormones and Cancer**, v. 11, n. 1, p. 13-16, 2020.

DESGROSELLIER, J. S.; CHERESH, D. A. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 1, p. 9-22, Jan 2010.

DEVI, K. P. et al. Molecular mechanisms underlying anticancer effects of myricetin. **Life sciences**, v. 142, p. 19-25, 2015.

DURÁN-SAENZ, N. Z. et al. Platelet Membrane: An Outstanding Factor in Cancer Metastasis. **Membranes**, v. 12, n. 2, p. 182, 2022.

DURRANT, T. N.; VAN DEN BOSCH, M. T.; HERS, I. Integrin $\alpha(IIb)\beta(3)$ outside-in signaling. **Blood**, v. 130, n. 14, p. 1607-1619, Oct 5 2017.

ECHTLER, K. et al. Platelet GPIIb supports initial pulmonary retention but inhibits subsequent proliferation of melanoma cells during hematogenic metastasis. **PLoS One**, v. 12, n. 3, p. e0172788, 2017.

ELLGAARD, L.; RUDDOCK, L. W. **The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties.** 2005. 28-32

ESSEX, D. W.; WU, Y. Multiple protein disulfide isomerases support thrombosis. **Current opinion in hematology**, v. 25, n. 5, p. 395-402, 2018.

FAN, Y.; SIMMEN, T. Mechanistic Connections between Endoplasmic Reticulum (ER) Redox Control and Mitochondrial Metabolism. **Cells**, v. 8, n. 9, p. 1071, 2019.

FARES, J. et al. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. **Signal Transduct Target Ther**, v. 5, n. 1, p. 28, Mar 12 2020.

FELDING-HABERMANN, B. et al. Integrin activation controls metastasis in human breast cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 4, p. 1853-8, Feb 13 2001.

FILARDO, E. J. et al. Requirement of the NPXY motif in the integrin beta 3 subunit cytoplasmic tail for melanoma cell migration in vitro and in vivo. **J Cell Biol**, v. 130, n. 2, p. 441-50, Jul 1995.

FLAUMENHAFT, R.; FURIE, B.; ZWICKER, J. I. Therapeutic implications of protein disulfide isomerase inhibition in thrombotic disease. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 35, n. 1, p. 16-23, 2015.

FRIEDRICH, J. et al. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. **Nature Protocols**, v. 4, p. 309, 02/12/online 2009.

GACHET, C. Antiplatelet drugs: which targets for which treatments? **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 13, p. S313-S322, 2015.

GANDALOVIČOVÁ, A. et al. Cell polarity signaling in the plasticity of cancer cell invasiveness. **Oncotarget**, v. 7, n. 18, 2016.

GASPAR, R. S. et al. Myricetin, the Main Flavonoid in Syzygium cumini Leaf, Is a Novel Inhibitor of Platelet Thiol Isomerases PDI and ERp5. **Front Pharmacol**, v. 10, p. 1678, 2019.

GIANNONI, E.; PARRI, M.; CHIARUGI, P. EMT and oxidative stress: a bidirectional interplay affecting tumor malignancy. **Antioxidants & redox signaling**, v. 16, n. 11, p. 1248-1263, 2012.

GOPLEN, D. et al. Protein disulfide isomerase expression is related to the invasive properties of malignant glioma. **Cancer research**, v. 66, n. 20, p. 9895-9902, 2006.

GREK, C.; TOWNSEND, D. Protein disulfide isomerase superfamily in disease and the regulation of apoptosis. **Endoplasmic reticulum stress in diseases**, v. 1, n. 1, p. 4-17, 2014.

GRIESS, P. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselky und Benedikt ueber einege Azoverbindungen. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 12, p. 426-428, 1879.

HAIDARI, M. et al. Integrin $\alpha 2 \beta 1$ mediates tyrosine phosphorylation of vascular endothelial cadherin induced by invasive breast cancer cells. **J Biol Chem**, v. 287, n. 39, p. 32981-92, Sep 21 2012.

HASSAN, S. M. et al. Protective effects of apigenin and myricetin against cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 766-774, 2017.

HATAHET, F.; RUDDOCK, L. W. Protein disulfide isomerase: a critical evaluation of its function in disulfide bond formation. **Antioxidants & redox signaling**, v. 11, n. 11, p. 2807-2850, 2009.

HEGERFELDT, Y. et al. Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, beta1-integrin function, and migration strategies. **Cancer Res**, v. 62, n. 7, p. 2125-30, Apr 1 2002.

HSUCHEN, C.-C.; FEINGOLD, D. S. Selective Membrane Toxicity of the Polyene Antibiotics: Studies on Lecithin Membrane Models (Liposomes). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 4, n. 3, p. 309-315, 1973.

HU, Y. et al. The regulation of nitric oxide in tumor progression and therapy. **Journal of International Medical Research**, v. 48, n. 2, p. 0300060520905985, 2020.

HUANG, J. et al. Platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$: signal transduction, regulation, and its therapeutic targeting. **Journal of hematology & oncology**, v. 12, n. 1, p. 1-22, 2019.

HULVAT, M. C. Cancer incidence and trends. **Surgical Clinics**, v. 100, n. 3, p. 469-481, 2020.

INCA. Incidência do Câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. 2016. **Rio Janeiro. Disponível em**, 2020.

JACOB, A.; PREKERIS, R. The regulation of MMP targeting to invadopodia during cancer metastasis. **Front Cell Dev Biol**, v. 3, p. 4, 2015.

JASUJA, R. et al. Protein disulfide isomerase inhibitors constitute a new class of antithrombotic agents. **The Journal of clinical investigation**, v. 122, n. 6, p. 2104-2113, 2012.

JIANG, M. et al. Anti-tumor effects and associated molecular mechanisms of myricetin. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 120, p. 109506, 2019/12/01/ 2019.

JIAO, D.; ZHANG, X. D. Myricetin suppresses p21-activated kinase 1 in human breast cancer MCF-7 cells through downstream signaling of the β -catenin pathway. **Oncol Rep**, v. 36, n. 1, p. 342-348, 2016/07/01 2016.

KAUSHIK, N. et al. Responses of Solid Tumor Cells in DMEM to Reactive Oxygen Species Generated by Non-Thermal Plasma and Chemically Induced ROS Systems. **Scientific Reports**, v. 5, p. 8587, 02/26/online 2015.

KIM, K. et al. Platelet protein disulfide isomerase is required for thrombus formation but not for hemostasis in mice. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 122, n. 6, p. 1052-1061, 2013.

KNICKLE, A. et al. Myricetin-induced apoptosis of triple-negative breast cancer cells is mediated by the iron-dependent generation of reactive oxygen species from hydrogen peroxide. **Food and Chemical Toxicology**, v. 118, p. 154-167, 2018/08/01/ 2018.

LABELLE, M.; BEGUM, S.; HYNES, R. O. Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. **Cancer cell**, v. 20, n. 5, p. 576-590, 2011.

LÄUBLI, H.; BORSIG, L. Selectins promote tumor metastasis. **Semin Cancer Biol**, v. 20, n. 3, p. 169-77, Jun 2010.

LAVERGNE, M. et al. Platelet integrins in tumor metastasis: do they represent a therapeutic target? **Cancers**, v. 9, n. 10, p. 133, 2017.

LIN, L. et al. Quercetin-3-rutinoside inhibits protein disulfide isomerase by binding to its b' x domain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 39, p. 23543-23552, 2015.

LIU, Y. et al. Platelet-mediated tumor metastasis mechanism and the role of cell adhesion molecules. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 167, p. 103502, 2021/11/01/ 2021.

LOU, X.-L. et al. Interaction between circulating cancer cells and platelets: clinical implication. **Chinese Journal of Cancer Research**, v. 27, n. 5, p. 450, 2015.

LOVAT, P. E. et al. Increasing melanoma cell death using inhibitors of protein disulfide isomerases to abrogate survival responses to endoplasmic reticulum stress. **Cancer research**, v. 68, n. 13, p. 5363-5369, 2008.

MAGGIOLINI, M. et al. The red wine phenolics piceatannol and myricetin act as agonists for estrogen receptor α in human breast cancer cells. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 35, n. 2, p. 269-281, 01 Oct. 2005 2005.

MAMMADOVA-BACH, E. et al. Platelet glycoprotein VI promotes metastasis through interaction with cancer cell-derived galectin-3. **Blood**, v. 135, n. 14, p. 1146-1160, 2020.

MANES, T. et al. Alpha(v)beta3 integrin expression up-regulates cdc2, which modulates cell migration. **J Cell Biol**, v. 161, n. 4, p. 817-26, May 26 2003.

MARINGE, C. et al. The impact of the COVID-19 pandemic on cancer deaths due to delays in diagnosis in England, UK: a national, population-based, modelling study. **The lancet oncology**, v. 21, n. 8, p. 1023-1034, 2020.

MASI, I. et al. Tumor Cellular and Microenvironmental Cues Controlling Invadopodia Formation. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, 2020-October-15 2020.

MASSAGUÉ, J.; OBENAUF, A. C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. **Nature**, v. 529, n. 7586, p. 298-306, Jan 21 2016.

MATHERS, C. D. et al. Global burden of disease in 2002: data sources, methods and results. **Geneva: World Health Organization**, v. 54, 2003.

MBEUNKUI, F.; JOHANN, D. J. Cancer and the tumor microenvironment: a review of an essential relationship. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 63, n. 4, p. 571-582, 2009.

MENDOZA-ALMANZA, G. et al. Role of platelets and breast cancer stem cells in metastasis. **World J Stem Cells**, v. 12, n. 11, p. 1237-1254, Nov 26 2020.

MENTER, D. G. et al. Platelet "first responders" in wound response, cancer, and metastasis. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 36, n. 2, p. 199-213, 2017.

MOR-COHEN, R. Disulfide bonds as regulators of integrin function in thrombosis and hemostasis. **Antioxidants & redox signaling**, v. 24, n. 1, p. 16-31, 2016.

NARAYANAN, D.; MA, S.; ÖZCELIK, D. Targeting the redox landscape in cancer therapy. **Cancers**, v. 12, n. 7, p. 1706, 2020.

NIECKNIG, H. et al. Role of reactive oxygen species in the regulation of HIF-1 by prolyl hydroxylase 2 under mild hypoxia. **Free radical research**, v. 46, n. 6, p. 705-717, 2012.

NOIVA, R. Protein disulfide isomerase: The multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 10, n. 5, p. 481-493, 10// 1999.

NOWAK, R.; OLECH, M.; NOWACKA, N. Plant polyphenols as chemopreventive agents. **Polyphenols in human health and disease**, p. 1289-1307, 2014.

PALACIOS-ACEDO, A. L. et al. Platelets, Thrombo-Inflammation, and Cancer: Collaborating With the Enemy. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 2019-July-31 2019.

PERVIN, S. et al. Nitric oxide in physiologic concentrations targets the translational machinery to increase the proliferation of human breast cancer cells: involvement of mammalian target of rapamycin/elf4E pathway. **Cancer Research**, v. 67, n. 1, p. 289-299, 2007.

PIRNESKOSKI, A. et al. Molecular characterization of the principal substrate binding site of the ubiquitous folding catalyst protein disulfide isomerase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 11, p. 10374-10381, 2004.

PLOW, E. F. et al. Ligand binding to integrins. **J Biol Chem**, v. 275, n. 29, p. 21785-8, Jul 21 2000.

POPIELARSKI, M. et al. The role of Protein Disulfide Isomerase and thiol bonds modifications in activation of integrin subunit alpha11. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 495, n. 2, p. 1635-1641, Jan 8 2018.

POPIELARSKI, M. et al. Modifications of disulfide bonds in breast cancer cell migration and invasiveness. **Am J Cancer Res**, v. 9, n. 8, p. 1554-1582, 2019.

PUROHIT, V.; SIMEONE, D. M.; LYSSIOTIS, C. A. Metabolic Regulation of Redox Balance in Cancer. **Cancers (Basel)**, v. 11, n. 7, Jul 8 2019.

SAHA, S. K. et al. Correlation between oxidative stress, nutrition, and cancer initiation. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 7, p. 1544, 2017.

SAITO, R. et al. Platelets enhance malignant behaviours of gastric cancer cells via direct contacts. **Br J Cancer**, v. 124, n. 3, p. 570-573, Feb 2021.

SAJEDI, N. et al. Myricetin Exerts its Apoptotic Effects on MCF-7 Breast Cancer Cells through Evoking the BRCA1-GADD45 Pathway. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 21, n. 12, p. 3461-3468, Dec 1 2020.

SALEH, N. A. Cultura celular tridimensional: desenvolvimento de um modelo para avaliação da relação entre o microambiente tumoral e a ação de novos agentes antitumorais. 2017.

SCHROEDER, J. Influência da adesão às recomendações da World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research (WCRF/AICR) sobre biomarcadores de estresse oxidativo, mortalidade, sobrevida e recidiva em mulheres com câncer de mama. 2021.

SIMON, H.-U.; HAJ-YEHIA, A.; LEVI-SCHAFFER, F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. **Apoptosis**, v. 5, n. 5, p. 415-418, 2000.

SLISKOVIC, I.; MUTUS, B. Reversible inhibition of caspase-3 activity by iron (III): potential role in physiological control of apoptosis. **FEBS letters**, v. 580, n. 9, p. 2233-2237, 2006.

SMEDA, M. et al. The endothelial barrier and cancer metastasis: Does the protective facet of platelet function matter? **Biochemical pharmacology**, v. 176, p. 113886, 2020.

SOŚNIAK, J.; OPIELA, J. 3D Cell Culture Technology—A New Insight Into in Vitro Research—A Review. **Annals of Animal Science**, v. 21, n. 4, p. 1257-1273, 2021.

SOUSA, H. et al. Novel antiplatelet role for a protein disulfide isomerase-targeted peptide: evidence of covalent binding to the C-terminal CGHC redox motif. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 15, n. 4, p. 774-784, 2017.

STOLL, S. et al. Myricetin inhibits panel of kinases implicated in tumorigenesis. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 125, n. 1, p. 3-7, 2019.

STRILIC, B.; OFFERMANN, S. Intravascular survival and extravasation of tumor cells. **Cancer cell**, v. 32, n. 3, p. 282-293, 2017.

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

SUYENAGA, E. S. et al. Beyond Organoleptic Characteristics: The Pharmacological Potential of Flavonoids and their Role in Leukocyte Migration and in L-Selectin and β 2-Integrin Expression During Inflammation. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 9, p. 1406-1411, 2014.

SWIATKOWSKA, M. et al. Ero1alpha is expressed on blood platelets in association with protein-disulfide isomerase and contributes to redox-controlled remodeling of α IIb β 3. **J Biol Chem**, v. 285, n. 39, p. 29874-83, Sep 24 2010.

SWIATKOWSKA, M. et al. Interaction and functional association of protein disulfide isomerase with α V β 3 integrin on endothelial cells. **Febs j**, v. 275, n. 8, p. 1813-23, Apr 2008.

TAHERIAN, A. et al. Differences in integrin expression and signaling within human breast cancer cells. **BMC Cancer**, v. 11, p. 293, Jul 13 2011.

THOMAS, D. D. et al. Hypoxic inducible factor 1 α , extracellular signal-regulated kinase, and p53 are regulated by distinct threshold concentrations of nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 24, p. 8894-8899, 2004.

TÍMÁR, J. et al. Platelet-mimicry of cancer cells: epiphenomenon with clinical significance. **Oncology**, v. 69, n. 3, p. 185-201, 2005.

TU, B. P.; WEISSMAN, J. S. The FAD-and O₂-dependent reaction cycle of Ero1-mediated oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. **Molecular cell**, v. 10, n. 5, p. 983-994, 2002.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-biological interactions**, v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.

VAN ZIJL, F.; KRUPITZA, G.; MIKULITS, W. Initial steps of metastasis: Cell invasion and endothelial transmigration. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 728, n. 1, p. 23-34, 2011/07/01/ 2011.

VUKOVIC, N. L. et al. Cytotoxic, proapoptotic and antioxidative potential of flavonoids isolated from propolis against colon (HCT-116) and breast (MDA-MB-231) cancer cell lines. **Food Research International**, v. 106, p. 71-80, 2018/04/01/ 2018.

WANG, L. et al. Reconstitution of human Ero1-L α /protein-disulfide isomerase oxidative folding pathway in vitro: position-dependent differences in role between the a and a' domains of protein-disulfide isomerase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 1, p. 199-206, 2009.

WARD, L. S. Entendendo o processo molecular da tumorigênese. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 2002.

WEN, Z. et al. A spheroid-based 3-D culture model for pancreatic cancer drug testing, using the acid phosphatase assay. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 46, n. 7, p. 634-642, 2013.

WENG, A. et al. The toxin component of targeted anti-tumor toxins determines their efficacy increase by saponins. **Molecular oncology**, v. 6, n. 3, p. 323-332, 2012.

WIERSMA, V. R. et al. Mechanisms of Translocation of ER Chaperones to the Cell Surface and Immunomodulatory Roles in Cancer and Autoimmunity. **Frontiers in Oncology**, v. 5, n. 7, 2015-January-29 2015.

WU, S.-D. et al. Role of the microenvironment in hepatocellular carcinoma development and progression. **Cancer treatment reviews**, v. 38, n. 3, p. 218-225, 2012.

XIONG, G. et al. Hsp47 promotes cancer metastasis by enhancing collagen-dependent cancer cell-platelet interaction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 7, p. 3748-3758, 2020.

XU, S. et al. Discovery of an orally active small-molecule irreversible inhibitor of protein disulfide isomerase for ovarian cancer treatment. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 40, p. 16348-16353, 2012.

XU, S.; SANKAR, S.; NEAMATI, N. Protein disulfide isomerase: a promising target for cancer therapy. **Drug discovery today**, v. 19, n. 3, p. 222-240, 2014.

XU, X. et al. Pathophysiological roles of cell surface and extracellular protein disulfide isomerase and their molecular mechanisms. **British Journal of Pharmacology**, v. 178, n. 15, p. 2911-2930, 2021.

XU, X. R. et al. Platelets and platelet adhesion molecules: novel mechanisms of thrombosis and anti-thrombotic therapies. **Thrombosis journal**, v. 14, n. 1, p. 37-46, 2016.

XUE, W. et al. Novel myricetin derivatives: design, synthesis and anticancer activity. **European journal of medicinal chemistry**, v. 97, p. 155-163, 2015.

YAO, Y. et al. Development of a myricetin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex: Preparation, characterization, and evaluation. **Carbohydrate polymers**, v. 110, p. 329-337, 2014.

YAP, M. L. et al. Targeting activated platelets: a unique and potentially universal approach for cancer imaging. **Theranostics**, v. 7, n. 10, p. 2565, 2017.

YAP, M. L. et al. Activated platelets in the tumor microenvironment for targeting of antibody-drug conjugates to tumors and metastases. **Theranostics**, v. 9, n. 4, p. 1154, 2019.

YOBOUE, E. D.; SITIA, R.; SIMMEN, T. Redox crosstalk at endoplasmic reticulum (ER) membrane contact sites (MCS) uses toxic waste to deliver messages. **Cell Death Dis**, v. 9, n. 3, p. 331, Feb 28 2018.

ZEESHAN, H. M. A. et al. Endoplasmic Reticulum Stress and Associated ROS. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p. 327, 2016.

ZHAO, F. et al. Roles for GP IIb/IIIa and $\alpha v\beta 3$ integrins in MDA-MB-231 cell invasion and shear flow-induced cancer cell mechanotransduction. **Cancer Lett**, v. 344, n. 1, p. 62-73, Mar 1 2014.

ZHU, G. et al. The integrin PSI domain has an endogenous thiol isomerase function and is a novel target for antiplatelet therapy. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 129, n. 13, p. 1840-1854, 2017.

ZHU, G. et al. The integrin PSI domain has an endogenous thiol isomerase function and is a novel target for antiplatelet therapy. **Blood**, v. 129, n. 13, p. 1840-1854, Mar 30 2017.

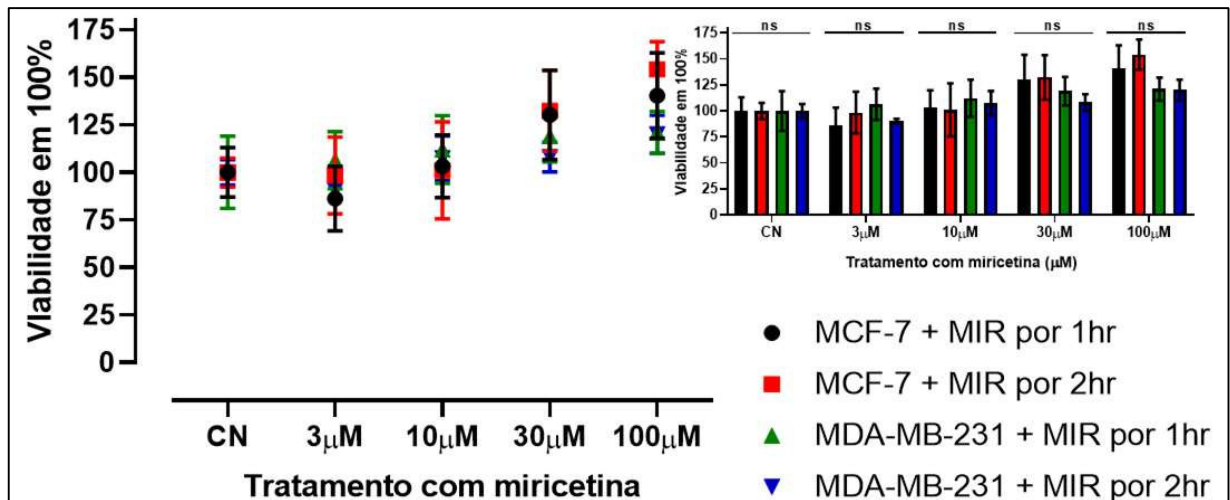


Figura Suplementar 1. Morte induzida pela miricetina em exposição de 1 ou 2 horas. Uma placa de 96 poços foi utilizada para acomodar a suspensão de células tumorais (MCF-7 ou MDA-MB-231) com uma concentração inicial ajustada para 1×10^3 células por poço e dividido em quatro grupos. Dois grupos (MCF-7 e MDA-MB-231 por 1 hr) foram expostos à miricetina por uma hora, em concentrações finais crescentes de 3, 10, 30 e 100 µM, comparados com o grupo controle de morte (CP-DMSO 10%) e não tratado com miricetina (CN). Os dois grupos restantes (MCF-7 e MDA-MB-231 por 2 hr) foram expostos à miricetina, por duas horas, em concentrações finais crescentes de 3, 10, 30 e 100 µM, comparados com o grupo controle de morte (CP-DMSO 10%) e não tratado com miricetina (CN). Após o tempo de exposição final das células tumorais. O número total de células vivas foi estimado usando o ensaio de MTT e analisados no programa Prisma GraphPad 8.0. A significância das diferenças foi calculada usando one-way ANOVA e o pós-teste de comparações múltiplas de Tukey com a correção de Bonferroni para comparações múltiplas. Dados apresentados como média + DP de três experimentos independentes e os valores representados por ns, *, **, *** e ****, representam valores de $p > 0,05$, $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente.

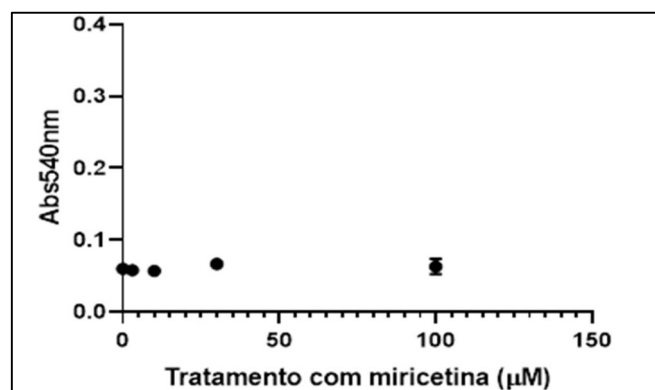


Figura Suplementar 2. Interferência da miricetina no ensaio de morte celular por MTT. Uma placa de 96 poços foi utilizada para acomodar concentrações finais crescentes de miricetina de 3, 10, 30 e 100 µM, diluídos em meio DMEM, comparados com o grupo controle negativo (CN-Meio DMEM). Após o tempo de exposição do meio à miricetina, foi executado o protocolo de estimativa do número total de células vivas pelo ensaio de MTT e analisados no programa Prisma GraphPad 8.0. A significância das diferenças foi calculada usando one-way ANOVA e o pós-teste de comparações múltiplas de Tukey com a correção de Bonferroni para comparações múltiplas. Dados apresentados como média + DP de três experimentos independentes e os valores representados por ns, *, **, *** e ****, representam valores de $p > 0,05$, $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente.

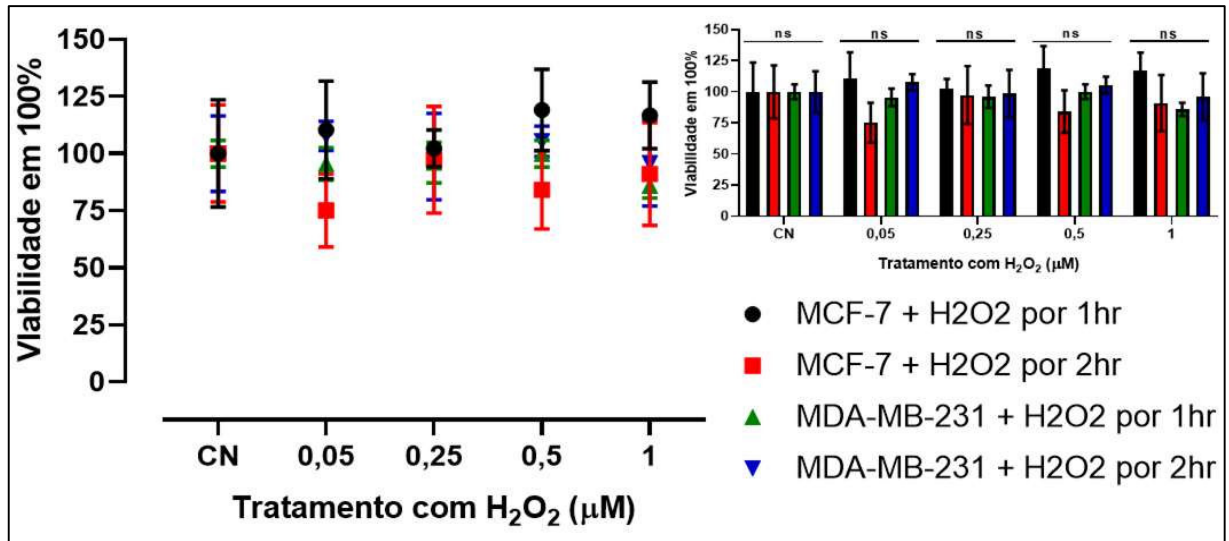


Figura Suplementar 3. Interferência da exposição a H₂O₂ no ensaio de morte celular por MTT. Uma placa de 96 poços foi utilizada para acomodar a suspensão de células tumorais (MCF-7 ou MDA-MB-231) com uma concentração inicial ajustada para 1×10^3 células por poço e dividido em quatro grupos. Dois grupos (MCF-7 e MDA-MB-231 por 1 hr) foram expostos à H₂O₂ por uma hora, em concentrações finais crescentes de 0,05; 0,25; 0,5; e 1 μM, comparados com o grupo controle de morte (CP-DMSO 10%) e não tratado com miricetina (CN). Os dois grupos restantes (MCF-7 e MDA-MB-231 por 2 hr) foram expostos à H₂O₂ por duas horas, em concentrações finais crescentes de 0,05; 0,25; 0,5; e 1 μM, comparados com o grupo controle de morte (CP-DMSO 10%) e não tratado com miricetina (CN). Após o tempo de exposição final das células tumorais. O número total de células vivas foi estimado usando o ensaio de MTT e analisados no programa Prisma GraphPad 8.0. A significância das diferenças foi calculada usando one-way ANOVA e o pós-teste de comparações múltiplas de Tukey com a correção de Bonferroni para comparações múltiplas. Dados apresentados como média + DP de três experimentos independentes e os valores representados por ns, *, **, *** e ****, representam valores de $p > 0,05$, $p < 0,05$, $< 0,01$, $< 0,001$ e $< 0,0001$, respectivamente.