

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
TESE DE DOUTORADO

Mitose assimétrica e biomecânica da matriz extracelular alteram a performance migratória em células tumorais

Maurício Tavares Tamborindeguy

Orientador: Dr. Guido Lenz
Co-orientador: Dr. Marcelo Lazzaron Lamers

PORTO ALEGRE
Setembro de 2023.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
TESE DE DOUTORADO

Mitose assimétrica e biomecânica da matriz extracelular alteram a performance migratória em células tumorais

Maurício Tavares Tamborindeguy

Orientador: Dr. Guido Lenz
Co-orientador: Dr. Marcelo Lazzaron Lamers

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

PORTO ALEGRE
Setembro de 2023.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brasil), no Núcleo de Pesquisa Básica em Odontologia, situado na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brasil) e no *Sanford Consortium for Regenerative Medicine* do Departamento de Bioengenharia da Universidade da Califórnia San Diego (San Diego, EUA). Foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente aos meus pais João Carlos e Laura Maria, e ao meu irmão Vinícius, por estarem sempre ao meu lado, confiando, apoiando, incentivando, acreditando em mim e investindo na minha formação. Obrigado por todas as oportunidades que vocês me proporcionaram durante toda minha vida! Amo vocês!

Aos meus orientadores, Guido Lenz e Marcelo Lamers, pela orientação e colaboração no desenvolvimento deste trabalho, bem como, contribuição para minha formação.

Ao meu supervisor de doutorado sanduiche, Adam Engler, por ter me dado a oportunidade de fazer pesquisa na University of California San Diego, e sua colaboração ao presente trabalho.

Aos meus colegas de trabalho do Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular, Laboratório de Migração Celular e do Engler's Lab. Obrigado pelas trocas de experiências, contribuições e apoio ao longo desse período.

Aos amigos que dividiram essa caminhada comigo, daqui de Porto Alegre ou de longe, mas se fazendo sempre presentes, apoiando e me incentivando. Eu tenho muita sorte de ter pessoas como vocês na minha vida!

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS.

Às agências de fomento, CAPES, pela bolsa de doutorado e CNPq pela bolsa de doutorado sanduíche, e que proveram recursos para o desenvolvimento deste trabalho.

Muito obrigado!

APRESENTAÇÃO DA TESE

A presente tese de doutorado encontra-se estruturada em capítulos, conforme o seguinte formato:

CAPÍTULO I

Introdução

Hipótese

Objetivo geral e específicos

CAPÍTULO II

Manuscrito

CAPÍTULO III

Manuscrito referente ao período de doutorado sanduíche

CAPÍTULO IV

Discussão

Conclusão

Referencias bibliográficas

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
ABREVIATURAS E SIGLAS.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	13
CAPÍTULO I.....	14
1 MIGRAÇÃO CELULAR.....	15
1.1 Processo de migração celular individual e sua coordenação por sinalização celular.....	16
1.2 Processo de migração celular coletiva.....	21
2 CÂNCER.....	22
3 INVASÃO E METÁSTASE.....	24
3.1 Início do processo de metástase.....	26
3.2 Migração e invasão celular tumoral.....	27
3.3 Transição epitélio mesenquimal.....	29
3.3.1 Indução de EMT no câncer.....	31
3.4 Matriz extracelular.....	32
3.4.1 Composição da matriz extracelular.....	33
3.4.2 A matriz extracelular e sua influência na migração.....	35
3.4.3 Rigidez da matriz extracelular e sua influência no câncer.....	35
3.5 Intravasão.....	37
3.6 Células tumorais circulantes e sua sobrevivência.....	38
3.7 Extravasão e colonização em tecidos distantes.....	39
4 HETEROGENEIDADE TUMORAL.....	41
4.1 Heterogeneidade intratumoral e migração celular.....	43
4.2 Impacto da mitose na heterogeneidade intratumoral.....	45
5 EPIGENÉTICA NO CÂNCER.....	46
5.1 Alterações epigenéticas.....	46
5.2 Reprogramação epigenética não mutacional.....	47
5.2.1 Reprogramação epigenética de mecanismos do microambiente tumoral.....	48
5.2.2 Reprogramação epigenética de células do microambiente tumoral.....	49
5.2.3 Reprogramação epigenética de migração e metástase.....	49
5.2.4 Reprogramação epigenética e heterogeneidade tumoral.....	50
6 HIPÓTESE.....	53
7 OBJETIVOS.....	54
8 CAPÍTULO II.....	56
9 CAPÍTULO III.....	68
10 CAPÍTULO VI.....	94

DISCUSSÃO	95
CONCLUSÃO	104
11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
12 CURRÍCULO VITAE	117

RESUMO

No câncer, a migração celular contribui para a metástase. A heterogeneidade na capacidade de migração pode produzir células individuais com capacidade aumentada levando a invasão e metástase. Além disso, ambientes rígidos induzem uma taxa maior de migração, fenótipo invasivo e modulação de marcadores de transição epitelial-mesenquimal (EMT) em células de carcinoma espinocelular oral (OSCC). Nossa hipótese é que as características de migração celular podem se dividir assimetricamente na mitose, permitindo que um subconjunto de células tenha uma contribuição maior para invasão e metástase. Através de vídeos *time-lapse*, analisamos o fenótipo de migração de linhagens celulares tumorais (A172, MCF7, SCC25) e normais (MRC5 e CHO·K1). Observamos que as células filhas tinham um fenótipo migratório diferente das mães, e uma única mitose é suficiente para que as irmãs se comportem como células não relacionadas. No entanto, a mitose não influenciou a área celular e a dinâmica de polaridade. Em seguida, levantamos a hipótese de que a consolidação da memória mecânica requer mudanças epigenéticas que permitem que as células tumorais imprimam de forma persistente o processo de “aprendizagem” de ambientes rígidos. Analisamos os efeitos de moduladores epigenéticos durante a aquisição de memória mecânica em células OSCC. Uma matriz extracelular rígida (ECM) (20 kPa), aumentou a trimetilação e acetilação de H3K9 e acetilação de H3K27 em Cal27. A inibição das histonas desacetilases (HDACs), histonas acetilases (HATs) e histonas lisina metil transferases (KMTs) não afetou a migração celular durante o condicionamento em ambiente rígido. No entanto, o inibidor de HDAC produziu um aumento na velocidade de migração das células Cal27 quando condicionadas em ambientes macios. A inibição de HAT e KMT na ECM rígida levou ao aumento da expressão de N-caderina, bem como a um aumento da expressão transcricional de Snail-1. Isto indica que o desempenho da migração não é herdável e que a mitose assimétrica pode ter um impacto importante na invasão e metástase do câncer, produzindo células com capacidade migratória diferente e propomos que a consolidação da memória mecânica no OSCC envolve alterações epigenéticas que reflete a expressão alterada de marcadores EMT.

ABSTRACT

In cancer, cell migration contributes to the spread of tumor cells resulting in metastasis. Heterogeneity in the migration capacity can produce individual cells with heightened capacity leading to invasion and metastasis. Also, stiff environments induce a higher migration rate, an invasive phenotype and modulation of epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers in oral squamous cell carcinoma cells (OSCC). Here our first hypothesis is that cell migration characteristics can divide asymmetrically in mitosis, allowing a subset of cells to have a larger contribution to invasion and metastasis. Through time-lapse videos, we analyzed migration phenotype of (A172, MCF7, SCC25) and two normal cell lines (MRC5 and CHO-K1 cells). We observed that daughter cells had a different migratory phenotype compared to their mothers, and one single mitosis is enough for the sisters behave like nonrelated cells. However, mitosis did not influence cell area and polarity dynamics. Then we hypothesized that the consolidation of the mechanical memory requires epigenetic changes that enables tumor cells to imprint in a persistent way the “learning” process from stiff environments. We analyzed the effects of inhibitors/activators of epigenetic players during the acquisition of mechanical memory in OSCC cells. A stiff extracellular matrix (ECM) (20 kPa), increased H3K9 tri-methylation and acetylation, and H3K27 acetylation in Cal27 cells. The inhibition of histone deacetylases (HDACs), histone acetylases (HATs) and histone lysine methyl transferases (KMTs) did not affect the cell migration during conditioning on stiff environment. However, Cal27 cells treated with HDAC inhibitor showed an increase on migration speed when challenged by soft environments. HAT and KMT inhibition on stiff ECM led to a further upregulation of N-cadherin expression, as well as an increased transcriptional expression of Snail-1. Together, these findings indicates that migration performance is not heritable, and that asymmetric cell division might have an important impact on cancer invasion and metastasis, by producing cells with different migratory capacity and we propose that the consolidation of mechanical memory in OSCC involves epigenetic changes that reflects altered EMT markers expression.

ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT – Serina/Treonina quinase AKT (*AKT Serine/Threonine kinase*)
aPKC – Proteína quinase C atípica (*Atypical protein kinase C*)
ASCL1 – Homólogo 1 de Achaete-scute (*Achaete-scute homolog 1*)
ATACseq – Sequenciamento de
ATP – Adenosina trifosfato (*Adenosine triphosphate*)
CAF – Fibroblasto associado ao câncer (*Cancer-associated Fibroblast*)
CBP – Proteína de ligação a CREB (*CREB binding protein*)
CCL – Ligante de quimiocina C (*C-C motif chemokine ligand*)
Cdc42 – RhoGTPase Cdc42
CITs – Células iniciadoras de tumor
COX2 – Ciclo oxigenase 2
CTCs – Células tumorais circulantes
DKK3 – Proteína 3 relacionada a Dickkopf (*Dickkopf-related protein 3*)
ECM – Matriz extracelular (*Extracellular matrix*)
EGFR – Receptor do fator de crescimento epidérmico (*Epidermal growth factor receptor*)
EGF – Fator de crescimento epidérmico (*Epidermal growth factor*)
EMP – Plasticidade epitélio-mesenquimal (*Epithelial-mesenchymal plasticity*)
EMT – Transição epitélio-mesenquimal (*Epithelial-mesenchymal transition*)
EpCAM – Molécula de adesão celular epitelial (*Epithelial cell adhesion molecule*)
EPHB1 – Receptor B1 de Ephrin (*Ephrin receptor B1*)
EREG – Epiregulina (*Epiregulin*)
ERK – Quinase regulada por sinal extracelular (*Extracellular signal-regulated kinase*)
EZH2 – Potencializador do homólogo zeste 2 (*Enhancer of zeste homolog 2*)
FAK – Quinase de adesão focal (*Focal adhesion kinase*)
FAP – Proteína ativadora de fibroblasto (*Fibroblast activation protein*)
FGF – Fator de crescimento de fibroblasto (*Fibroblast growth factor*)
FN-1 – Fibronectina-1
GAGs – Glicosaminoglicanos
GAPs – Proteínas ativadoras de GTPase (*GTPase activating proteins*)
GBM – Glioblastoma multiforme (*Glioblastoma*)
GDI – Inibidor de dissociação de guanosina (*Guanosine dissociation inhibitors*)
GDP – Guanosina difosfato (*Guanosine diphosphate*)
GEFs – Fatores de troca de nucleotídeo guanina (*Guanine nucleotide exchange factors*)
GFAP – Proteína ácida fibrilar glial (*Glial fibrillary acidic protein*)
GSK β 3 – *Glycogen synthase kinase β 3*
GTP – Guanosina trifosfato (*Guanosine triphosphate*)
HAT – Acetilase de histona (*Histone acetylase*)
HDAC – Desacetilase de histona (*Histone deacetylase*)
HES6 – Fator de transcrição 6 da família HES (*HES Family transcription factor 6*)
HGF – Fator de crescimento de hepatócito (*Hepatocyte growth factor*)

HIF – Fator de indução de hipóxia (*Hypoxia inducible factor*)
HMT – Metiltransferase de histone (*Histone methyltransferases*)
ID1 – Índice de diferenciação 1
IGF – Fator de crescimento de insulina (*Insuline like growth factor*)
IL – Interleucina (*Interleukyne*)
INCA – Instituto Nacional do Câncer
JAM 1A – Molécula de adesão juncional 1A (*Junctional adhesion molecule 1A*)
KDM – Demetilase de lisina (*Lysine demethylase*)
KMT – Metiltransferase de lisina (*Lysine methyltransferase*)
LDHA – Lactato desidrogenase A (*Lactate dehydrogenase A*)
LEF8 – Fator de expressão tardio 8 (*Late expression fator 8*)
LLC – Leucemia linfóide crônica
LOX – Lisil oxidase
MAPK – Proteína quinase ativada por mitógenos (*Mitogen activated protein kinase*)
MDSCs – Células supressoras derivadas de mielóides (*Myeloid derived suppressor cells*)
MET – Transição mesenquimal epitelial (*Mesenchymal-epithelial transition*)
miRNA – microRNA
MLC2 – Miosina de cadeia leve 2 (*Myosin light chain 2*)
MMP – Metaloproteases de matriz (*Matrix metalloproteases*)
MMPis – Inibidores de metaloproteases de matriz (*Matrix metalloproteases inhibitors*)
mRNA – RNA mensageiro (*Messenger RNA*)
MYC – Proto oncogene MYC
N-WASP – Proteína nuclear da Síndrome de Wiskott Aldrich (*Nuclear Wiskott Aldrich Syndrome Protein*)
NEPC – Câncer de próstata neuroendócrino (*Neuroendocrine prostate cancer*)
NEUROD1 – Fator de diferenciação neurogênica 1 (*Neurogenic differentiation 1*)
NFAT – Fator nuclear de células T ativas (*Nuclear factor of activated T cells*)
NFκB – Fator nuclear kappa B (*Nuclear factor kappa B*)
NKX21 – *NK1 homeobox 2*
OSCC – Carcinoma espinocelular oral (*Oral squamous cell carcinoma*)
PAAGs – Géis de ácido poli acrílico (*Poly acrylic acid gels*)
PAR – Proteínas PAR (*PAR proteins*)
PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas (*Platelet-derived growth factor*)
pEMT – Transição epitélio mesenquimal parcial
Pi – Fosfato inorgânico
PKC – Proteína quinase C (*Protein kinase C*)
Rac – RhoGTPase Rac
RACK – Receptor da quinase 1 ativada (*Receptor for activated kinase 1*)
Rap1 – Proteína 1 associada a Ras (*Ras associated protein 1*)
Rho – Homólogo Ras Family (*Ras homolog family*)
RNAseq – Sequenciamento de RNA (*RNA sequencing*)
ROCK – Quinase associada a Rho (*Rho associated kinase*)
SETD1B – *SET domain containing 1B*
SLRP – Proteoglicanos pequenos ricos em leucina (*Small leucine rich proteoglycan*)

Src – Proteína quinase Src
TAMs – Macrófagos associados ao tumor (*Tumor associated macrophages*)
TAZ – Proteína TAZ (*PDZ binding domain*)
TBC1D15 – Membro 15 da família de domínio TBC (*TBC domain family member 15*)
TCF – Fator de proteína de célula T (*T cell factor protein*)
TCGA – *The cancer genome atlas*
TFs – Fatores de transcrição (*Transcription factors*)
TGF β – Fator de crescimento transformador β (*Transforming growth factor β*)
TNF α – Fator de necrose tumoral α (*Tumor necrosis factor α*)
TSA – Tricostatina A (*Thricostatin A*)
UTX – *Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat on chromatin X*
VEGF – Fator de crescimento edotelial vascular (*Vascular endothelial growth factor*)
VEGFR – Receptor do fator de crescimento edotelial vascular (*Vascular endothelial growth factor receptor*)
WASP – Proteína da Síndrome de Wiskott Aldrich (*Nuclear Wiskott Aldrich Syndrome Protein*)
YAP – Proteína YAP (*Yes associated protein*)
ZO-1 – *Zona occludens 1*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de migração de uma célula única -----	Pág. 21
Figura 2. Novas dimensões dos <i>Hallmarks</i> do Câncer -----	Pág. 24
Figura 3. Etapas do processo de metástase -----	Pág. 25
Figura 4. Processo de Transição epitélio-mesenquimal -----	Pág. 30

CAPÍTULO I

Neste capítulo serão discutidos a base teórica e o estado da arte de tópicos envolvidos nos projetos de pesquisa que foram desenvolvidos durante o período de doutorado, bem como minhas hipóteses e objetivos de trabalho.

1 MIGRAÇÃO CELULAR

A migração celular é um processo dinâmico e complexo que permite que as células mudem sua posição e alcancem um determinado ambiente para executar suas funções, se mover individualmente ou em conjunto, além de interagir mecânica e quimicamente com células vizinhas e componentes estruturais do tecido onde se situam (TE BOEKHORST; PREZIOSI; FRIEDL, 2016). Essencial para a manutenção e desenvolvimento de organismos multicelulares, a migração celular é um processo que está envolvido em questões fisiológicas como desenvolvimento embrionário (KANAMORI *et al.*, 2019), resposta imune (LIU, J. *et al.*, 2021), cicatrização de feridas (ZHANG *et al.*, 2023), reparo e regeneração tecidual (LOESEL *et al.*, 2023), como em patologias como imunodeficiências (JANSSEN; GEHA, 2019), doenças crônicas inflamatórias (MUSIAŁ; ZWOLIŃSKA, 2019) e câncer (JOO *et al.*, 2023). Existem vários estímulos intracelulares e extracelulares que definem o movimento de uma célula e de acordo com o contexto em que estão inseridas, a migração pode ocorrer de maneira individual, chamada migração de células únicas, ou coletiva (VICENTE-MANZANARES; HORWITZ, 2011).

Células únicas se utilizam de dois modos principais de migração celular: ameboide e mesenquimal. A migração do tipo ameboide tem como característica o *bebbling*, adesões fracas e rápida motilidade. Sendo que, as células que migram dessa maneira se deformam através de poros e fibras da matriz extracelular (ECM). Por outro lado, a migração do tipo mesenquimal se caracteriza por fibras de estresse fortes, polarização e a célula apresenta região frontal e traseira bem definidas. Além disso, uma célula que migra de maneira mesenquimal degrada a ECM ao seu redor, gerando e expandindo seu trajeto (LINTZ; MUÑOZ; REINHART-KING, 2017a).

Um conjunto de células que migram como se fosse uma unidade multicelular única migra de maneira coletiva. A migração coletiva é um mecanismo básico de migração celular que ocorre durante a morfogênese, o reparo tecidual e até durante a invasão de células tumorais (LINTZ; MUÑOZ; REINHART-KING, 2017b). No caso desse tipo de migração, as células precisam manter os contatos célula-célula, exibir

uma polarização em grupo com assimetria definindo a região frontal e traseira e conseqüentemente migrar como uma única unidade multicelular se diferenciando do padrão de migração de células únicas (KHALIL; FRIEDL, 2010). Existem variedades de modo de migração coletiva, como: migração em folhas, fitas, tubos ou *clusters* (FRIEDL, 2004). Devido a plasticidade e dinamicidade da migração celular, as células podem alternar migrando individualmente ou de maneira coletiva (FRIEDL; ALEXANDER, 2011).

O processo de migração de uma célula envolve múltiplos estágios: polarização celular, formação de protruções na membrana celular e formação e desmontagem de adesões (GUAN *et al.*, 2020). Esses estágios estão integrados e regulados por uma família de moléculas de sinalização, e serão discutidos a seguir.

1.1 Processo de migração celular individual e sua coordenação por sinalização celular

A migração de células únicas em um substrato se caracteriza por um ciclo que pode ser dividido em cinco etapas e coordenado por moléculas de sinalização. Apesar da descrição do movimento ser dividida em etapas, os eventos desse ciclo de migração ocorrem simultaneamente e influenciam as outras etapas, ou seja, não são uma série de movimentos sequenciais e dependentes (SENGUPTA; PARENT; BEAR, 2021). Esse ciclo compreende a formação de protrusão de membrana celular, formação de adesão célula-ECM, contração do citoesqueleto, translocação do corpo celular e retração da traseira da célula (VICENTE-MANZANARES; HORWITZ, 2011).

A direção do movimento da migração vai ser indicada pela polaridade da célula. A polaridade na migração estabelece as diferenças estruturais, moleculares e funcionais entre a região frontal da célula, direção do movimento que a célula irá realizar, e sua região traseira. Sinais intracelulares e do ambiente externo vão ditar a polaridade de uma célula. O ambiente externo emite sinais a partir da adesão da célula ao substrato, o contato lateral com outras células do tecido e gradientes de estímulo quimiotáticos promovem a distribuição assimétrica de receptores e adaptadores

celulares que vão colaborar com a polarização (CAMPANALE; SUN; MONTELL, 2017). Enquanto, o ambiente intracelular define a polarização a partir de moléculas sinalizadoras da família RhoGTPase, Cdc42 é a RhoGTPase que recruta as proteínas envolvidas na polarização, como a PAR3, PAR6 e PKCs atípicas. Cdc42 também atua no posicionamento do núcleo e orientação dos microtúbulos no citoplasma, além de controlar a maquinaria de polimerização de actina na frente da célula (WARNER; WILSON; CASWELL, 2019). Ainda não foi elucidado como Cdc42 é ativada inicialmente, porém já está descrito que a RhoGTPase Rap1 é necessária para a ativação de Cdc42 em algumas células. Cdc42 pode promover a nucleação de redes dendríticas via efeito de WASP e N-WASP, que por sua vez, promove ativação de Rac. A ativação conjunta de Cdc42 e Rac promove a extensão de protrusões na direção de migração dando início ao processo de migração de uma célula, desta maneira determinando a região frontal. Na definição da parte traseira da célula, acontece a ativação de RhoA, que é correlacionada inversamente com a atividade de Rac. RhoA promove a formação de feixes de actomiosina maiores e mais espessos porque organiza os filamentos de actina através de ativação da miosina II. Os feixes de actomiosina maiores e mais espessos resultam em adesões mais estáveis, que se desmontam lentamente, e evitam a formação de protrusões (GUAN *et al.*, 2020). Uma vez ativas Cdc42 e Rac1 promovem a formação da protrusão no lamelipódio da célula e a migração é iniciada.

Protrusões são extensões da membrana da célula que são projetadas ao sentido da direção estabelecida pela polaridade celular que ocorre de maneira exploratória sem nenhum estímulo direcional, ou em resposta a sinais quimioatraentes extracelulares (VICENTE-MANZANARES; WEBB; HORWITZ, 2005). A força que causa a formação dessa projeção é fornecida pelo citoesqueleto de actina, que de maneira dinâmica se polimeriza empurrando a membrana celular. A polimerização da actina ocasiona uma tensão celular e faz com que as protrusões se anexem ao substrato. Os filamentos de actina são formados por subunidades monoméricas de actina globular (actina-G) que se ligam em razão da hidrólise de ATP e são como o esqueleto das protrusões. Durante a polimerização o ATP ligado a actina-G é

hidrolisado a ADP + fosfato inorgânico (Pi), ao passo que se formam a ligação aos dois monômeros. O ADP + Pi da actina forma filamentos estáveis, enquanto que, a liberação do fosfato desestabiliza a estrutura e causa a despolimerização. Concomitantemente a isso, outros filamentos de actina se polimerizam e se associam lateralmente formando feixes, também chamados de fibras de estresse (KADZIK; HOMA; KOVAR, 2020). Isso depende de ação de proteínas de ligação a actina como miosina, α -actinina, filaminas e outras, determinando a polaridade dessas protrusões que se formam (VICENTE-MANZANARES; WEBB; HORWITZ, 2005). O processo de formação de protrusões é dinâmico devido a rede de actina, e os feixes de actina são reciclados a partir de proteínas como a cofilina. A cofilina tem dois modos de ação, no primeiro ela cria extremidades livres nos filamentos de actina para ser reiniciada a polimerização, no segundo, a proteína quebra e despolimeriza redes antigas para reciclagem de monômeros de actina-G (ULLO; LOGUE, 2021).

Por fim, as protrusões formadas na membrana precisam se estabilizar na ECM, ou seja, formar adesões estáveis, caso contrário elas tendem a se retrair em ondas em sentido contrário a migração devido a tensão gerada intracelularmente. A adesão célula-ECM é fundamental para a migração e integridade de tecidos (MERINO-CASALLO *et al.*, 2022).

A adesão célula-ECM são sítios de convergência que ocorre entre o citoesqueleto de actina e proteínas da ECM. As primeiras estruturas observadas nesse processo são as adesões nascentes, pequenas adesões que surgem dentro do lamelipódio e são altamente transientes, se estabelecendo ou se desmontando. No estágio precoce de maturação formam-se os complexos focais, que geralmente se situam no limite entre o lamelipódio e o corpo da célula, estruturalmente maiores que adesões nascentes e são miosina dependentes (VICENTE-MANZANARES; HORWITZ, 2011). As adesões em seu estágio inicial aparecem rapidamente e seu *turnover* dinâmico se correlaciona com rápida formação de protrusões e movimento celular. Quando acontece a maturação dessas adesões, elas são denominadas adesões focais, estão usualmente ligadas a fibras de estresse de actomiosina

contráteis e largas, se correlacionando com uma velocidade menor do movimento da célula (VICENTE-MANZANARES; WEBB; HORWITZ, 2005).

O processo de adesão celular é coordenado pela interação entre proteínas estruturais e de sinalização, como integrinas, proteínas ligantes a actina, FAK e paxilina (GAHMBERG; GRÖNHOLM, 2022).

As integrinas são proteínas de adesão receptoras heterodiméricas compostas por subunidade α e β (ambas transmembranas). São responsáveis por manter a interação entre célula e ECM, através do citoesqueleto de actina e proteínas presentes na ECM. Integrinas atuam como receptores regulatórios, por causa de sua cauda citoplasmática que pode ser modulada de acordo com sinais recebidos, fazendo então com que a adesão se mantenha ou seja desfeita (KECHAGIA; IVASKA; ROCA-CUSACHS, 2019).

Algumas das proteínas que interagem com a cauda citoplasmática das integrinas também interagem direta ou indiretamente com a actina, como talina, vinculina e α -actinina (CHINTHALAPUDI; RANGARAJAN; IZARD, 2018; MERINO-CASALLO *et al.*, 2022).

Moléculas de sinalização também se associam e modulam a dinâmica de adesões. A tirosina-quinase FAK é recrutada no estágio inicial de formação de adesão, ativada por auto-fosforilação ou por quinases da família Src. FAK controla a ativação da RhoA através da ligação de GEFs e GAPs, e recruta e fosforila outras proteínas de adesão como a paxilina (GAHMBERG; GRÖNHOLM, 2022). A paxilina é uma fosfoproteína que tem habilidade de recrutar efetores que ativam Rac. Essa proteína cria sítios de ligação para o recrutamento de outras proteínas de adesão e reguladores de sinalização através de múltiplos resíduos fosforilados de tirosina ou serina/treonina (JANISZEWSKA; PRIMI; IZARD, 2020; WARNER; WILSON; CASWELL, 2019).

O processo dinâmico de montagem e desmontagem de adesões além de regular a estabilização de protrusões vai fazer com que a célula contraia e retraia seu corpo celular para que ela consiga migrar (VICENTE-MANZANARES; WEBB; HORWITZ, 2005).

Para a retração do corpo celular acontecer é necessária a contração coordenada do citoesqueleto de actina e desmontagem de adesões na traseira da célula. A desmontagem das adesões depende dos seguintes mecanismos: contração do citoesqueleto de miosina, desmontagem de adesões induzidas por microtúbulos, endocitose de receptores de adesão e clivagem proteolítica de proteínas de adesão (MERINO-CASALLO *et al.*, 2022). A maquinaria celular contrátil pode induzir a desmontagem de adesões a partir de RhoA e miosina II. FAK e a proteína dinamina são responsáveis por promover a desmontagem de adesões que foram estabelecidas por microtúbulos (JANISZEWSKA; PRIMI; IZARD, 2020b). A reciclagem e endocitose de integrinas regulam o *turnover* das adesões. Especificamente, a endocitose mediada por clatrina, que internaliza e recicla integrinas $\beta 1$, tem se mostrado uma via de desmontagem de um conjunto específico de adesões (GAHMBERG; GRÖNHOLM, 2022). Além disso, a clivagem de proteínas como talina, paxilina e FAK, através da ação de calpaina, é um ponto crítico para a desmontagem de adesões que levam a retração da traseira celular durante a migração (STORR *et al.*, 2011; VICENTE-MANZANARES; WEBB; HORWITZ, 2005).

O ciclo de migração de uma célula é regulado por moléculas de sinalização chamadas RhoGTPases (GUAN *et al.*, 2020). A superfamília de proteínas RhoGTPases é composta por 20 proteínas que regulam a formação de protrusão de membranas, adesão e polarização celular, e estão envolvidas em vias de sinalização iniciadas por receptores. São classificadas em subfamílias denominadas: Rac, Rho, Cdc42, Rnd e RhoBTB (DONNELLY; BRAVO-CORDERO; HODGSON, 2014).

As RhoGTPases funcionam como um interruptor molecular, ou seja, podem ser ativas ou inativas de acordo com fatores de troca de nucleotídeos guanina, chamados GEFs, e proteínas ativadoras de RhoGTPases, os GAPs. GEFs ativam as RhoGTPases por catalisar a troca do GDP por GTP, enquanto GAPs inativam RhoGTPases por promover a hidrólise de GTP em GDP. Ainda existe também o inibidor de dissociação de nucleotídeos guanina, o GDI, que bloqueia ligação ao GTP ou GDP, bloqueando a atividade da proteína, logo, bloqueando a sinalização celular (GUAN *et al.*, 2020).

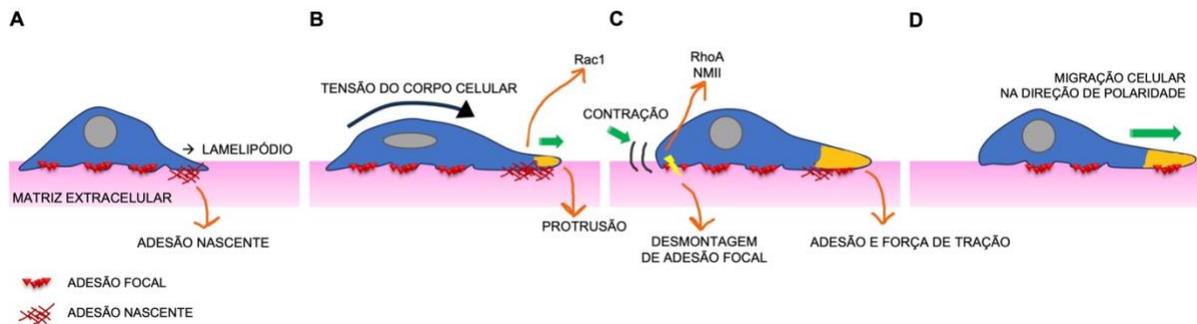


Figura 1. Dinâmica de migração celular. **A.** A célula emite uma extensão da membrana em direção a polaridade da célula, formando o lamelipódio. **B.** Ocorre polimerização da actina e se formam as adesões nascentes. **C.** As adesões nascentes maturam em adesões focais, que geram força tracional e a partir da miosina II ocorre a contração da célula. **D.** A célula transloca seu corpo celular e retrai a traseira, resultando na sua migração.

1.2 Processo de migração celular coletiva

Células tumorais que migram de maneira coletiva se tornam mais agressivas e resistentes a terapia (CLARK; VIGNJEVIC, 2015). Esse tipo de migração é caracterizado por um grupo de células que mantém as adesões célula-célula por um longo período e entre células vizinhas apresentam correlação na direção em que se movimentam (PENG; VERMOLEN; WEIHS, 2023). O grupo de células migra coletivamente em forma de filamentos lineares estreitos conduzidos por uma célula líder, no formato de cordões, tubos ou *clusters* (PALMIERO *et al.*, 2023). As células desses grupos podem exibir ambos os fenótipos epiteliais ou mesenquimais e esse fenótipo pode diferir entre células líderes, localizadas a frente do grupo, e células seguidoras, que se posicionam atrás das células líderes (CAMPANALE; MONTELL, 2023). Essas células crescem, depositam matriz, realinham as fibras de estresse e potencializam a proliferação celular (KHALIL; FRIEDL, 2010).

Dentro de um grupo celular migrando coletivamente, cada célula efetua os mesmos mecanismos que uma célula única usaria para se mover, no entanto, em um grupo de células coesas, os contatos celulares modificam a distribuição das características clássicas encontradas em células migrando isoladamente

(CAMPANALE; MONTELL, 2023). Células líderes estão expostas a níveis mais altos de sinais externos como quimioatraentes, e desempenham o papel de remodelar a ECM, detectando o ambiente e assim controlando a direção e velocidade de migração (PENG; VERMOLEN; WEIHS, 2023). A coordenação do citoesqueleto de actomiosina é essencial para que essa migração seja efetiva e é coordenada pelas RhoGTPases. As células líderes apresentam fenótipo mesenquimal com protruções controladas através da Rac1 (WARNER; WILSON; CASWELL, 2019). Nas células seguidoras, a P-caderina, uma molécula de adesão célula-célula ativa Cdc42, gerando forças mecânicas nas junções célula-célula e controlando a polarização celular resultando na indução da migração coletiva (SENGUPTA; PARENT; BEAR, 2021). A contratilidade do citoesqueleto de actomiosina cortical mediado por Cdc42-MRCK e Rho-ROCK em regiões laterais de grupos celulares permitem o movimento coletivo em células tumorais (WARNER; WILSON; CASWELL, 2019). Além disso, células seguidoras podem influenciar o comportamento de células líderes para modular a direção do movimento coletivo (PENG; VERMOLEN; WEIHS, 2023). Similar ao que acontece na migração de células únicas, a contratilidade mediada por Rho-ROCK é responsável pela retração da traseira de grupos de células migratórias (ISOZAKI *et al.*, 2020).

Nota-se que as RhoGTPases são de importância na regulação da migração de células únicas e na migração coletiva. E, em uma situação em que o organismo multicelular se encontra em desordem como no câncer, essas moléculas podem atuar contribuindo para sinalização favorável a iniciação e progressão tumoral (CROSAS-MOLIST *et al.*, 2022).

2 CÂNCER

O câncer é considerado um conjunto de doenças caracterizado pelo crescimento desregulado de células que invadem tecidos e órgãos (INCA, 2023). As células tumorais dividem-se rapidamente, são agressivas e desreguladas, formam tumores e podem se espalhar para outras partes do corpo (HAUSMAN, 2019). Um dos principais problemas de saúde mundial, o câncer, é uma das principais causas de

mortes no mundo, barrando o aumento da expectativa de vida. Ainda, o impacto da incidência e das mortes causada pelo câncer está aumentando rapidamente no cenário mundial (SUNG *et al.*, 2021). Dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para 2023, estimam-se que ocorrerão 704 mil casos novos de câncer no Brasil. Os tipos mais frequentes em homens serão o de pele não melanoma (102 mil novos casos), próstata (72 mil novos casos), cólon e reto (22 mil novos casos), pulmão (18 mil novos casos), estômago (13 mil novos casos) e cavidade oral (11 mil novos casos). Em mulheres, os tipos de câncer mais frequentes serão o de pele não melanoma (118 mil novos casos), mama (74 mil novos casos), cólon e reto (24 mil novos casos), colo do útero (17 mil novos casos), pulmão (15 mil novos casos) e tireoide (14 mil novos casos) (INCA, 2023).

Existem um conjunto de capacidades cruciais que uma célula precisa adquirir à medida que ela se transforma de um estado normal para um estado de crescimento neoplásico, e se tornam capazes de formarem tumores, determinadas “*Hallmarks* do câncer” (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Os “*Hallmarks* do câncer” compreendem dez capacidades biológicas adquiridas durante o desenvolvimento de tumores humanos, são elas: sustentação da sinalização proliferativa, evasão de supressores de crescimento, resistência a morte celular, imortalidade replicativa, indução de angiogênese, ativação de invasão e metástase, evasão do sistema imune, desregulação celular energética, mutações e instabilidade genômica, e por fim, inflamação promotora de tumor. Recentemente, com a progressão do conhecimento dos mecanismos tumorais, foi proposto um novo conjunto de quatro novas capacidades funcionais: desbloqueio da plasticidade fenotípica, reprogramação epigenética não mutacional, microbioma polimórficos e células senescentes (HANAHAN, 2022).



Figura 2. Novas dimensões dos *Hallmarks* do câncer. Temos a esquerda, diversas características em comuns que são necessárias para o desenvolvimento e progressão do câncer propostas em 2000 e 2011 por Hanahan e Weinberg. A direita, temos a representação das quatro características emergentes propostas por Hanahan em 2022, são elas: desbloqueio da plasticidade fenotípica, reprogramação epigenética não mutacional, microbioma polimórficos e células senescentes. Adaptada de HANAHAN, 2022.

No entanto, a estocasticidade no início do desenvolvimento do câncer reforça o senso que seu desenvolvimento e progressão não tem fluxo cíclico e sim, uma desestabilização integrada de processos celulares, mostrando-se uma desordem bastante dinâmica (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Após a transformação maligna, a dinamicidade da progressão tumoral gera uma massa tumoral heterogênea consistindo em células tumorais carregando assinaturas moleculares distintas entre si, resultando na heterogeneidade tumoral (DAGOGO-JACK; SHAW, 2018). A heterogeneidade tumoral contribui para resistência do tumor a terapia, e tem papel chave na formação de metástases (GREAVES, 2015).

3 INVASÃO E METÁSTASE

Além de ser descrito como uma doença de proliferação e crescimento descontrolado o câncer é também uma doença de migração celular descontrolada.

Com as desregulações causadas pela doença, algumas das células acabam adquirindo uma taxa de migração maior, invadem tecidos e se estabelecem em órgãos distantes, formando metástases (YAMAGUCHI; WYCKOFF; CONDEELIS, 2005). A cascata metastática atualmente já deixou de ser entendida como um processo linear e sim como uma série de mecanismos simultâneos e parcialmente sobrepostos (SUHAIL *et al.*, 2019). Embora inerentemente ineficiente, o processo de metástase quando bem-sucedido faz com que o paciente tenha um prognóstico pior e normalmente torna o câncer incurável (ECCLES; WELCH, 2007). Uma série de mecanismos celulares são necessários para uma célula tumoral colonizar um órgão distante e estão compreendidos nas seguintes etapas: migração e invasão tumoral, intravasão na corrente sanguínea e/ou vasos linfáticos, deslocamento de células tumorais circulantes (CTCs), extravasão e colonização de sítios secundários (COX *et al.*, 2018).

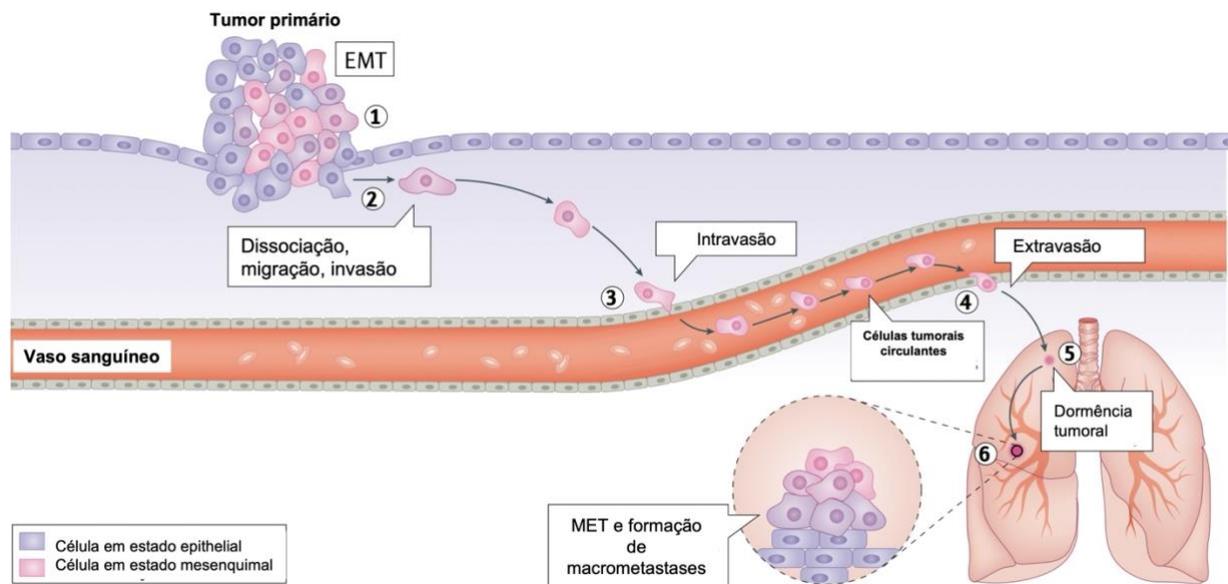


Figura 3. Etapas do processo de metástase. (1) O escape inicial do tumor primário depende da perda das junções célula-célula favorecendo a motilidade e para poder degradar a membrana basal e matriz extracelular. (2) Quebra das barreiras físicas permitem que as células tumorais migrem e invadam dentro de tecidos normais. (3) Ocorre a intravasão, onde as células tumorais atravessam o endotélio, penetram na corrente sanguínea ou vasos linfáticos e entram na circulação sistêmica. (4) As CTCs

que conseguem sobreviver na corrente sanguínea realizam a extravasão através do endotélio capilar de órgãos distantes. (5) No novo microambiente, um pequeno conjunto de células tumorais se estabelece em período de dormência. (6) As células se estabelecem e proliferam formando micrometástases e progridem para tumores secundários malignos clinicamente detectáveis e completam o processo. Figura adaptada de YANG et al., 2020.

3.1 Início do processo de metástase

A iniciação da metástase não é compreendida como um simples evento autônomo celular porque além deste fato, é um evento influenciado por um microambiente tecidual complexo (VALASTYAN; WEINBERG, 2011). As células tumorais possuem uma capacidade única de se adaptar morfológicamente a diferentes condições do microambiente, assumindo características a fim de permanecerem móveis, ocasionando instabilidade cromossômica e alteração de expressão gênica (BAKHOUM et al., 2018). A progressão da metástase é impactada por interações entre células tumorais, fibroblastos associados ao câncer (CAFs), células endoteliais e imunes, arquitetura da MEC e tensão de oxigênio no microambiente tumoral (SUHAIL *et al.*, 2019).

O fenótipo metastático pode ser promovido por fatores de transcrição como o HIF (fator de indução de hipóxia). Sua estabilização pode desencadear a troca de uma migração de células coletiva para ameboide, uma vez que a tensão de oxigênio flutua dentro do tumor o que leva a uma sinalização entre células mesenquimais e tumorais estimulando a migração (LEHMANN *et al.*, 2017).

Células imunes associadas ao tumor podem ser estimuladas por moléculas secretadas por células tumorais, o lactato por exemplo, estimula macrófagos do tumor a promover angiogênese, um requisito para metástases distantes (COLEGIO *et al.*, 2014).

Em suma, a decisão de uma célula de fazer metástase depende da carga mutacional e epigenética celular bem como de fatores extrínsecos como interações bidirecionais entre células tumorais e não tumorais, influência do microambiente tumoral ajustado pela bioquímica e biomecânica da ECM e disponibilidade de fatores

de crescimento e citocinas, adicionando uma camada a mais de complexidade ao processo.

3.2 Migração e invasão tecidual

Migrar e abandonar o tumor primário é o primeiro passo que uma célula tem de fazer para realizar metástase, isso só é possível através de mecanismos celulares dependentes da contratilidade celular que possibilitam a migração, como a adesão, degradação da ECM e enfraquecimento de adesão célula-célula para se dissociar do epitélio adjacente (COX *et al.*, 2018). Durante o início da migração as células mudam sua polaridade, morfologia e ativam várias vias de sinalização que controlam a dinâmica do citoesqueleto. Células tumorais formam estruturas chamadas invadopodia, protruções envolvidas na degradação de ECM, além disso, formam *blebs*, protruções esféricas causadas pelo aumento da pressão hidrostática devido a alta contratilidade do citoesqueleto de actomiosina, resultando na perda de adesão (WARNER; WILSON; CASWELL, 2019; YAMAGUCHI; WYCKOFF; CONDEELIS, 2005).

Para a célula começar o processo de metástase, ela vai depender da regulação por moléculas sinalizadoras como as RhoGTPases, que facilitam diversas funções pro-tumorais, diferente do processo de migração normal, a adaptação a fatores extrínsecos permite que as células metastáticas superem obstáculos que normalmente impediriam o movimento e a migração se torna descontrolada (CROSAS-MOLIST *et al.*, 2022). A intercomunicação entre as células da massa do tumor também faz com que uma célula se torne migratória com capacidade de metástase. CAFs com características contráteis demonstram habilidade em degradar, depositar e remodelar a ECM, eles coordenam o alinhamento final da matriz desenhando um caminho de migração direcional para as células do tumor (SANTI; KUGERATSKI; ZANIVAN, 2018). As células tumorais utilizam a regulação de MLC2 dependente de Cdc42/MRCK para seguirem os trajetos gerados pelos CAFs na ECM, enquanto a modulação de MLC2 dependente de Rho-RACK controla a remodelação

da ECM nos fibroblastos. Além disso, foi demonstrado que a invasão coletiva em carcinoma de células escamosas, ocorre a partir de um fibroblasto líder, que devido a ativação da via Rho-ROCK promove a geração de um trajeto na ECM permitindo que as células tenham uma migração direcional (GAGGIOLI *et al.*, 2007).

A célula invasora além de degradar a ECM, precisa romper a membrana basal, que é a barreira física que existe delimitando os tecidos (YANG *et al.*, 2020).

A membrana basal é composta por duas redes de polímeros interconectados compostos por laminina e colágeno IV, apresentando poros de aproximadamente 10nm, com a função de fornecer fatores de crescimento (YURCHENCO; RUBEN, 1987). A partir destes poros, diferentes tipos celulares podem se comunicar trocando fatores difusíveis e são capazes de ultrapassar essa membrana, são exemplos leucócitos e células tumorais (TAKEUCHI; GONDA, 2004). À medida que o tumor progride, o estroma sofre alterações em relação a composição de tipos celulares, na composição, estruturação e remodelamento da ECM, e a barreira pode ser rompida por células invasivas. Para romper e ultrapassar a membrana basal, as células tumorais devem ser capazes de: degradação proteolítica, deslocamento local por forças mecânicas e síntese anormal dos constituintes da membrana basal (GLENTIS; GURCHENKOV; VIGNJEVIC, 2014).

A degradação proteolítica dos componentes da membrana basal envolve a formação do invadopodia pela célula tumoral, essas estruturas ricas em actina-F, fornecem uma fonte local de proteases, como as metaloproteases de matriz (MMPs) e FAP, uma serina protease seprase (POINCIUX; LIZÁRRAGA; CHAVRIER, 2009).

O deslocamento local da membrana basal a partir de forças mecânicas exercidas pela célula tumoral é um mecanismo não dependente de degradação, e envolve o movimento ameboide das células através de fibras de colágeno (GADEA *et al.*, 2007).

Por fim, a síntese anormal de membrana basal acontece quando há uma síntese em menor quantidade de laminina e colágeno. O estágio avançado de tumores se correlaciona com a perda da cadeia laminina 332 y2 da membrana basal e sua

retenção no citoplasma (KANG *et al.*, 2013), enquanto em carcinomas o colágeno VII e laminina 511 são quase ausentes na membrana basal (LOHI *et al.*, 2000).

A aquisição de um fenótipo mesenquimal de migração é um dos motivos pelos quais as células tumorais se tornam mais agressivas, em carcinomas, esse fenótipo mesenquimal é causado pelo desenvolvimento de um processo chamado de transição epitélio mesenquimal.

3.3 Transição epitélio-mesenquimal

O processo de transição epitélio-mesenquimal (EMT) induz características de um fenótipo mesenquimal em células que previamente apresentavam fenótipos epiteliais, tornando-as mais migratórias e invasivas (YEUNG; YANG, 2017). A transição para o estado mesenquimal é frequentemente incompleta, algumas células vão apresentar um estado intermediário de EMT, ou EMT parcial, apresentando ambas as características epiteliais e mesenquimais. Essa dinamicidade de estados intermediários é denominada plasticidade epitélio mesenquimal (EMP). Além disso, o processo pode ocorrer de maneira reversa, transição mesenquimal-epitelial (MET), destacando a dinamicidade deste evento (YANG *et al.*, 2020).

Diferentes combinações de marcadores mesenquimais e epiteliais podem fornecer indicações acerca de estados celulares críticos subjacentes à disseminação de células neoplásicas. Contudo, ainda há pouca informação do entendimento das diversas configurações desses marcadores em tipos específicos de tumores e em locais receptores. No espectro de EMT, categorias diferentes de estados celulares coexistem, apresentando simultaneamente traços mesenquimais e epiteliais, e esses estados híbridos são mais favoráveis as células do tumor (STEFANIA; VERGARA, 2017). Se observa de maneira frequente a ampliação na capacidade de invasão e migração nas células que transitam para a EMT híbrida, caracterizada pela coexpressão de marcadores tanto mesenquimais quanto epiteliais. A categorização desses estados híbridos pode ser subdividida em fases específicas da EMT, como a epitelial, EMT híbrida precoce, EMT híbrida tardia e EMT completa (PASTUSHENKO;

BLANPAIN, 2019). O fenótipo epitelial se caracteriza por polaridade apico-basal que é mantida pelas interações célula-célula estáveis devido a moléculas de adesão como E-caderina e citoqueratina dentro das junções do tipo *tight*, desmossomos, junções aderentes e junções do tipo *gap*, e pela interação com a membrana basal (NIETO, 2013). Quando sinais indutores de EMT regulam positivamente o grupo de fatores de transcrição indutores de EMT, ocorrem alterações morfológicas, celulares e moleculares. Como resultado, acontece a perda das junções aderentes entre as células, perda da polaridade apico-basal, aquisição de um fenótipo mais mesenquimal e ganho de motilidade e invasão (BRABLETZ *et al.*, 2018).

Durante a EMT, alterações na expressão gênica e em mecanismos pós-traducionais reprimem as características epiteliais e levam a aquisição de características mesenquimais, onde células apresentam uma morfologia e citoarquitetura semelhantes a fibroblastos e capacidade migratória aumentada (CHAFFER *et al.*, 2016).

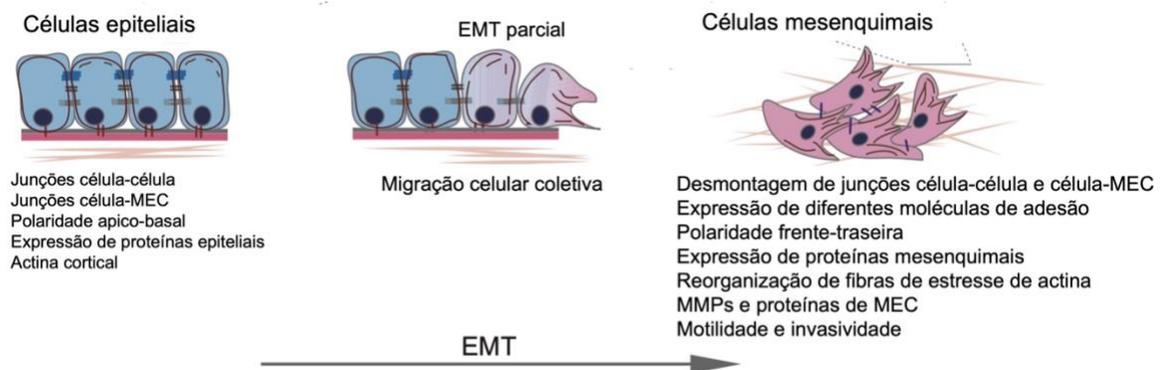


Figura 4. Processo de transição epitélio-mesenquimal. Na EMT a polaridade apico-basal é redirecionada para a polaridade frontal-posterior, ocorrem alterações no citoesqueleto, a expressão gênica é reprogramada e a regulação negativa das junções epiteliais e moléculas de adesão é acompanhada pela expressão de proteínas de adesão mesenquimais. Quando as células migram coletivamente, as células líderes reprimem seus marcadores epiteliais e mostram características mesenquimais. Essas mudanças possibilitam um comportamento celular migratório e invasivo. Adaptada de KATSUNO; DERYNCK, 2021.

3.3.1 Indução de EMT no câncer

Citocinas e fatores de crescimento secretados por células tumorais e do estroma no microambiente tumoral são os principais fatores primários que induzem a EMT. Dentre as moléculas de sinalização que têm se mostrado cooperar em uma rede complexa que determina a ativação de EMT são o TGF- β (Fator de transformação β), Wnt, ligantes de Notch, HIF-1 α , NF κ - β , IL1 β (Interleucina 1 β) e TNF- α (Fator de necrose tumoral α). O TGF- β secretado por células tumorais e por fibroblastos é considerado o indutor primário de EMT (KATSUNO; LAMOUILLE; DERYNCK, 2013). Além disso, uma ampla gama de fatores de crescimento também estão envolvidos, são eles: fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento de insulina (IGF), fator de crescimento de hepatócito (HGF), fator de crescimento de fibroblasto (FGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (CHAFFER *et al.*, 2016).

Fatores de transcrição de EMT (EMT-TFs) são ativados para coordenar esse processo em resposta a vários sinais e vias de sinalização. Os principais EMT-TFs incluem Snail1, Snail2, Twist1, Twist2, Zeb1 e Zeb2 (YEUNG; YANG, 2017). Snail e Zeb tem a habilidade de se ligar às sequências E-box nos promotores de E-caderina, fazendo com que esta molécula não seja expressa, regulando negativamente proteínas de adesão de junção do tipo *tight*, ocludinas, claudinas, ZO-1 e conexinas JAM1/A (BAX *et al.*, 2011). Por sua vez, Twist atua induzindo Snail para reprimir a expressão de E-caderina, além de induzir a degradação da ECM através de invadopodias (WEI *et al.*, 2015). Entretanto, os ativadores de EMT que atuam em diferentes tecidos podem diferir, como no exemplo do modelo de metástase para câncer de mama, onde Snail1 e Twist1 tem importância fundamental na conversão mesenquimal, enquanto se tornam dispensáveis no modelo de câncer de pâncreas que é dependente de Zeb1 (YEUNG; YANG, 2017). Por mais que os EMT-TFs regulem negativamente a expressão de proteínas de adesão célula-célula promovendo a desmontagem das mesmas, a ruptura dessas junções também atua como promotoras de EMT, uma vez que essas proteínas regulam várias vias de sinalização que podem promover mais invasão. A β -catenina liberada de junções de aderência tem como

potencial entrar no núcleo e direcionar a expressão do gene Wnt que acaba sendo expresso positivamente e potencializa a EMT (HOWARD *et al.*, 2011).

A EMT também é controlada por vias regulatórias múltiplas de microRNAs (miRNAs), RNAs longos não codificantes (lncRNAs) e modificações pós-traducionais. A família de microRNAs miR-200 formam um *loop* regulatório de retroalimentação negativa com Zeb1 e Zeb2 e acabam modulando a plasticidade celular entre epitelial e mesenquimal. A degradação do proteossoma mediado por ubiquitinação de Snail1 e Twist1 após fosforilação de GSKB3 ou MAPK também controla a expressão de EMT-TFs (YEUNG; YANG, 2017).

Simultaneamente a perda de marcadores epiteliais e polaridade ápico-basal, as células que sofrem a EMT aumentam sua expressão de marcadores mesenquimais, adotando um novo formato e ganhando potencial migratório (YANG *et al.*, 2020).

À medida que o processo vai ocorrendo há o aumento da expressão de N-caderina, vimentina e fibronectina (BRABLETZ *et al.*, 2018). A rede de citoqueratina ancorada em desmosossomos nas células epiteliais vão sendo destruídas e o aumento na expressão de vimentina leva a reorganização do citoesqueleto de actina cortical em uma rede de filamentos intermediários citoplasmático e basal, o que facilita a motilidade celular e formação de invadopodias para degradar a ECM (YANG *et al.*, 2020). Para concluir a transição, a contratilidade celular é aumentada pela formação de novas fibras de estresse de actina, além das protrusões celulares aumentarem a expressão de MMP2 e MMP9 resultando em um comportamento celular mais invasivo (NILAND; RISCANEVO; EBLE, 2022).

3.4 Matriz extracelular

A matriz extracelular é definida como um componente ativo fisiologicamente de tecidos vivos responsável pela comunicação intercelular, adesão e proliferação celular. Os elementos que compõe a ECM são água, minerais, proteoglicanos e proteínas fibrosas secretadas por células residentes do tecido (WALKER; MOJARES; DEL RÍO HERNÁNDEZ, 2018). Cada órgão possui uma composição única desses elementos

com a finalidade de atender a um propósito específico do tecido, isso é um resultado de uma retroalimentação biofísica e bioquímica dinâmica entre os componentes celulares e seu microambiente (BONNANS; CHOU; WERB, 2014). A ECM tem como característica ser uma estrutura altamente dinâmica, seus componentes estão constantemente submetidos a degradação e modificação através de proteinases, processo este chamado de remodelação de matriz (MOHAN; DAS; SAGI, 2020).

A ECM serve como sítio de ligação e ancoragem para controlar a adesão e o movimento celular. Além da manutenção da integridade estrutural e ancoragem, seus componentes possuem diversos sítios para fatores de crescimento, permitindo o controle de sua secreção e apresentação às células alvo (HARTMAN *et al.*, 2017).

3.4.1 Composição da matriz extracelular

Os seus principais componentes são o colágeno, proteoglicanos, laminina e fibronectina. A produção dessas proteínas fibrosas essenciais é regulada pela ECM e depende dos vários estágios do desenvolvimento embrionário e progressão de doenças como o câncer (WALKER; MOJARES; DEL RÍO HERNÁNDEZ, 2018).

O colágeno é o componente mais abundante da ECM e do tecido humano, tem 28 subtipos e o mais comum é o colágeno do tipo I que está envolvido fortemente em cicatrização de feridas e desenvolvimento de órgãos (MOUW; OU; WEAVER, 2014). MMPs orquestram uma série de clivagens em diferentes tipos de colágenos presentes na ECM formando microfibrilas, que dão estrutura a ECM. Quando formadas, elas podem se ligar a outras microfibrilas já existentes formando fibras largas de sustentação, esse processo é mediado por pequenas proteoglicanas ricas em leucinas (SLRPs), decorin e biglycan, que tem *motifs* de ligação ao colágeno permitindo modular o crescimento, tamanho, morfologia e conteúdo das fibras de colágeno (NAJAFI; FARHOOD; MORTEZAEI, 2019).

Outros constituintes são os proteoglicanos, proteínas que possuem glicosaminoglicanos (GAGs) ligados covalentemente a elas. GAGs são compostos por longas cadeias de repetições dissacarídicas carregadas negativamente, como sulfato

de heparina, sulfato de condroitina/dermatan, hialuronato ou sulfato de queratina. Devido a carga negativa dos GAGs, os proteoglicanos podem sequestrar água e cátions, os conferindo funções de preenchimento de espaço e lubrificação. Duas proteínas proteoglicanas importantes são as sindecans e perlecan, que tem domínios de ligação para GAGs, como o sulfato de heparano se associam a essas proteínas e esse GAG pode ser eliminado pela ação de MMPs, ou então se ligar a receptores de fatores de crescimento, colágeno e outras proteínas da ECM (IOZZO; SCHAEFER, 2015). Resumidamente, os proteoglicanos possuem formas e estruturas variáveis que conferem diferentes funções a ECM.

As lamininas conectam a célula à ECM, essas glicoproteínas triméricas são compostas por cadeia α , β e γ , sendo encontradas com maior frequência na lâmina basal e alguns compartimentos mesenquimais. Tem como função promover adesão, diferenciação, migração, manutenção do fenótipo e dar resistência a apoptose (HOHENESTER; YURCHENCO, 2013). Por meio da ligação com integrinas, elas criam uma ligação dinâmica entre a célula e a ECM, uma vez que lamininas específicas tem interação única com integrinas específicas para permitir a indução de vias de sinalização e organização do citoesqueleto intracelular (WALKER; MOJARES; DEL RÍO HERNÁNDEZ, 2018).

Por fim, a fibronectina atua como uma conexão mecanossensível entre a célula e a ECM, por ser uma proteína multidomínio ela consegue interagir com vários componentes da ECM (MOUW; OU; WEAVER, 2014). A fibronectina possui 20 isoformas apesar de ser codificada por apenas um gene, isso ocorre devido ao processo de *splicing* alternativo do mRNA (SCHWARZBAUER; DESIMONE, 2011). Assim como o colágeno, a fibronectina forma redes fibrilares na matriz e sua montagem é mediada pela ligação das integrinas $\alpha 5\beta 1$ através de um *motif* de ligação RGD e um local de sinergia na molécula de fibronectina (BELLIN *et al.*, 2009)

3.4.2 A matriz extracelular e sua influência na migração

A composição e propriedades físicas da ECM influenciam o trajeto de migração e a velocidade das células migratórias. As células migram de áreas com menor concentração de ECM para áreas com maior concentração devido ao gradiente de adesão. No entanto, se a concentração de ECM for muito alta, a força de adesão pode ser tão forte que a célula se estabiliza e não consegue mais migrar (WALKER; MOJARES; DEL RÍO HERNÁNDEZ, 2018). A velocidade de migração também depende da concentração de ECM, uma vez que esse processo é coordenado pela dinâmica de montagem e desmontagens de adesão na ECM (BONNANS; CHOU; WERB, 2014). Fibroblastos quando cultivados em gradientes de rigidez compostos por fibronectina conseguiram migrar eficientemente, diferente dos cultivados em matrizes cobertos com laminina ou uma mistura de fibronectina/laminina que não migraram (HARTMAN et al., 2017). Além disso, proteases que degradam a ECM facilitam a migração celular por meio de interação com outras enzimas, como MMPs, adamlisinas e meprinas (BONNANS; CHOU; WERB, 2014).

3.4.3 Rigidez da matriz extracelular e sua influência no câncer

O balanço entre degradação e secreção de ECM controlado pelas células que a modificam é responsável pela homeostase tensional que determina características mecânicas da ECM como elasticidade e rigidez (MALIK; LELKES; CUKIERMAN, 2015). A rigidez da ECM é uma característica que diferencia tecidos tumorais de tecidos normais, quando há o enrijecimento da matriz há uma atribuição ao crescimento tumoral, associação ao pior prognóstico e aumento na taxa de metástase (KAI; DRAIN; WEAVER, 2019).

A ECM se torna rígida devido a agregação de proteínas, o *crosslink* e o conteúdo de colágeno tem papel importante nesse processo, sendo que o colágeno é a proteína da matriz dentro do estroma que mais sofre desregulação metabólica (MOHAN; DAS; SAGI, 2020).

A lisil oxidase (LOX) é uma amino oxidase responsável pela reticulação do colágeno e durante o câncer tem sido clinicamente correlacionada com o aumento da fibrose e do risco elevado de surgimento de metástases (ERLER *et al.*, 2009). Foi observado que a alta atividade de LOX presente em bordas invasivas dos tumores impulsiona a polimerização da actina, contratilidade celular e migração, fornecendo um caminho para células tumorais sigam sua trajetória sucessivamente (WEI *et al.*, 2017). A rigidez da ECM aumenta a ativação de integrinas e por consequência a tensão do citoesqueleto mediada por Rho, promovendo formação de adesões focais e motilidade celular (BONNANS; CHOU; WERB, 2014). Fibras de colágeno densas alinhadas atuam como um trajeto para proliferação de células neoplásicas migrem para fora do tumor. No câncer de mama, o tecido colagenoso ao redor de tumores mamários costuma ser espesso, rígido e alinhado perpendicularmente ao limite do tumor, ao contrário de estruturas epiteliais que geralmente apresentam colágeno emaranhado e desorganizado (PROVENZANO *et al.*, 2008). Estudos recentes sugerem que a topografia das fibras da matriz aumenta a eficiência da migração de células tumorais, diminuindo as protuberâncias ao longo da fibra de colágeno e diminuindo a distância percorrida por células migratórias (NAJAFI; FARHOOD; MORTEZAEI, 2019).

Uma vez que a rigidez da ECM contribui para a progressão tumoral, existem enzimas responsáveis por degradar matriz colaborando ao processo, essas são as MMPs (KAI; DRAIN; WEAVER, 2019). Principais enzimas responsáveis por degradar a ECM, as MMPs têm baixa atividade em condições normais, mas em condições patológicas como no câncer sua atividade aumenta (LI; PRITCHARD; YU, 2022). Entre os vários tipos existentes de MMPs, a MMP-2 e -9 são as mais associadas com invasão de células tumorais e metástases (KESSENBROCK; WANG; WERB, 2015). A interação entre células tumorais e células do estroma, incluindo CAFs, macrófagos M2 e células-tronco tumorais resulta na liberação de MMPs. O desequilíbrio entre enrijecimento de matriz pelo *crosslink* de colágeno e degradação de matriz pelas proteases contribui para invasão das células tumorais. Os CAFs e os macrófagos M2, tem papel crucial nesse desbalanço, uma vez que ambos produzem TGF- β , que induz

o enrijecimento e ativa MMPs para ação proteolítica (WALKER; MOJARES; DEL RÍO HERNÁNDEZ, 2018; YANG; PANG; MOSES, 2010).

3.5 Intravasão

Assim que as células formam os invadopodias e atravessam a membrana basal se inicia a intravasão, o processo pelo qual as células tumorais atravessam o endotélio através de migração transendotelial e deixam o tumor primário resultando no início do processo de metástase (SZNURKOWSKA; ACETO, 2022).

Existem três fatores que estão envolvidos na intravasão: as propriedades intrínsecas da célula, o microambiente e fatores mecânicos.

Como propriedades intrínsecas da célula se entendem as mutações genéticas, o perfil de expressão gênica, regulação epigenética e metabolismo. A predisposição de células tumorais a intravasarem na corrente sanguínea está relacionada a expressão de genes específicos, como os genes que codificam as proteínas da via de sinalização Wnt. Em CTCs de modelos de câncer de pâncreas e glioblastoma (GBM), foi demonstrado um aumento na expressão de genes da via da Wnt (YU *et al.*, 2012). Sequenciamento do exoma total de tumores e de CTCs de dois pacientes com câncer de próstata com subsequente análise de SNV destacou mutações no codificador DNAH8 de uma dineína e seu receptor tirosina quinase EPHB1 em CTCs (LOHR *et al.*, 2014).

Células do microambiente tumoral como os fibroblastos, células imunes, adipócitos e pericitos, são outros fatores que colaboram a intravasão. CAFs têm sido apontados como direcionadores de células metastáticas, uma vez que têm sido detectados como partes de *clusters* de CTCs na corrente sanguínea, podendo proteger as CTCs do cisalhamento, isso sugere potencial colaboração na intravasão por estarem associados a essas células (ORTIZ-OTERO *et al.*, 2020). Linfócitos T CD4+ contribuem para uma intravasão potencializada via sinalização direta as células tumorais ou indireta através da regulação de macrófagos associados ao tumor (TAMs)

em estudos que tem como modelo câncer de mama com metástase no pulmão (DENARDO *et al.*, 2009; TAN *et al.*, 2011).

Por fim, fatores mecânicos como a rigidez da ECM, estresse sólido e pressão do fluido intersticial completam os fatores que influenciam na intravasão. A rigidez da ECM acontece pela agregação de proteínas ali presentes muito provavelmente pela atividade de células tumorais e do microambiente (WEI *et al.*, 2017). A ECM rígida pode induzir ativação de CAF de maneira dependente de YAP/TAZ, co-ativadores transcricionais dependentes de estímulos mecânicos, que contribui ainda mais para o aumento de rigidez, fato este que está ligado ao aumento de agressividade a partir do aumento de migração e invasão (CALVO *et al.*, 2013).

3.6 Células tumorais circulantes e sua sobrevivência

As CTCs são células que se desprendem do tumor primário, intravasam e são levadas pela corrente sanguínea ou linfática (SZNURKOWSKA; ACETO, 2022). Embora originadas de seu tumor primário, elas diferem de células tumorais primárias devido as suas propriedades de transição EMT, que as ajudam a se soltar do tumor e a se infiltrar na corrente sanguínea (LIN *et al.*, 2021). As CTCs formam *clusters* para aumentar o potencial metastático e exibem características de células-tronco, o que as tornam mais propensas a iniciar metástases (STUELLEN; PARENT; MONTELL, 2018). Apesar disso, a maioria das CTCs acaba morrendo na circulação, apenas algumas conseguem sobreviver e se infiltrar em órgãos distantes (XU *et al.*, 2021).

A maior parte de CTCs são barradas pela tensão de cisalhamento ou morrem devido a anoikis, um processo de morte celular programada causado pela perda de adesão celular, enquanto circulam no sangue (FENG *et al.*, 2022). Quando as CTCs interagem significativamente com plaquetas, neutrófilos, macrófagos, MDSCs ou CAFs elas evitam a vigilância do sistema imune e conseguem sobreviver. Essas interações e adaptação com o ambiente hostil da corrente sanguínea são cruciais para a adesão às células endoteliais, invasão tecidual e metástases (GARRIDO-NAVAS *et al.*, 2019).

De importância no diagnóstico e prognóstico do câncer, as CTCs são um dos marcadores tumorais na biópsia líquida e fornecem uma janela para monitoramento da progressão tumoral (FENG *et al.*, 2022). A quantidade e o fenótipo das CTCs estão relacionados com a progressão do tumor primário, portanto, observar e analisar o número e o fenótipo dessas células revelam indiretamente a origem das lesões tumorais. O marcador mais comum para identificação de CTCs é o EpCAM, marcador epitelial universal encontrado em tumores de origem epitelial, como o câncer de mama e de próstata. No entanto, é importante ressaltar que o uso do EpCAM como marcador tem suas limitações, sendo restrito a tumores de origem epitelial, não podendo ser utilizados em tumores EpCAM negativos ou com baixa expressão, como tumores neurogênicos (GIRES *et al.*, 2020). A maioria dos marcadores específicos de CTCs está em concordância com marcadores moleculares específicos do tumor de origem (ESLAMI-S; CORTÉS-HERNÁNDEZ; ALIX-PANABIÈRES, 2020).

Por fim, as CTCs que sobrevivem na circulação, conseguem extravasar a corrente sanguínea ou linfática e coloniza tecidos diferentes de seu tumor primário, tendo que enfrentar alguns outros obstáculos.

3.7 Extravasão e colonização em tecidos distantes

As CTCs migram na circulação, e posteriormente se fixam a uma microvasculatura de um órgão distante, e tem a capacidade de iniciar o crescimento intraluminal formando microcolônias que eventualmente rompem as paredes dos vasos circundantes, permitindo o contato direto das células tumorais com o tecido (AL-MEHDI *et al.*, 2000). Contudo, há a possibilidade de células de carcinoma ultrapassar o lúmen do vaso sanguíneo para o parênquima tecidual ao atravessar as células endoteliais e as camadas de pericitos que separam o lúmen do microambiente estromal, em um processo conhecido como extravasão (STUELLEN; PARENT; MONTELL, 2018).

O destino das células tumorais disseminadas em tecidos distantes depende dos microambientes específicos presentes nesses locais metastáticos. Os microvasos

nesses tecidos podem ter diferentes níveis de permeabilidade, como a barreira hematoencefálica no cérebro e a barreira relativamente impermeável nas células endoteliais dos microvasos pulmonares. Por outro lado, o osso e o fígado possuem sinusoides fenestrados altamente permeáveis, que permitem o fácil acesso das células tumorais (NGUYEN; BOS; MASSAGUÉ, 2009). Sendo assim, as características dos microambientes específicos nos locais metastáticos podem influenciar fortemente o destino de células metastáticas.

Com a finalidade de superar as barreiras físicas que atuam em tecidos com baixa permeabilidade microvascular, os tumores primários podem secretar fatores que perturbam esses microambientes distantes e induzem a hiperpermeabilidade vascular, como a Angptl4, epiregulina (EREG), ciclo oxigenase 2 (COX-2), MMP-1 e MMP2, que podem interromper as junções célula-célula endoteliais vasculares pulmonares e promover o extravasamento de células tumorais para os pulmões (GUPTA *et al.*, 2007; PADUA *et al.*, 2008). Além disso, mecanismos dependentes de CCL2 (ligante de quimiocina 2), recrutam monócitos inflamatórios para metástases pulmonares que promovem a extravasão de células tumorais de mama nos pulmões através da secreção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (QIAN *et al.*, 2011).

O microambiente onde ocorre a metástase é muito diferente daquele onde o tumor primário se desenvolveu, o que faz com que as células que metastizaram tenham uma má adaptação a esse novo local. As diferenças incluem os diferentes tipos de células do estroma, constituintes da ECM, fatores de crescimento, citocinas e arquitetura do tecido em si (VALASTYAN; WEINBERG, 2011).

A criação de um nicho pré-metastático, é uma das explicações que resolvem o problema de adaptação das células (PSAILA; LYDEN, 2009). De acordo com esse modelo os tumores primários liberam sinais sistêmicos, possivelmente incluindo a LOX, que induzem a regulação positiva de fibronectina órgão-específica a partir de fibroblastos residentes no tecido. Isso, por sua vez, leva a mobilização de células progenitoras hematopoiéticas que possuem o receptor 1 de VEGF (VEGFR1+) na medula óssea para esses futuros locais de metástase, através da interação da

fibronectina depositada com seu receptor cognato, a integrina $\alpha 4\beta 1$, expressa pelas células progenitoras hematopoiéticas (ERLER *et al.*, 2009).

Ao mesmo tempo, as células tumorais metastáticas devem utilizar programas celulares autônomos para se adaptar as demandas impostas por um tecido diferente. O mecanismo que envolve a ativação de sinalização da tirosina quinase Src é um exemplo, a inibição da atividade prejudica as células de câncer de mama se estabelecerem no osso, demonstrando a necessidade da Src nesse processo (CHAMBERS; GROOM; MACDONALD, 2002). Mesmo assim, a criação desses nichos pré-metastáticos não é garantia de que as células proliferarão e formarão macrometástases, o processo de colonização metastática. As micrometástases podem até proliferar continuamente, entretanto, um aumento líquido em seu número total de células pode não ocorrer devido os efeitos de compensação a uma alta taxa de apoptose (VALASTYAN; WEINBERG, 2011).

A alta capacidade de autorrenovação de células iniciadoras de tumor (CITs) provavelmente está relacionado com o sucesso da colonização metastática. As CITs entram nesse estado devido a promotores de EMT como o ZEB1, Twist e Snail que também foram descobertos por conferir propriedades de autorrenovação a células de carcinoma (THIERY *et al.*, 2009). Além dos EMT-TFs, os fatores de transcrição inibidor de diferenciação 1 (ID1), ID3 e o *homeobox* NKx2-1 regulam a colonização metastática em carcinomas de mama e pulmão, respectivamente ao modular o estado de células tumorais com características de células-tronco (WINSLOW *et al.*, 2011).

Portanto, uma pequena minoria de células tumorais disseminadas pode concluir o processo de metástase gerando metástases clinicamente detectáveis ao solucionar as incompatibilidades do microambiente e ativando vias de autorrenovação.

4 HETEROGENEIDADE TUMORAL

Durante o curso da progressão do câncer, os tumores se tornam mais heterogêneos devido a alterações genéticas, transcriptômicas, epigenéticas e/ou fenotípicas, caracterizando a heterogeneidade tumoral (LAWSON *et al.*, 2018; VITALE

et al., 2021). A heterogeneidade é uma característica intrínseca amplamente difundida no contexto oncológico, e a compreensão das origens e dos mecanismos regulatórios subjacentes a essa heterogeneidade pode proporcionar contribuições para o aprimoramento dos procedimentos diagnósticos e terapêuticos no âmbito do câncer (LENZ *et al.*, 2022).

A nível populacional, a heterogeneidade é dividida em heterogeneidade intertumoral e intratumoral. A heterogeneidade intertumoral se refere a diferença genética dos tumores de mesmo tipo histológico entre diferentes pacientes, incluindo variações genéticas da primeira linhagem que formou o tumor, diferenças no perfil de mutações somáticas e fatores ambientais externos. A heterogeneidade intratumoral se caracteriza como a heterogeneidade das células tumorais de um único paciente. Sendo que a heterogeneidade intratumoral se subclassifica em: (1) espacial, pois descreve a distribuição desigual de subpopulações de células geneticamente distintas em diferentes regiões da massa tumoral; ou em (2) temporal, que descreve as ocorrências de variações dinâmicas na diversidade de um tumor individual ao longo do tempo (DAGOGO-JACK; SHAW, 2018).

Diversos mecanismos contribuem para o surgimento da heterogeneidade intratumoral. De acordo com modelos de evolução clonal, ocorre um acúmulo de mutações devido a instabilidade genômica, por consequência, a diversidade genética aumenta dentro do tumor, logo, o tumor adquire subclones geneticamente distintos ao longo do tempo (MCGRANAHAN; SWANTON, 2017).

A diferenciação celular colabora para a heterogeneidade, uma vez que, em modelos de células-tronco tumorais, os tumores são organizados hierarquicamente com uma população de células tronco mesenquimais, sustentando o crescimento do tumor por meio de autorrenovação e diferenciação (KRESO; DICK, 2014).

O microambiente tumoral, basicamente através da hipóxia, também auxilia no surgimento da heterogeneidade pois exerce diferentes pressões seletivas em regiões diferentes do tumor (PISTOLLATO *et al.*, 2010).

Além desses fatores, modificações epigenéticas podem afetar diferentemente células de um tumor, resultando em diferentes subpopulações fenotípicas. Métodos

avançados baseados em análise de células únicas que traçam um perfil de transcritos gênicos revelaram heterogeneidade entre células morfologicamente indistinguíveis. O perfil de acessibilidade de cromatina, posicionamento de nucleossomo, modificações em histonas em células de massa tumoral ou análise de células únicas, são características epigenômicas que vem demonstrando subpopulações celulares com fenótipos diferentes dentro do tumor, indicando a colaboração de alterações epigenéticas para a heterogeneidade intratumoral (CARTER; ZHAO, 2021).

Consequentemente, a heterogeneidade intratumoral contribui para disseminação metastática e resistência a terapia (QIN *et al.*, 2022).

4.1 Heterogeneidade intratumoral e migração celular

O processo de migração celular se desregula durante a progressão tumoral e a desregulação contribui com o deslocamento de células para invasão e metástase, no entanto, não afeta todas as células do tumor, apenas algumas adquirem capacidade migratória mais alta e a heterogeneidade intratumoral pode estar influenciando este ponto (VITALE *et al.*, 2021).

Em GBM, tipo de câncer que se desenvolve no cérebro e tem como característica um crescimento rápido e invasivo no parênquima cerebral, algumas células tumorais escapam dos tratamentos convencionais, invadindo e reestabelecendo o tumor. Em um modelo de migração e invasão de tumosferas, demonstrou-se que células presentes na periferia das esferas expressavam altos níveis de vimentina e nestina, marcadores associados a células tumorais invasivas e células troncos tumorais em GBM. Enquanto, que células do centro do tumor expressavam GFAP e baixa expressão de vimentina e nestina. A dinâmica de expressão desses marcadores nas diferentes regiões da tumosfera é um indicativo de duas populações com diferentes capacidades migratórias em GBM (GUDBERGSSON *et al.*, 2019).

Biópsias de tumores de mama também mostram a diferença na dureza da ECM no microambiente tumoral como uma evidência de heterogeneidade de migração

celular. O centro do tumor de mama é caracterizado por uma menor rigidez (aproximadamente 2kPa), enquanto a periferia apresenta uma rigidez maior (aproximadamente 20kPa). Esse modelo foi reproduzido em géis híbridos de colágeno e alginato com rigidez ajustável, onde as células tumorais de mama foram condicionadas e apresentaram uma distância de migração maior na região mais rígida, além do aumento da expressão de fibronectina-1 (FN-1) e da MMP-9, indicando que a biomecânica do microambiente tumoral heterogêneo modula o fenótipo migratório (LIU, C. *et al.*, 2021).

A amplificação do proto-oncogene MYC em meduloblastoma de alto risco é heterogênea a nível de células únicas evidenciando a diferença de fenótipo que contribui para heterogeneidade tumoral. Em comparação de células tumorais de meduloblastoma, se observou que células MYC + secretam a lactato desidrogenase A (LDHA) que facilita a migração e metástase, enquanto células MYC- secreta o inibidor da via de sinalização *dickkopf* WNT3 (DKK3) promovendo a angiogênese tumoral (QIN *et al.*, 2022).

Com o intuito de identificar um alvo para terapia anti-metástase em células tumorais de boca, foi demonstrado a presença de subpopulações com diferentes capacidades migratórias em uma mesma linhagem celular. A partir da linhagem altamente invasiva, SAS, foi realizado um ensaio de *sorting* que identificou vinte subclones dentro da população, e selecionadas a partir da expressão de N-caderina cinco subclones mais migratórios e outros cinco com menor capacidade migratória que evidenciam a heterogeneidade intratumoral em câncer de boca (WEISSE *et al.*, 2021).

A análise de sequenciamento de RNA em células únicas de melanoma identificou heterogeneidade intratumoral em tumores primários a nível genômico e transcriptômico. Além disso, o fator de transcrição HES6 que estimula a habilidade de células invasivas em gliomas e câncer de colorretal foi identificado como um marcador de prognóstico ruim nesses tumores primários. Mesmo nas amostras de melanomas classificados como de baixo risco se observou a expressão de HES6 que poderia viabilizar a indução de metástases nesse tipo de melanoma (PANDIANI *et al.*, 2021).

A ampla gama de novas tecnologias genômicas aplicadas juntamente de metodologias bem consolidadas auxiliaram na descrição da heterogeneidade intratumoral relacionada ao fenótipo de migração celular, além de destacar a importância de estudar o movimento da célula, que pode escapar do tumor e causar a formação distante de uma nova massa tumoral.

4.2 Impacto da mitose na heterogeneidade intratumoral

As células-tronco têm a habilidade de autorrenovação e diferenciação em diferentes tipos de células, elas atingem esse objetivo por meio do equilíbrio entre o modo de divisão simétrica e modo de divisão assimétrica. Na divisão simétrica as duas células filhas geradas têm o mesmo destino celular, enquanto na divisão assimétrica, as células filhas têm destinos diferentes (KAHNEY *et al.*, 2017). Quando ocorre a falha no equilíbrio das duas formas de divisão, onde a homeostase não é mantida, graves consequências podem ser geradas como a tumorigênese (NEUMÜLLER; KNOBLICH, 2009). A teoria das células tronco tumorais sugere que a autorrenovação desregulada e mitose assimétrica servem como fonte de heterogeneidade intratumoral, que complica diagnóstico e tratamento de pacientes com câncer (LI *et al.*, 2022).

A participação da mitose assimétrica no estágio inicial da formação de tumores em modelo de câncer de pulmão induzido por mutação K-Ras foi demonstrada. As células pré-tumorais presentes no adenoma iniciaram ciclo de retroalimentação positiva de CD44/Zeb1 por meio da polarização nuclear dos principais fatores de transcrição durante a divisão assimétrica, o que resultou na geração de uma população intermediária de células transicionais Zeb1 high / CD44 high, apresentando características tumorigênicas (LIU *et al.*, 2018).

Em modelo de câncer hepático, foi comprovado que a fosforilação de NUMB e TBC1D15 é extremamente necessária para o desenvolvimento de tumores de fígado. Foi demonstrado que TBC1D15 interage com a maquinaria responsável pela mitose assimétrica, interrompendo sua função, logo, desencadeando a degradação e

autorrenovação de p53 em conjunto com a ativação da via Notch para impulsionar a progressão tumoral (CHOI *et al.*, 2020).

Os fatores regulatórios de divisão assimétrica são expressos de maneira heterogênea, onde fatores que direcionam a diferenciação de células filhas estão frequentemente associados com mutação de perda de função ou baixa expressão, enquanto fatores que mantêm a característica tronco estão frequentemente superexpressados em tumores. Esses fatores afetam a divisão assimétrica e heterogeneidade celular direta ou indiretamente através das vias de sinalização de Notch ou Wnt (LI *et al.*, 2022)

Em relação a alterações de fenótipos celulares, a divisão assimétrica de moléculas ou estruturas celulares já foram descritas por afetar a migração celular. Em células epiteliais, já foi demonstrado que a segregação de corpos PML e lisossomos influenciam na migração celular coletiva (LÄNG *et al.*, 2018a) junto com outros estudos descrevendo que mitose assimétrica gera células com diferentes capacidades migratórias pós mitose (COSTA *et al.*, 2016; NOCTOR *et al.*, 2004) no desenvolvimento tecidual e homeostase. Além do mais, a segregação assimétrica de algumas proteínas como o EGFR poderia estar contribuindo para gerar células filhas funcionalmente diferentes na presença do EFGR, incluindo o fenótipo de migração celular (SUN; GODERIE; TEMPLE, 2005a). A distribuição assimétrica do EGFR também é descrita em queratinócitos, carcinoma de células escamosas e carcinoma basal primário de células escamosas (LE ROY *et al.*, 2010a).

Estudar detalhadamente o mecanismo de divisão celular assimétrica entre diferentes tipos de câncer acaba, portanto, sendo essencial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que superem a heterogeneidade intratumoral.

5 EPIGENÉTICA NO CÂNCER

5.1 Alterações epigenéticas

Além de alterações irreversíveis na sequência do DNA, a progressão tumoral também é causada por alterações na expressão gênica que não altera a sequência

genética de DNA, esses tipos de modificações são denominados alterações epigenéticas (HEMA *et al.*, 2017).

O DNA está empacotado dentro do núcleo da célula na forma de cromatina, cuja unidade fundamental é o nucleossomo. O nucleossomo é composto por quatro histonas centrais (H3, H4, H2A e H2B) onde 147 pares de bases de DNA são enrolados. As histonas têm forma globular apresentando caudas N-terminais, que podem sofrer modificações para regulação da expressão gênica (BERGER *et al.*, 2009). Diversas alterações enzimáticas, como metilação e acetilação das caudas das histonas podem modular a acessibilidade da cromatina, ativando ou silenciando genes através da ligação de fatores de transcrição. Os fatores de transcrição regulam processos celulares intrínsecos, e podem se ligar a elementos regulatórios do DNA para controlar expressão gênica e fenótipos celulares, sendo que esta ligação depende do estado da cromatina (WEIDEMÜLLER *et al.*, 2021).

Modificações em genes que organizam, modulam e mantem a arquitetura da cromatina, e assim, regulam a expressão gênica, cada vez mais são identificados e associados funcionalmente às características do câncer (HANAHAN, 2022).

5.2 Reprogramação epigenética não mutacional

O conceito de reprogramação epigenética não mutacional é estabelecido como o mecanismo central que regula o desenvolvimento embrionário, diferenciação e organogênese.

A memória de longo prazo em adultos ocorre por meio de modificações em genes e histonas, além de alterações na estrutura da cromatina e na ativação de *switches* de expressão gênica. Essas mudanças são mantidas estavelmente ao longo do tempo por meio de ciclos de retroalimentação positiva e negativa. Cada vez mais evidências sugerem que alterações epigenéticas semelhantes podem desempenhar funções na aquisição de características durante o desenvolvimento tumoral e sua progressão maligna (HANAHAN, 2022).

Exemplos de reprogramação epigenética em mecanismos do microambiente, mecanismos de migração e metástase, de heterogeneidade regulatória epigenética e de regulação epigenética de tipos celulares do estroma do microambiente tumoral suportam essa ideia.

5.2.1 Reprogramação epigenética de mecanismos do microambiente tumoral

As características físicas do microambiente tumoral podem desencadear alterações significativas no epigenoma, resultando em mudanças que promovem seleção fenotípica favorável ao crescimento clonal de células tumorais com capacidade aprimorada de se proliferar e se expandir (HANAHAN, 2022).

Organoides sintéticos de câncer de próstata baseados em hidrogel foram desenvolvidos para cultivar células tumorais de pacientes sob condições definidas de microambiente tumoral, por consequência, o cultivo em curto prazo regulou diferencialmente a metilação de DNA, modulando a expressão do regulador epigenético EZH2 (MOSQUERA *et al.*, 2022).

O aumento de invasividade das células tumorais mediada pelo microambiente tumoral também ocorre devido a alterações no padrão epigenético, um exemplo disto é a indução de EMT em células da borda de tumores rígidos. Em câncer colorretal, ZEB1, um dos principais reguladores de EMT, foi capaz de induzir a expressão da histona metiltransferase SETD1B, que em um ciclo de retroalimentação positiva sustenta a expressão de ZEB1 mantendo fenótipo do tipo mesenquimal nessas células (LINDNER *et al.*, 2020).

Se sabe que a rigidez da ECM também contribui para a invasividade, sendo assim um modelo de cultura tridimensional induziu fenótipo tumorigênico em células de câncer de mama por meio de alterações no estado da cromatina. O aumento da rigidez nesse modelo produziu células com núcleo mais enrugado, exibiram locais de cromatina mais acessíveis que exibiram sítios de ligação ao fator de transcrição Sp1, o qual atua com as HDAC3 e HDAC8 para induzir tumorigenicidade mediada por rigidez (STOWERS *et al.*, 2019b).

5.2.2 Reprogramação epigenética de células do microambiente tumoral

Células do estroma como CAFs, células do sistema imune inato, células endoteliais e pericitos da vasculatura tumoral têm sido identificadas por tecnologias de perfil multi-ômicas como células que também se reprogramam epigeneticamente sendo corrompidas para apoiar funcionalmente o desenvolvimento e a progressão do tumor (HANAHAN, 2022).

A modulação de metilação em macrófagos do tipo M2 por exemplo contribuiu para o aumento da migração em células de câncer de mama. O subtipo M2 é correlacionado com um prognóstico ruim ao paciente e pode promover a progressão tumoral através da expressão de LOX. A expressão de LOX foi induzida em macrófagos M2 de células leucêmicas THP1 humanas devido a diminuição de trimetilação de H3K27, o que aumentou a migração de células de tumor de mama (TAKEMOTO *et al.*, 2020).

Por sua vez em tumores gástricos, os CAFs têm capacidade de promover o desenvolvimento de tumores pela diminuição da trimetilação de H3K27 devido a regulação negativa do fator de transcrição EZH2, desta maneira os CAFs ativam a sinalização transitória de NF κ B desencadeando o fenômeno chamado de fenótipo secretor associado a senescência, o que leva o aumento de proliferação e invasão nesse tipo de tumor (YASUDA *et al.*, 2021).

5.2.3 Reprogramação epigenética de migração e metástase

As alterações epigenéticas também modificam o fenótipo de células tumorais, reprogramando-as com a finalidade de aumentar a taxa migratória e torná-las metastáticas (HANAHAN, 2022).

Por exemplo, a MMP-9 pode estar sendo ativada por diminuição na metilação de DNA em câncer de mama e promovendo metástases. O tratamento com o inibidor de DNA metiltransferase, 5-azadC, causou o aumento na expressão da MMP-9. Além disso, a região intragênica pode estar regulando a expressão da MMP-9, devido a

marcação de trimetilação de H3K4 em regiões promotoras e intrônicas (KLASSEN *et al.*, 2018).

Análises multi-ômicas como Hi-C, ChIP-seq, ATAC-seq e RNA-seq foram utilizadas para investigar as características epigenômicas em metástase de câncer pancreático. Nessas células metastáticas foi identificado rearranjo no compartimento da cromatina, alteração genômica e epigenômica nos domínios de contato que se tornaram menores e mais numerosos, associados a modificações em histonas, e por fim, mais de 600 genes em loop para *enhancers* e fatores de transcrição específicos de metástase (REN *et al.*, 2021).

Enzimas de modificação de histonas também causam reprogramação epigenética e influenciam nas características migratórias de células metastáticas em câncer de mama. A demetilase da lisina 4A (KDM4A), modula gene de reparos de dano ao DNA, regula instabilidade genômica para potencializar a tumorigênese e é altamente expressa em vários tumores humanos. Em câncer de mama, KDM4A causou a ativação de Notch1 ligando diretamente aos promotores e desmetilando H3K9me3, resultando na manutenção de crescimento celular e aumentando migração (PEI *et al.*, 2023).

5.2.4 Reprogramação epigenética e heterogeneidade tumoral

A reprogramação epigenética não baseada em mutações é uma das causas que alteram o fenótipo de células causando heterogeneidade fenotípica dentro de um tumor, contribuindo para sua progressão (HANAHAN, 2022). Estudos recentes têm mostrado que reguladores epigenéticos, incluindo histonas desmetilases podem controlar a variabilidade de fenótipo celular de perfis transcriptômicos e de cromatina, podendo modular a resposta a terapia através dessas funções (HINOHARA; POLYAK, 2019).

O estudo do perfil de metilação de ilhas CpGs em 23 amostras de câncer de mama permitiu o cálculo de um índice de heterogeneidade que revelou populações heterogêneas de alelos nesses tumores. Além disso em linhagem tumoral de mama,

MDA-MB-231, também se observou heterogeneidade epigenética e a geração de sua própria heterogeneidade ao longo do tempo (CAMPOY *et al.*, 2019). Ainda em câncer de mama, a maioria dos tumores do tipo luminais ER+ responde a terapias endócrinas, mas uma parte desenvolve resistência e ocorre metástase (BRUFISKY; DICKLER, 2018), a possível causa foi a identificação do KDM5B como um oncogene amplificado e super expresso em tumores luminais ER+ (YAMAMOTO *et al.*, 2014). Essa maior atividade de KDM5B foi associada com o pior prognóstico desses pacientes, sugerindo que ele regula a resposta e resistência a terapia endócrina, uma vez que essa enzima é uma desmetilase de H3K4me3 (BENAYOUN *et al.*, 2014), há o indício de isso ser regulado a partir de modificação epigenética.

Em amostras clínicas humanas de câncer de próstata neuroendócrino (NEPC) foram identificados dois subtipos distintos com base na expressão de fatores de transcrição neuronal ASCL1 e NEUROD1. Essas amostras foram analisadas a nível de células únicas que exibiu estrutura tumoral mais complexa com subtipos coexistindo como subpopulações separadas dentro do mesmo tumor, diferindo genética e epigeneticamente e contribuindo para a heterogeneidade intratumoral. As diferenças são encontradas nos sítios de acessibilidade de cromatina distinto dentro das mesmas espécimes humanos e estão associados a expressão de membros distintos da família bHLH, sugerindo que a variedade de fatores de transcrição pode manter esse estado (CEJAS *et al.*, 2021).

A integração da análise de DNAm, mapeamento de modificação de histonas e expressão de RNA e DNAm em células únicas permitiu a identificação de variabilidade de metilação célula-célula em leucemia linfocítica crônica (LLC). Nesse tipo de câncer foi observado religação da cromatina nas regiões regulatórias de acetilação de H3K27 mediadas por fatores de transcrição NFAT e TCF/LEF8, além de co-ocorrência de modificações mutuamente exclusivas de ativação (acetilação de H3K27) e repressão (tri-metilação de H3K27), associado a ativação de programas de células-tronco e maior heterogeneidade transcricional célula a célula (PASTORE *et al.*, 2019).

A compreensão da heterogeneidade causada por reprogramação epigenética se torna de grande importância clínica, uma vez que as respostas ao tratamento são fortemente influenciadas pela presença de subpopulações resistentes que podem estar ocorrendo devido ao fenótipo alterado epigeneticamente ao longo do tempo (HINOHARA; POLYAK, 2019).

6 HIPÓTESE

Hipótese I: Características migratórias podem se dividir assimetricamente após a mitose permitindo um pequeno conjunto de células ter uma contribuição maior para progressão tumoral.

Hipótese II: Um ambiente de matriz extracelular mais rígido poderia alterar invasividade e progressão tumoral em carcinoma espinocelular oral através de modificações em histonas.

7 OBJETIVOS

7.1 Objetivo geral I: Determinar o fenótipo migratório de células normais e tumorais após a mitose para identificar assimetria de migração.

Objetivo específico I: Caracterizar o fenótipo de migração em duas linhagens normais e três linhagens tumorais;

Objetivo específico II: Investigar se há diferenças de fenótipo migratório pós mitose entre células irmãs e entre células mãe e filhas;

Objetivo específico III: Determinar dinâmica de área e polaridade celular entre células irmãs;

Objetivo específico IV: Verificar se a diferença em fenótipo migratório entre células irmãs é causada pela mitose ou tempo.

7.2 Objetivo geral II: Determinar quais alterações epigenéticas impactam na aquisição de capacidade migratória mais agressiva e no perfil de EMT durante o condicionamento de células tumorais de câncer de boca em um ambiente mais rígido de matriz extracelular.

Objetivo específico I: Caracterizar o perfil de metilação e acetilação em H3 durante o condicionamento de OSCC em matrizes rígidas;

Objetivo específico II: Analisar o impacto da modulação de modificações em histonas H3 na migração celular;

Objetivo específico III: Verificar a expressão proteica de marcadores de EMT e a expressão de mRNA de fatores de transcrição de EMT;

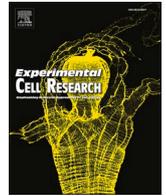
Objetivo específico IV: Determinar as alterações no perfil de EMT após a modulação de modificação em histona H3.

8 CAPÍTULO II

MANUSCRITO I

Este capítulo é referente ao manuscrito “*Asymmetric mitosis contributes to different migratory performance in sister cells*” publicado no periódico *Experimental Cell Research* (Fator de impacto 4.145).

Neste trabalho, investigamos a diferença na migração de células irmãs e a contribuição da mitose na geração de heterogeneidade na velocidade de migração, direcionalidade e capacidade máxima de deslocamento de uma linhagem celular normal e dois tipos de células tumorais, buscando entender o papel da mitose na geração de heterogeneidade e plasticidade do fenótipo.



Research article

Asymmetric mitosis contributes to different migratory performance in sister cells

Maurício Tavares Tamborindeguy^{a,b}, Paola Farias Lorenzatto^{a,b}, Marcelo Lazzaron Lamers^{c,1,*}, Guido Lenz^{a,b,1}^a Departamento de Biofísica, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, Brazil^b Centro de Biotecnologia, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, Brazil^c Departamento de Ciências Morfológicas, ICBS, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Cell migration
Cell heterogeneity
Asymmetric mitosis
Single cell

ABSTRACT

In cancer, cell migration contributes to the spread of tumor cells resulting in metastasis. Heterogeneity in the migration capacity can produce individual cells with heightened capacity leading to invasion and metastasis. Our hypothesis is that cell migration characteristics can divide asymmetrically in mitosis, allowing a subset of cells to have a larger contribution to invasion and metastasis. Therefore, our aim is to elucidate whether sister cells have different migratory capacity and analyze if this difference is defined by mitosis. Through time-lapse videos, we analyzed migration speed, directionality, maximum displacement of each trajectory, and velocity as well as cell area and polarity and then compared the values between mother-daughter cells and between sister cells of three tumor cell lines (A172, MCF7, SCC25) and two normal cell lines (MRC5 and CHO-K1 cells). We observed that daughter cells had a different migratory phenotype compared to their mothers, and one single mitosis is enough for the sisters behave like nonrelated cells. However, mitosis did not influence cell area and polarity dynamics. These findings indicates that migration performance is not heritable, and that asymmetric cell division might have an important impact on cancer invasion and metastasis, by producing cells with different migratory capacity.

1. Introduction

Cell migration is a crucial process in embryonic development and the maintenance of multicellular organisms [1–3]. However, under pathological conditions, it can contribute to tumor invasion and metastasis [4]. For a cell to migrate, it requires the coordinated activation of various molecules and signaling pathways. Initially, the cell extends a protrusion involving the formation of highly dynamic nascent adhesions, which in turn generate the contractile force required for the translocation of the nucleus and cell body. A tension is subsequently formed, resulting in the strengthening and organization of microtubules in the cytoplasm and culminating in the disassembly of cell rear adhesions. The migration of a cell is a dynamic process, encompassing several stochastic molecular interactions [5].

Several signaling pathways regulate timely and spatially cell migration events [6]. In cancer cells, dysregulation of signaling and effector proteins affects migratory performance [7]. Tumor stem cell

theory suggests that dysregulated self-renewal and asymmetric mitosis serve as a source of intratumoral heterogeneity, which complicates the diagnosis and treatment of cancer patients [8]. Due to intratumoral heterogeneity observed in solid tumors [9] a range of migratory phenotypes, and hence different metastatic potentials, may exist.

A migration and invasion assay in glioblastoma (GBM) demonstrated that cells located at the periphery of the tumospheres exhibited high levels of vimentin and nestin, markers associated with invasive tumor cells and tumor stem cells in GBM. Conversely, cells at tumor center displayed GFAP expression and low levels of vimentin and nestin. The dynamic expression patterns of these markers across different regions of the tumosphere suggest the presence of two distinct populations with varying migratory capacities in GBM [10]. Phenotypes associated with cell fitness, such as ERK activity, DNA damage, and nuclear morphological phenotypes, exhibited asymmetry during mitosis or acquired asymmetry throughout the cell cycle in GBM [11]. Furthermore, in a study using hybrid collagen-alginate gels with tunable stiffness,

* Corresponding author. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2492, sala 503, Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail addresses: marcelo.lamers@ufrgs.br (M.L. Lamers), lenz@ufrgs.br (G. Lenz).¹ equally contributed as last author.

conditioned breast tumor cells displayed higher migration distances within the region characterized by the highest stiffness. In addition, significant upregulation of fibronectin-1 (FN-1) and matrix metalloproteinase 9 (MMP9) expression was observed, indicating the impact of the biomechanical properties of the heterogeneous tumor microenvironment on the migratory phenotype [12]. In oral cancer, a screening assay identified twenty subclones within the highly invasive SAS cell line, aiming to identify targets for anti-metastasis therapy. Of these subclones, five were classified as highly migratory, and five exhibited low migratory capacity, based on N-cadherin expression, further highlighting intratumoral heterogeneity [13].

Despite these findings, it remains unclear how these cells diverge and how these distinct migratory phenotypes contribute to metastasis formation. In the context of cancer, it has been postulated that asymmetric division plays a significant role in tumorigenesis [14,15] and cancer cells exhibited a dynamic fitness [16]. For instance, glioma cells exhibit asymmetric division of key proteins such as the human epidermal growth factor receptor (EGFR), and the P75 neurotrophin receptor (p75NTR) [17]. However, the frequency and implications of this phenomenon within tumors are still poorly understood.

Given that asymmetric mitosis can influence the conservation of phenotypes and contribute to increased variability in cell migration [18, 19], our hypothesis is that migratory characteristics can divide asymmetrically in mitosis, allowing a small subset of cells to have a greater contribution to tumor progression. In this study, we discovered that a single mitosis is enough for cells to lose their migratory phenotype from their mother cells, and that asymmetric mitosis impacts the migration of daughter cells. Furthermore, we found that mitosis does not influence migration events between sister cells. Therefore, we showed that sister cells have considerable differences in several aspects of the morphological and functional characteristics linked to migration.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

A172 (human glioblastoma), MCF-7 (human breast cancer), MRC-5 (human fibroblast), CHO-K1 (Chinese hamster ovary) and SCC25 (human oral squamous cell carcinoma) cell lines were obtained from American Type Culture Collection (ATCC). A172, MCF-7 and MRC-5 were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) low glucose supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 100 U/ml penicillin/streptomycin, at a temperature of 37 °C, 5% CO₂. CHO.K1 cells were cultured in DMEM with low glucose, supplemented with 10% FBS, 100 U/ml penicillin/streptomycin, and 1% non-essential amino acids (NEAA) at a temperature of 37 °C and 5% CO₂. SCC25 cells were cultured in DMEM-F12 medium, supplemented with 10% FBS, 100U/ml penicillin/streptomycin, and hydrocortisone (400 ng/ml) at a temperature of 37 °C and 5% CO₂. For time-lapse videos, DMEM supplemented as described previously for each cell line was used, with addition of 25 mM of 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES).

2.2. Cell migration assay

For the single cell migration assay, 15×10^3 cells were plated onto 35 mm dishes coated with collagen ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) and incubated for 4 h at 37 °C/5% CO₂ to allow cell adhesion. DMEM-HEPES was added to ensure cell viability during image capture. For long-term migration analysis, time-lapse images were captured using an inverted microscope Zeiss (10x objective) with a charge-coupled device camera attached, equipped with heat control (37 °C). Images were taken at 5- and 10-min intervals over a 24-h period, using AxioVision software. Tracking of migrating single cells was performed using ImageJ software (<https://imagej.nih.gov/ij/>) updated with the Manual Tracking plugin.

2.3. Cell migration analysis

From the data obtained using Manual Tracking plugin used on ImageJ, we extracted the X and Y positions of cells during their migration displacement in time-lapse videos. These positional data were utilized to calculate the migration speed and directionality index of the cells. The migration speed was determined by measuring the total distance traveled by a cell (μm) per hour. This was achieved using the following equation (1).

(1) Migration speed ($\mu\text{m}/\text{h}$):

$$\sum_{i=1}^n = \frac{\text{sqrt}((x_i - x_{i-1})^2 + (y_i - y_{i-1})^2)}{\text{time (h)}}$$

Here we calculated the total distance traveled by each cell and divide by itself migration time.

For each group of cell lines, directionality of cell migration was analyzed by constructing polar plots that represented the spatial trajectory developed by each migratory cell. The X and Y coordinates of each cell's trajectory were normalized, starting from a virtual position ($X = 0$ and $Y = 0$).

Likewise, directionality index was then calculated as the ratio of the relative distance traveled by the cell to the total distance traveled (refer to equation 2). A directionality index close to 1 indicates highly directional movement (resembling a straight line), while a directionality index close to 0 represents a low directionality movement.

(2) Directionality index:

$$\sum_{i=1}^n = \frac{\text{sqrt}((x_i - x_{i-1})^2 + (y_i - y_{i-1})^2)}{\text{total distance}}$$

In order to analyze migration efficiency, we calculated cell velocity by multiplying cell's migration speed by its directionality index (Supplementary Fig. 1A).

2.4. Comparison analysis of migratory phenotype between mother and daughter cells

To assess the heritability of cell migration phenotype in daughter cells, a comparative analysis was performed between mother and daughter cells (referred to as M-D) (Supplementary Fig. 1B). The differences in migration speed (Fig. 2A), directionality index (Fig. 2B), and maximum displacement (Fig. 2C) between mother and daughter cells (M-D) were analyzed. The comparative analysis was conducted with H1 group, group consisting of unrelated cells randomly selected as a pair (Supplementary Fig. 1C). We determine the presence of heritability if a statistical difference is observed between the test group (M-D) and the H1 group. Conversely, the absence of heritability is concluded if there is no statistical difference between the test and H1 group.

2.5. Comparison analysis of migratory phenotype between sister cells

To ascertain whether sister cells exhibit similar or dissimilar migratory behavior and determine the presence of symmetric or asymmetric cell division we performed analyses on the differences in migration speed (Fig. 2A), directionality index (Fig. 2B), and maximum displacement (Fig. 2C) between the two sister cells (Sisters) (Supplementary Fig. 1B). Subsequently, we conducted a comparative analysis with the H1 group, consisting of unrelated cells randomly selected as a pair. If a statistical difference is observed between the test group (Sisters) and H1 group, it implies similarity and provides evidence of symmetric mitosis. Conversely, if no statistical difference is found between the test and H1 groups, it indicates dissimilarity and supports the presence of asymmetric mitosis.

2.6. Dynamic analysis of morphological and migratory events

Morphological characteristics such as cell area and polarity index were quantified. The cell surface area was measured using the Polygon selection tool in ImageJ (Fig. 3A). The polarity index assessment, it was determined by calculating the ratio of the length of the major migration axis (parallel to the direction of movement) to the length of the perpendicular axis intersecting the cell nucleus (Fig. 3A' and A'').

Cell area and cell polarity dynamics were employed to infer the alterations occurring throughout the process of migration (Fig. 3B and C). The dynamics were estimated through the following steps: (1) measuring cell area and polarity for each individual cell; (2) calculating the average of this values; (3) normalizing each cell's area and polarity by dividing them by the average found in step 2; (4) determining the difference between the cell area or polarity at each hour of migration; (5) summing up the obtained differences from step 4; (6) dividing the sum by the total duration of migration in hours.

Morphological and polarity index quantities were used to calculate the similarity index (Fig. 4A), indicating how similar sister cells could be (Fig. 4B). A ratio of these measurements was calculated each hour. The first similarity index after mitosis of each pair of sisters were submitted to a descriptive analysis (Fig. 4E), and the most similar pair of sisters were considered when similarity index reach the median found in this analysis (High similarity - HS), otherwise were considered as different cell sisters (Low similarity - LS). This rational were applied for each hour of migration. Dynamics of similarity between sister cells along migration were calculated as described to calculate area and polarity dynamics.

2.7. Statistical analysis

Altogether, these set of measurement of cell motility characteristics were used to identify differences between daughter cells originated after mitosis. A simple difference between sister cells speed, velocity, directionality index was calculated. Otherwise, an index ratio of cell area and polarity index were calculated to identify similarity between sister cells. SCOUTS (<http://www.ufrgs.br/labsinal/scouts>) [20] was used to identify outliers. For statistical analysis, ANOVA one-way, Student's t-test, Mann-Whitney test, Spearman correlation coefficient were performed using GraphPad Prism 8. Statistically significant differences were considered when $P < 0.05$. Graphs were plotted with GraphPad Prism 8 and Microsoft Office Excel 365.

3. Results

3.1. Migration behavior of normal and tumor cells

We conducted a series of time-lapse videos to examine the migratory performance of normal and tumor cell lines. The normal cell line MRC5 demonstrated a migration speed of $23.46 \pm 6.74 \mu\text{m/h}$. Tumor cell lines MCF7 and A172 showed migration speeds of $21.12 \pm 9.22 \mu\text{m/h}$ and $30.12 \pm 13.16 \mu\text{m/h}$ (Fig. 1A), respectively, with the glioma cell line A172 displaying the highest speed and directionality (Fig. 1B and C). MRC5 and A172 exhibited the greatest values for directionality indexes (Fig. 1B and C), whereas the non-invasive breast cancer cell line MCF7 [21] showed lower directionality. When calculating cell velocity, we observed that the fastest cell line, A172, also showed the most efficient migration movement, followed by MRC5 and MCF7 (Fig. 1D). When considering maximum displacement for each trajectory, cancer cells A172 and MCF7 had higher maximum displacements compared to MRC5 (Fig. 1E). When comparing the migration characteristics of CHO-K1, a normal cell line, with SCC25, an oral squamous cell carcinoma cell line, we observed that CHO-K1 exhibited a higher migration speed than SCC25 ($18 \mu\text{m/h}$ vs $6 \mu\text{m/h}$, Supplementary Fig. 2A). Highlighting a similar situation of MRC5 and MCF7. However, despite the lower migration speed, SCC25 displayed higher directionality indexes (Supplementary Figs. 2B–C), indicating that this tumor cell line

had an invasive phenotype, as expected. This becomes evident when we observe that both cell lines showed similar velocities, and SCC25 displayed a higher heterogeneity, characteristic of tumor cells (Supplementary Fig. 2D).

Cancer cell invasion is performed by a small subset of cells with unique adhesive and migratory capabilities. Therefore, analyzing outliers can help identify these cells. We used a statistical tool called SCOUT [20] to identify biological outliers. This tool detects outliers according to the cutoffs established by (I) determining the first and third quartiles of the sample; (II) calculating the interquartile range (IQR); (III) multiplying the IQR by a Tukey factor; (IV) summing the value obtained in the previous step to the third quartile. The result of the steps mentioned above is the cutoff for outliers at the top of the population distribution. Therefore, we observed that cancer cell lines had more outliers (A172: 6.3% speed; 5.8% velocity and 2.6% maximum displacement – MCF7: 0.7% speed; 3.4% velocity and 3.9% maximum displacement) than the non-cancer cell line for several of the analyzed features (Fig. 1A).

Tumor heterogeneity leads to different phenotypic capabilities. We investigated if there were groups with different migratory phenotypes within each cell population. Through heterogeneity tests and descriptive statistics, we identified two cell population groups with distinct migratory phenotypes, separating them using the median value. We calculated the percentage of cells that were identified in the groups with the highest speed and maximum displacement compared to the group with the highest directionality. We found that a higher proportion of cells from the glioblastoma cell line (64.2%) were highly directional, fast, and showed peaks of high maximum displacement (Fig. 1F) compared to the breast tumor cells. The proportion of breast tumor cells that showed high migratory capacity was significantly lower (18%), while MRC5 showed 52.2% of highly migratory cells. Together, these data showed a heterogeneous cell population with varied migratory rates.

3.2. Different migration phenotypes observed in sister cells after mitosis

Asymmetric mitosis can influence phenotype conservation and contribute to increased variability in cell migration. To investigate this, we tracked mother and sister cells. Cell tracking of mother and sister cells was analyzed considering the null hypothesis (H0) as equal cells, and the alternative hypothesis (H1) as randomly paired cells. Even though, sister cells from a tumor cell line with low migration speed (SCC25), sustain a similarity after mitosis (Supplementary Fig. 1F, bottom) that is not what occurs with cell lines presenting a higher migration speed average. Surprisingly, our analysis suggested that sister cells differed as much as any other pair of non-related cells when it came to migration speed averages, once no significant statistics differences were found between sisters and H1 (Fig. 2A top, middle, bottom). Differences between the mother cells and their daughters when compared with sister differences also does not show to be significant related to cell speed migration, suggesting that this characteristic is not inherited.

When we analyze data from the directionality index, we observed the same response profile as in cell speed average for MRC5 and MCF7 (Fig. 2B top, bottom), but a different response profile on SCC25 (Supplementary Fig. 1G, bottom). In addition, A172 sisters demonstrated a higher directionality difference than A172 mother-daughters, the same occurs with SCC25 sisters (Supplementary Fig. 1G). This data suggests that directionality could potentially be inherited from mother cells (Fig. 2B middle). Furthermore, the group mother-daughter cells differed statistically from H1, implying that directionality could be inherited from the mother cell to its daughters in one mitosis.

In order to analyze whether tumor cells have migration peaks that drives their invasiveness and whether this characteristic can be inherited or sustained between sister cells after mitosis, we quantified maximum displacement difference. We found that one mitosis is enough to maximum displacement difference in MRC5 be the same as the H1 group, once there is no statistical difference between these groups (Fig. 2C top), the same occurred with CHO-K1 cell line (Supplementary

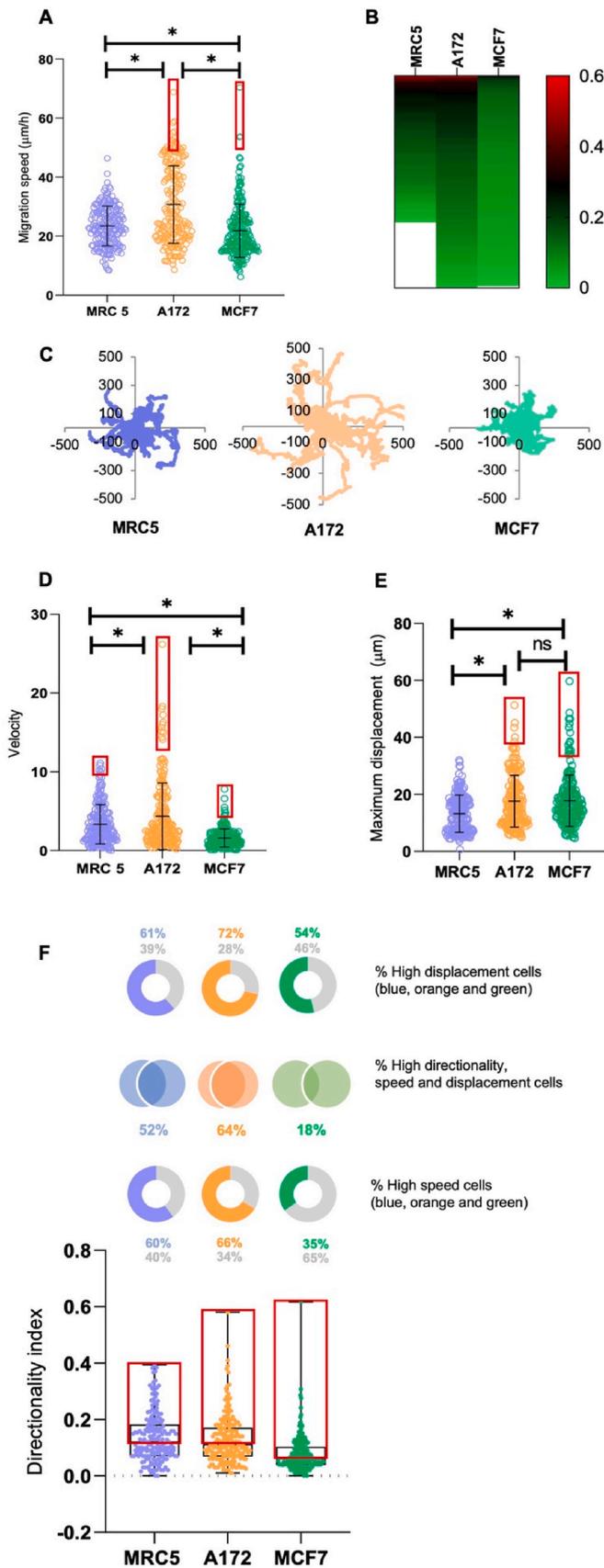


Fig. 1. Migratory behavior of normal (MRC5) and tumor (A172 and MCF7) cells. A. MRC5, A172 and MCF7 migration speed average. B. Directionality index heatmap of normal and tumor cells. C. Normal and tumor cell directionality analysis through rose plots. D. Cell velocity of normal and tumor cells. E. Maximum displacement from each cell trajectory analyzed. F. Population highly directional in each cell line and cell percentage with highly migration speed and maximum displacement that is found in highly directional population. In A, D and E the results are shown as mean \pm SD and red boxes highlighted the outliers. ANOVA one way was used in 1 A,D,E. In 1 F, the result is shown as median and 1st and 3rd quartiles, red boxes shown highly directional population, determined by Shapiro Wilk test. Statistical difference was considered when $p < 0.05$. MRC5 (n = 187, 5 videos), A172 (n = 200, 8 videos) and MCF7 (n = 206, 6 videos).

Fig. 2H, top). In tumor cell this response profile changed, as A172 sister cells were more similar than mother-daughter or H1 group (Fig. 2C middle). Surprisingly, in MCF7 cells, mother-daughter were significantly more different between each other than were sisters or even non-related pairs in maximum displacement (Fig. 2C bottom). In agreement with what happened to tumor cell lines, SCC25 exhibited the same profile response (Supplementary Fig. 2H, bottom). These data suggest that migration peaks are more similar between mother to daughters, than between sisters.

Interestingly, this heritability found in directionality and maximum displacement differences only applies to tumor cell lines, suggesting that heterogeneity might cause these differences. Moreover, we hypothesized that the heterogeneity we possibly found could be caused by morphological aspects or cell polarity dynamics, as these are processes that drive cell directionality.

3.3. MRC5 sister cells have similar behavior related to cell area dynamics

Mitosis can introduce heterogeneity, but so can time. Two cells born similar can gradually diverge over the course of the next cell cycle. To understand this, we measured the area and polarity of the cell over time for at least one cell cycle, starting 2 h after mitosis and continuing every hour thereafter. The difference between these aspects was calculated for each pair of sisters and these values were used to determine the cell area and polarity dynamics (Fig. 3C and D). Our tests showed a non-normal distribution for all cell lines, suggesting that this difference also exists in the morphological events of sister cells (Fig. 3C and D, Supplementary Figs. 3A–B). The same prior strategy testing groups with H0 and H1 was used to test area dynamics difference (Fig. 3F) and polarity (Fig. 3G) values. Except MRC5, the mean Cellular Area (CA) dynamics showed no significant difference between sister cells and H1, indicating that a single mitosis is enough for sister cells to lose their similarity (Fig. 3E, Supplementary Fig. 3C). In contrast, MRC5 sisters preserved the CA dynamics (Fig. 3E). Whereas the polarity dynamics is not conserved post mitosis in the three cell lines (Fig. 3F, Supplementary Fig. 3D).

3.4. Mitosis does not influence cell area and polarity dynamics in tumor cells

Given the morphological differences related to migration, we aimed to identify whether these were generated by mitosis or acquired over migration time. To analyze the dynamics of conservation of migratory events, the Similarity index (SI) was calculated (Fig. 4A). A SI close to 1 indicates that sister cells were more identical, while an SI close to 0 indicates sisters more different. SI dynamics for CA and PI was also calculated (Fig. 4B).

A non-normal distribution for SI between sister cells in all cell lines for CA (Fig. 4C, Supplementary Fig. 3E) and PI dynamics (Fig. 4D, Supplementary Fig. 3F) were observed. We grouped the first SI value post mitosis of all sisters (Fig. 4E) and used descriptive statistics to divide them into groups of sisters that divided more similarly (HS - high similarity) and less similarly (LS - low similarity) with respect to area

(caption on next column)

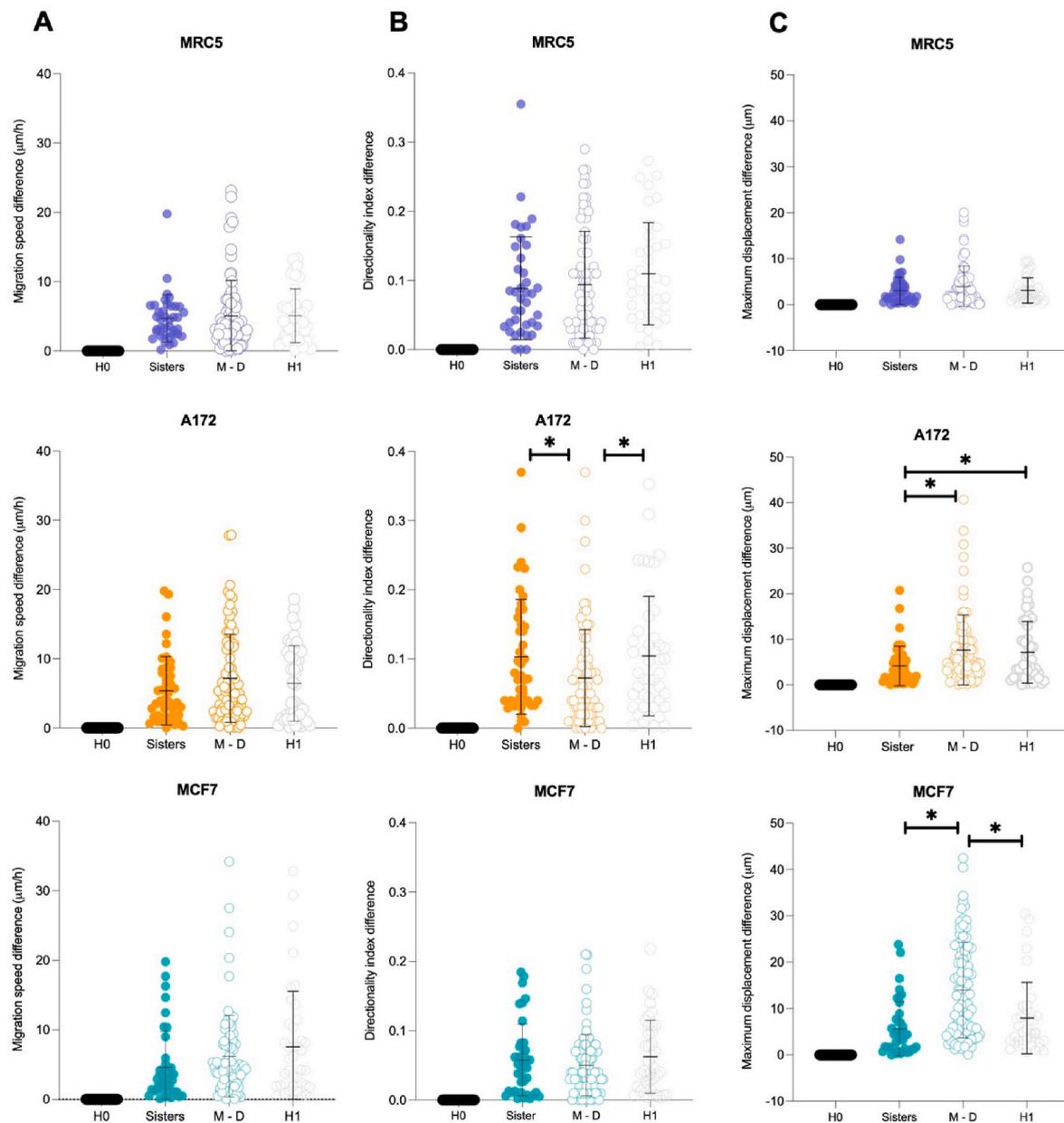


Fig. 2. Comparison of migratory events between sister, mother and daughter cells and nonrelated cells. **A.** Migration speed difference between sisters and mothers and daughter normal (MRC5) and tumor (A172, MCF7) cells. **B.** Directionality index difference between sisters and mother and daughter normal (MRC5) and tumor (A172, MCF7) cells. **C.** Maximum displacement difference between sister and mother and daughter normal (MRC5) and tumor (A172, MCF7) cells. All groups were statistically different when compared to H0. In 2 A-C results are shown as mean \pm SD. ANOVA one-way was used to statistics. Statistical difference was considered when $p < 0.05$. MRC5 ($n = 38$), A172 ($n = 45$) and MCF7 ($n = 41$).

and polarity.

MRC5 sister cells that are more similar post-mitosis (HS) show, on average, a lower AC dynamic, whereas the less similar post-mitosis (LS) sisters have a higher dynamic (Fig. 4F), indicating that mitosis maintains the similarity in this normal cell line in a percentage of the population. Interestingly, SCC25 sister cells had the opposite profile than MRC5 related to cell area (Supplementary Fig. 3H), even though these cells had a similar dynamic average and a heterogeneous population. Regarding polarity, mitosis did not define the dynamics of these cells. In tumor cells, mitosis did not influence cell area dynamics and polarity, indicating a possible temporal effect in sister difference (Fig. 4G and H).

4. Discussion

Cancer cells dissemination, which occurs via invasion and

metastasis, is heavily dependent on cell migration of individual or a small group of cells [22]. Understanding the origins of migration heterogeneity is thus critical for minimizing this heterogeneity and reducing the proportion of cells capable of invading and metastasizing.

Herein we first compared whether tumor cells could exhibit higher migration rates than normal cells. Among the three cell lines we analyzed, a glioblastoma cell line exhibited the highest rate. Glioblastoma is typically characterized as a high invasive tumor due to its extensive infiltration throughout the brain structures. This level of infiltration indicates a malignant tumor, which often leads to a poor prognosis [23]. Unexpectedly, the human lung fibroblast, showed a higher velocity and directionality than a breast cancer cell line. However, MCF7 is associated as a low invasive breast cancer [21]. Furthermore, fibroblasts are highly active cells involved in homeostasis, injury response, and extracellular matrix proteins production. Lung fibroblasts

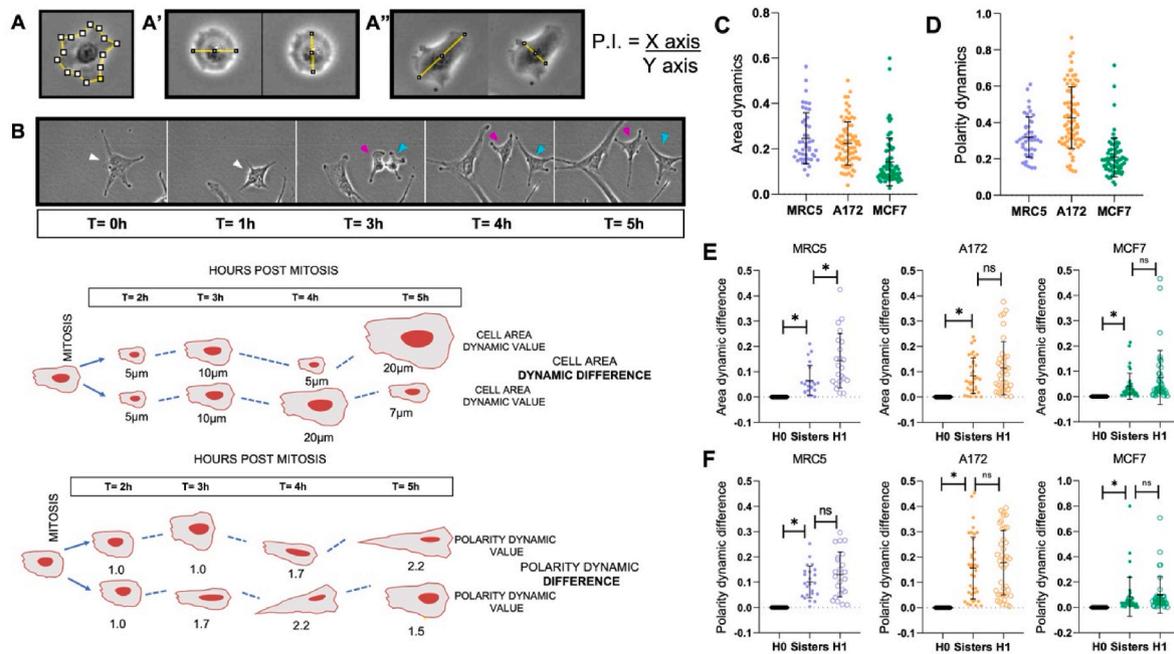


Fig. 3. Area and polarity dynamics between sister cells. **A.** The picture shows how we measure cell area in a microscopy image applying free hand selection in ImageJ software. The picture shows how we measure Polarity Index (P. I.) of a cell; we measure the X and Y axis and use for polarity index calculation, with an example of a low polarized (A') and a highly polarized cell (A''). **B.** Schematic representation of a mother cell and its division. After 2 h pos mitosis we measure cell area and polarity accordingly the imagens each hour until video ending. **C.** Area dynamics values in MRC5, A172 and MCF7. **D.** Polarity dynamics values in MRC5, A172 and MCF7. **E.** Cell area dynamics difference between MRC5, A172 and MCF7 sister cells. **F.** Polarity dynamics difference between MRC5, A172, MCF7 sister cells. Results are shown as mean \pm SD. ANOVA one-way was used to statistics in C and D plots. Student *t*-test was used to statistics in E and F plots. Statistical difference was considered when $p < 0.05$. MRC5 $n = 22$, MCF7 $n = 36$ and A172 $n = 36$.

are responsible for maintain homeostasis providing structural integrity to maintain anatomic and physiological lung functions, mainly with the collagen secretion [24]. Thus, it is expected that fibroblasts could have high velocity and directional migration, particularly in the context of wound healing and response to stimuli such as immune cues.

Tumors have a microenvironment composed by different cell types surrounding tumor cells leading to tumor heterogeneity. The cells composing microenvironment have different phenotypes acquired due to variations in gene expression and epigenetic alterations [25]. Accordingly, in glioblastoma and breast cancer we observed heterogeneity applying normality tests. We discerned two groups within the studied cell population with differing migration abilities. Glioblastoma cell population were composed of 64% highly migratory cells, while breast cancer population is composed in its majority by low migratory cells, probably due to low invasive characteristics. Therefore, we can indicate that highly migratory capabilities are related to invasion in tumor cells. Moreover, tumor cells with differing migration abilities are differentially invasive, with the more invasive cells being capable of metastasis and secondary tumor formation.

Upon examining cell migration characteristics in cells after mitosis, we found that a single mitotic event is sufficient to make sister cells behave as differently as unrelated cells in cell migration. This finding suggests that migration phenotype is linked to asymmetric mitosis. Previous studies have demonstrated that asymmetric segregation of PML bodies and lysosomes influences collective cell migration in epithelial cells [26] and that asymmetric mitosis generates cells with different migration capacities after mitosis in tissue development and homeostasis [19,27]. Furthermore, asymmetric segregation of some proteins such as EGFR could be contributing to generate functionally different sister cells in presence of EGF, including migratory phenotype [28]. Asymmetric distribution of EGFR is also shown in keratinocytes, squamous cell carcinoma and primary basal cell carcinoma [29]. Otherwise, directionality is similar in glioblastoma sister cells, as well as maximum displacement for glioblastoma and breast cancer cell sisters. A positive

correlation between asymmetric distribution of DNA and transwell chamber invasion ability was observed in breast cancer, implying that asymmetric segregation of DNA might increase the ability to metastasize [30]. Considering that maximum displacement difference is a parameter that functions as an indicator of heightened invasiveness, the observed statistical disparity we found between A172 and MCF7 sister cells and H1 implies the presence of asymmetric division. When we observe the invasiveness capacities in A172 and the suggested asymmetric division, this agrees with Liu et al., 2013 [30] (Fig. 2C, middle). However, we could not observe the same profile when the breast cancer cell line was tested (Fig. 2C, bottom).

We measured cell and polarity area as a phenotypic marker for migration ability to assess the dynamism of the process. Indeed, we confirmed our hypothesis that a normal cell line would display less post-mitotic heterogeneity in its morphology than tumor cells. In addition, cell polarity was highly dynamic in all cell lines and was not sustained between sister cells. This was expected once it is a process highly dependent on Cdc42 that influence where lamellipodia will form, localization of microtubule-organization center and Golgi apparatus in front of nucleus [31]. In agreement, there are core molecular mechanisms that are necessary for asymmetric cell division [32], such as Rap1, a small RhoGTPase that coordinates mitotic axes orientation, apical protein localization and asymmetric cell division [33]. Taken together, these findings underscore the role of asymmetric mitosis in generating heterogeneity in cell polarity.

Finally, our results indicate that mitosis potentially plays a role in maintaining cell area in fibroblasts, as post-mitotic sister cells displayed similar cell areas over time. We could not definitively establish whether mitosis or time influenced polarity similarity between sisters cells. However, in hematopoietic stem cells, polarity is strongly associated with division mode and predicts an asymmetric outcome in daughter cells related to aging [34]. Hence, our cells likely undergo asymmetric division with respect to polarity, which does not persist over time, suggesting the need for further investigation into the influence of

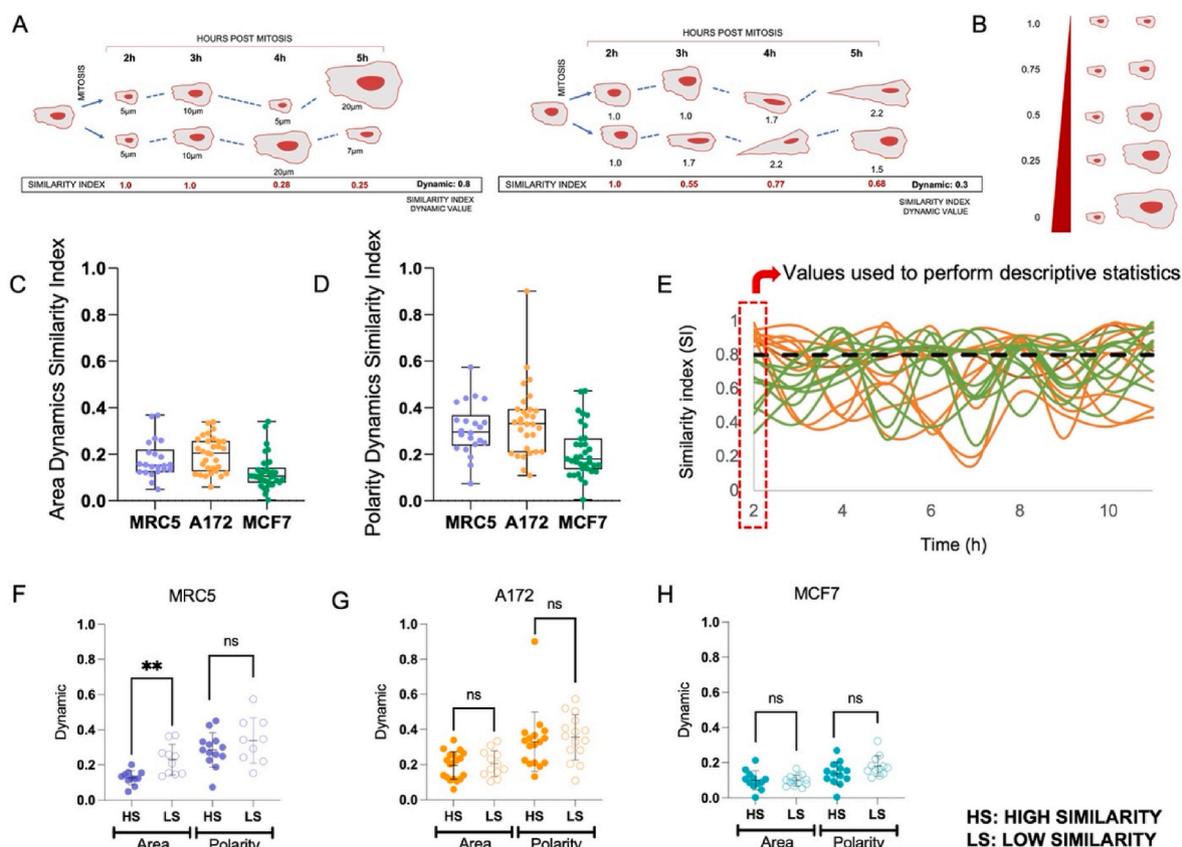


Fig. 4. MRC5 cell area dynamics is defined by mitosis. A. Cell area (left) and polarity (right) similarity index dynamics values were quantified accordingly this schematic representation. B. Similarity Index rational. C. Area dynamics similarity index values in MRC5, A172 and MCF7. D. Polarity dynamic similarity index values in MRC5, A172 and MCF7. E. Schematic representation of groups of values that were statistic tested to group HS post-mitosis (orange) and LS post-mitosis (green) sisters. F–H. Cell area and polarity dynamics values grouped according to the post mitosis similarity index in MRC5, A172 and MCF7. In C and D the result is shown as median and 1st and 3rd quartiles. F–H the result is shown as mean \pm SD and Student *t*-test were used to statistics. Statistical difference was considered when $p < 0.05$. MRC5 $n = 22$, MCF7 $n = 36$ and A172 $n = 36$.

microenvironment cues over time.

We highlighted here that both normal and tumor cells may exhibit similar migratory behaviors. Sister cells did not conserve migratory phenotype from their mother cells, and a single mitotic event is enough to sister cells behave like nonrelated cells. Migratory phenotype differences between sisters indicated that asymmetric mitosis also influences migration. Lastly, mitosis did not appear to impact cell area and polarity dynamics in tumor cells.

5. Conclusion

Our findings demonstrate that daughter cells exhibit different migratory phenotypes compared to their mother cells and between each other. Moreover, these migratory phenotype differences reveal the influence of asymmetric mitosis on cell behavior.

Funding sources

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Financial Code 406,258/2022–8 and 307,354/2022–9, and Fundação de Apoio a Pesquisa do Rio Grande do Sul/Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPERGS/FAPESP) – Financial Code 2019/15,477–3. M.T.T received CAPES fellowship, P.F.L. received FAPERGS fellowship, G.L. and M.L.L. received CNPq fellowships.

CRediT authorship contribution statement

Maurício Tavares Tamborindeguy: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing, Visualization. **Paola Farias Lorenzatto:** Formal analysis, Methodology, Data curation, Investigation. **Marcelo Lazzaron Lamers:** Formal analysis, Writing – original draft, Writing – review & editing, Conceptualization, Investigation, Supervision, Validation, Visualization. **Guido Lenz:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Project administration, Resources, Software, Validation, Supervision, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing.

Declaration of competing interest

None

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

We are grateful to Gilberto Lima Thomas and Rita Maria Cunha de Almeida (both from Federal University of Rio Grande do Sul – UFRGS) for discussion of results.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2023.113715>.

References

- [1] M. Kanamori, K. Oikawa, K. Tanemura, K. Hara, Mammalian germ cell migration during development, growth, and homeostasis, *Reprod. Med. Biol.* 18 (2019) 247–255, <https://doi.org/10.1002/rmb2.12283>.
- [2] Y. Zhang, K.K. Do, F. Wang, X. Lu, J.Y. Liu, C. Li, B.P. Ceresa, L. Zhang, D.C. Dean, Y. Liu, Zeb1 facilitates corneal epithelial wound healing by maintaining corneal epithelial cell viability and mobility, *Commun Biol* 6 (2023) 434, <https://doi.org/10.1038/s42003-023-04831-0>.
- [3] K.E. Loesel, H.L. Hiraki, B.M. Baker, C.A. Parent, An adaptive and versatile method to quantitate and characterize collective cell migration behaviors on complex surfaces, *Front. Cell Dev. Biol.* 11 (2023), <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1106653>.
- [4] M. Joo, D. Kim, M.W. Lee, H.J. Lee, J.M. Kim, GDF15 promotes cell growth, migration, and invasion in gastric cancer by inducing STAT3 activation, *Int. J. Mol. Sci.* 24 (2023), <https://doi.org/10.3390/ijms24032925>.
- [5] S. Seetharaman, S. Etienne-Manneville, Cytoskeletal crosstalk in cell migration, cytoskeletal crosstalk in cell migration, *Trends Cell Biol.* 30 (2020) 720–735, <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.06.004i>.
- [6] X. Guan, X. Guan, C. Dong, Z. Jiao, Rho GTPases and related signaling complexes in cell migration and invasion, *Exp. Cell Res.* 388 (2020), <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.111824>.
- [7] E. Crosas-Molist, R. Samain, L. Kohlhammer, J.L. Orgaz, S.L. George, O. Maiques, J. Barcelo, V. Sanz-Moreno, RHO GTPase signaling in cancer progression and dissemination, *Physiol. Rev.* 102 (2022) 455–510, <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2020>.
- [8] Z. Li, Y.Y. Zhang, H. Zhang, J. Yang, Y. Chen, H. Lu, Asymmetric cell division and tumor heterogeneity, *Front. Cell Dev. Biol.* 10 (2022), <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.938685>.
- [9] K. Hinohara, K. Polyak, Intratumoral heterogeneity: more than just mutations, *Trends Cell Biol.* 29 (2019) 569–579, <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.03.003>.
- [10] J.M. Gudbergsson, S. Kostrikov, K.B. Johnsen, F.P. Fliedner, C.B. Stolberg, N. Humle, A.E. Hansen, B.W. Kristensen, G. Christiansen, A. Kjær, T.L. Andresen, M. Duroux, A tumorsphere model of glioblastoma multiforme with intratumoral heterogeneity for quantitative analysis of cellular migration and drug response, *Exp. Cell Res.* 379 (2019) 73–82, <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.03.031>.
- [11] J.H. Buss, L.S. Lenz, L.C. Pereira, D. Torgo, J. Marcolin, K.R. Begnini, G. Lenz, The role of mitosis in generating fitness heterogeneity, *J. Cell Sci.* 136 (2023), <https://doi.org/10.1242/jcs.260103>.
- [12] C. Liu, M. Li, Z.X. Dong, D. Jiang, X. Li, S. Lin, D. Chen, X. Zou, X.D. Zhang, G. D. Luker, Heterogeneous microenvironmental stiffness regulates pro-metastatic functions of breast cancer cells, *Acta Biomater.* 131 (2021) 326–340, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.07.009>.
- [13] J. Weiße, J. Rosemann, L. Müller, M. Kappler, A.W. Eckert, M. Glaß, D. Misiak, S. Hüttelmaier, W.G. Ballhausen, M. Hatzfeld, M. Haemmerle, T. Gutschner, Identification of lymphocyte cell-specific protein-tyrosine kinase (LCK) as a driver for invasion and migration of oral cancer by tumor heterogeneity exploitation, *Mol. Cancer* 20 (2021), <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01384-w>.
- [14] Y. Liu, L. Siles, X. Lu, K.C. Dean, M. Cuatrecasas, A. Postigo, D.C. Dean, Mitotic polarization of transcription factors during asymmetric division establishes fate of forming cancer cells, *Nat. Commun.* 9 (2018), <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04663-1>.
- [15] L. Wang, P. Bu, Y. Ai, T. Srinivasan, H. Joyce Chen, K. Xiang, S.M. Lipkin, X. Shen, A long non-coding RNA targets microRNA miR-34a to regulate colon cancer stem cell asymmetric division, *Elife* 5 (2016) 1–16, <https://doi.org/10.7554/elife.14620.001>.
- [16] L.S. Lenz, J.L. Faccioni, P.A. Bracco, J.A.F. Santos, L.C. Pereira, J.H. Buss, M. T. Tamborindeguy, D. Torgo, T. Monteiro, G.B. Mantovani, C.N. Santo, J. C. Marcolin, E. Dalsin, A. Vigo, S.M. Callegari-Jacques, A.O. Silva, G.R. Onzi, K. R. Begnini, G. Lenz, Cancer cell fitness is dynamic, *Cancer Res.* 81 (2021) 1040–1051, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-2488>.
- [17] M. Hitomi, A.P. Chumakova, D.J. Silver, A.M. Knudsen, W. Dean Pontius, S. Murphy, N. Anand, B.W. Kristensen, J.D. Lathia, Asymmetric cell division promotes therapeutic resistance in glioblastoma stem cells, *JCI Insights* 6 (2021) 1–16, <https://doi.org/10.1172/jci.pnas.2100805118/-/DCSupplemental>.
- [18] C. Xie, Y. Jiang, Z. Zhu, S. Huang, W. Li, G. Ou, Actin filament debranching regulates cell polarity during cell migration and asymmetric cell division, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 118 (2021) 1–11, <https://doi.org/10.1073/pnas.2100805118/-/DCSupplemental>.
- [19] G. Costa, K.I. Harrington, H.E. Lovegrove, D.J. Page, S. Chakravartula, K. Bentley, S.P. Herbert, Asymmetric division coordinates collective cell migration in angiogenesis, *Nat. Cell Biol.* 18 (2016) 1292–1301, <https://doi.org/10.1038/ncb3443>.
- [20] G.R. Onzi, J.L. Faccioni, A.G. Alvarado, P.A. Bracco, H.I. Kornblum, G. Lenz, SCOUT: single-cell outlier analysis in cancer, *bioRxiv* (2020) 1–5, <https://doi.org/10.1101/2020.03.25.007518>.
- [21] G. Wan, Y. Liu, J. Zhu, L. Guo, C. Li, Y. Yang, X. Gu, L.L. Deng, C. Lu, SLFN5 suppresses cancer cell migration and invasion by inhibiting MT1-MMP expression via AKT/GSK-3 β / β -catenin pathway, *Cell. Signal.* 59 (2019) 1–12, <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.03.004>.
- [22] C.H. Stuelten, C.A. Parent, D.J. Montell, Cell motility in cancer invasion and metastasis: insights from simple model organisms, *Nat. Rev. Cancer* 18 (2018) 296–312, <https://doi.org/10.1038/nrc.2018.15>.
- [23] A. Vollmann-Zwerenz, V. Leidgens, G. Feliciello, C.A. Klein, P. Hau, Tumor cell invasion in glioblastoma, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020), <https://doi.org/10.3390/ijms21061932>.
- [24] K.Y. DeLeon-Pennell, T.H. Barker, M.L. Lindsey, Fibroblasts: the arbiters of extracellular matrix remodeling, *Matrix Biol.* 91–92 (2020), <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2020.05.006>, 1–7.
- [25] A.T. Vessoni, E.C. Filippi-Chiela, G. Lenz, L.F.Z. Batista, Tumor propagating cells: drivers of tumor plasticity, heterogeneity, and recurrence, *Oncogene* 39 (2020) 2055–2068, <https://doi.org/10.1038/s41388-019-1128-4>.
- [26] E. Lång, A. Poleć, A. Lång, M. Valk, P. Blicher, A.D. Rowe, K.A. Tønseth, C. J. Jackson, T.P. Utheim, L.M.C. Janssen, J. Eriksson, S.O. Bøe, Coordinated collective migration and asymmetric cell division in confluent human keratinocytes without wounding, *Nat. Commun.* 9 (2018), <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05578-7>.
- [27] S.C. Noctor, V. Martínez-Cerdeño, L. Ivic, A.R. Kriegstein, Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases, *Nat. Neurosci.* 7 (2004) 136–144, <https://doi.org/10.1038/nn1172>.
- [28] Y. Sun, S.K. Goderie, S. Temple, Asymmetric distribution of EGFR receptor during mitosis generates diverse CNS progenitor cells, *Neuron* 45 (2005) 873–886, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.01.045>.
- [29] H. Le Roy, T. Zulfiani, I. Wolowczuk, N. Faivre, N. Jouy, B. Masselot, J.P. Kerkaert, P. Formstecher, R. Polakowska, Asymmetric distribution of epidermal growth factor receptor directs the fate of normal and cancer keratinocytes in vitro, *Stem Cell Dev.* 19 (2010) 209–220, <https://doi.org/10.1089/scd.2009.0150>.
- [30] W. Liu, G. Jeganathan, S. Amiri, K.M. Morgan, B.M. Ryan, S.R. Pine, Asymmetric Segregation of Template DNA Strands in Basal-like Human Breast Cancer Cell Lines, 2013. <http://www.molecular-cancer.com/content/12/1/139>.
- [31] A.J. Ridley, M.A. Schwartz, K. Burridge, R.A. Firtel, M.H. Ginsberg, G. Borisy, J. T. Parsons, A.R. Horwitz, Cell migration: integrating signals from front to back, *Science* (1979), <https://doi.org/10.1126/science.1092053>, 302 (2003) 1704–1709.
- [32] Y. Jossin, Molecular mechanisms of cell polarity in a range of model systems and in migrating neurons, *Mol. Cell. Neurosci.* 106 (2020), 103503, <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2020.103503>.
- [33] A. Carmena, A. Makarova, S. Speicher, The Rap1–Rgl–Ral signaling network regulates neuroblast cortical polarity and spindle orientation, *JCB (J. Cell Biol.)* 195 (2011) 553–562, <https://doi.org/10.1083/jcb.201108112>.
- [34] M.C. Florian, M. Klose, M. Sacma, J. Jablanovic, L. Knudson, K.J. Nattamai, G. Marka, A. Vollmer, K. Soller, V. Sakk, N. Cabezas-Wallscheid, Y. Zheng, M. A. Mulaw, I. Glauche, H. Geiger, Aging alters the epigenetic asymmetry of HSC division, *PLoS Biol.* 16 (2018), e2003389, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2003389>.

CAPÍTULO IV

Neste capítulo serão discutidos os resultados encontrados nos projetos de pesquisa que foram desenvolvidos durante o período de doutorado, bem como as conclusões obtidas no trabalho.

DISCUSSÃO

A disseminação de células tumorais depende da migração de células individuais, ou de um pequeno grupo de células através da invasão de um tecido (STUELTEN; PARENT; MONTELL, 2018). A definição e a causa de qual célula invade tem sido amplamente estudada, e uma grande parte dos estudos mostra vias diferentes para cada tipo celular, e a mesma via atuando em diferentes tipos de células tumorais. Nesse estudo, foi proposto que a mitose assimétrica contribuía para que uma célula irmã tivesse uma performance migratória maior que a outra, causando uma heterogeneidade de migração celular. De fato, entender as origens da heterogeneidade de migração é um trabalho importante para fins de minimizar a proporção de células capazes de invadir e metastizar.

Inicialmente, foi realizada a caracterização da performance migratória em diferentes linhagens celulares, incluindo células de tecidos normais e de tecidos tumorais, com a finalidade de identificar uma característica em comum que pudesse ser avaliada como característica de células que realizam metástase. Em adição aos parâmetros de velocidade e direcionalidade, incluímos a análise de picos de migração de uma célula. Uma vez que hipotetizamos que se uma célula precisa tomar uma decisão de invadir, seria mais vantajoso ter a habilidade de uma migração rápida em um curto período de tempo para invasão e metástase, do que a velocidade média, pois médias iguais com variâncias diferentes indicariam um resultado diferente. -Portanto, determinamos a análise de picos de migração, como deslocamento máximo que cada célula teve em sua respectiva trajetória. De fato, na caracterização migratória geral, células tumorais de mama e GBM tiveram uma média de deslocamento máximo maior que a linhagem de fibroblasto de pulmão. E ainda, na comparação de similaridade de migração entre irmãs, esse foi o parâmetro que células irmãs tumorais mantiveram similares entre si. Quando comparamos com a linhagem normal, há uma sugestão que os maiores deslocamentos em um curto período é uma característica de linhagens tumorais, e poderiam influenciar na invasividade.

Ainda na comparação do fenótipo migratório entre as linhagens normais e tumorais, foi observado que fibroblastos do pulmão podem ser tão migratórios quanto a linhagem tumoral de mama, exibindo maior velocidade e direcionalidade. Isso pode ser explicado pelo fato de fibroblastos serem células altamente ativas envolvidas na homeostase, resposta a lesões e produção de proteínas da ECM como o colágeno (DELEON-PENNELL; BARKER; LINDSEY, 2020). Portanto, é esperado que fibroblastos tenham uma maior migração mais veloz e direcional, particularmente no contexto de cicatrização de feridas. Além disso, a linhagem de tumor de mama utilizada, MCF-7, é associada a uma característica de baixa invasividade (WAN *et al.*, 2019). As células de GBM exibiram a maior velocidade, direcionalidade e deslocamento máximo dentre as avaliadas. O GBM é tipicamente caracterizado como um tumor altamente invasivo devido sua infiltração extensa através das estruturas cerebrais (CUDDAPAH *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2020). Esse nível de infiltração indica um tumor maligno que frequentemente resulta num prognóstico pior ao paciente (VOLLMANN-ZWERENZ *et al.*, 2020). Além disso, 64% da população de células tumorais de GBM avaliadas eram altamente migratórias, indicando uma heterogeneidade da população, uma vez que a análise estatística demonstrou não normalidade nos dados. Não surpreendentemente, estudos já descreveram a alta heterogeneidade desse tumor. Fenótipos relacionados à capacidade celular de sobrevivência, como danos ao DNA, morfologia nuclear e atividade de ERK - este último também associado à migração celular coletiva (HINO *et al.*, 2022; HIRATA; KI*-YOKAWA, 2019) - demonstraram apresentar assimetria durante a mitose ou adquirir assimetria ao longo do ciclo celular (BUSS *et al.*, 2023).

Em suma, células não tumorais podem ser tão migratórias ou mais migratórias que células tumorais. Porém, o mesmo não pode se dizer quando avaliamos a heterogeneidade dessas linhagens analisadas. Os testes de heterogeneidade demonstraram distribuição não-normal (ou bimodal) em todas as linhagens tumorais nos parâmetros avaliados, destacando que a heterogeneidade é maior quando se trata de câncer. Os tumores têm microambiente composto por diferentes tipos celulares que estão em torno das células tumorais, gerando diferentes interações, como a

sinalização celular (BRAGANHOL *et al.*, 2020; ISER *et al.*, 2022), que pode resultar em heterogeneidade. As células que compõem o microambiente têm diferentes fenótipos que são adquiridos devido a variações na expressão gênica e alterações epigenéticas (VESSONI *et al.*, 2020). Essas variações em modificações epigenéticas poderiam estar contribuindo com a heterogeneidade da população que observamos, uma vez que há heterogeneidade intratumoral no perfil de metilação de DNA em GBM (WENGER *et al.*, 2019). Por sua vez, a análise de perfil de metilação em linhagens tumorais de câncer de mama também identificou padrões específicos de metilação em cada linhagem tumoral, e diferentes subpopulações celulares com fenótipo molecular distinto em amostras do TCGA (WEN *et al.*, 2016).

O ambiente externo como a ECM pode provocar heterogeneidade, a expressão de diferentes marcadores de EMT em diferentes regiões da ECM pode contribuir para heterogeneidade em GBM (GUDBERGSSON *et al.*, 2019). Enquanto que, em tumor de mama foi demonstrado que a diferente rigidez de ECM leva a um aumento de migração em regiões mais rígidas (LIU, C. *et al.*, 2021). A heterogeneidade relacionada a migração que encontramos nas nossas populações de células tumorais analisadas pode estar associada a estados epigenéticos diferente, a diferente sinalização entre células do tumor com o microambiente, ou propriedades físicas do meio extracelular.

Ao investigar as características de migração celular em células pós-mitose, constatamos que um único evento mitótico é capaz de induzir um comportamento celular significativamente divergente entre células irmãs, equiparando-se à variação observada entre células não relacionadas durante a migração celular. Esse fato sugere uma associação entre o fenótipo de migração celular e a ocorrência de mitose assimétrica. Essa associação é demonstrada em outros estudos como migração celular de células de câncer de pulmão, onde a mitose assimétrica tem papel o início da formação de tumores com mutação K-Ras. Células pré-tumorais no adenoma ativaram o ciclo de retroalimentação de CD44/Zeb1, gerando uma população intermediária de células transicionais Zeb1 alto / CD44 alto, com características tumorigênicas (LIU *et al.*, 2018). Logo, a diferença de expressão de Zeb1 pode estar contribuindo para indução de perfil mais mesenquimal de algumas células pós-mitose

e contribuindo para invasão. Estudos prévios demonstraram que a segregação assimétrica de corpos PML e lisossomos influenciam a migração coletiva de células epiteliais (LÅNG *et al.*, 2018b) e que mitose assimétrica gerava células com diferentes capacidades migratórias durante desenvolvimento tecidual e homeostase (COSTA *et al.*, 2016; NOCTOR *et al.*, 2004). Em GBM, fenótipos relacionados ao *fitness*, como a atividade da ERK (referindo-se à ERK1 e ERK2, também conhecidas como MAPK3 e MAPK1, respectivamente), apresentaram assimetria e contribuíram para a variabilidade fenotípicas em células tumorais (BUSS *et al.*, 2023). Considerando que a via de sinalização da ERK regula vários processos, dentre eles o processo de migração (LAVOIE; GAGNON; THERRIEN, 2020; SUN *et al.*, 2015), a distribuição assimétrica desse fator pode estar contribuindo para uma migração diferenciada entre células irmãs. Além disso, a segregação assimétrica de algumas proteínas como o EGFR poderia estar contribuindo para gerar células irmãs diferentes funcionalmente na presença do EGF, incluindo o fenótipo migratório (SUN; GODERIE; TEMPLE, 2005b). A distribuição assimétrica de EGFR também é destacada em queratinócitos, carcinoma de células escamosas e carcinoma primário basal (LE ROY *et al.*, 2010b).

Recentemente, estudos a nível de perfil epigenômico, transcriptômico e fenotípicos de células únicas indicaram que vários fenótipos se alteram de maneira rápida e dinâmica com poucas divisões (BUSS *et al.*, 2023; LENZ *et al.*, 2022, 2021), o que foi observado nesse estudo em relação a migração. Sendo assim, se torna de relevância questionar a origem desta variação, no caso, se a mudança do perfil migratório entre células irmãs era obtida logo após a mitose ou ao longo do ciclo celular. Portanto, o dinamismo de eventos morfológicos relacionados a migração celular foi avaliado a partir da quantificação da área celular e da polaridade como marcadores fenotípicos para a capacidade de migração. Nossos resultados confirmam a hipótese de que uma linhagem celular normal apresentaria menor heterogeneidade morfológica pós-mitótica em comparação com células tumorais. Também se constatou que a polaridade celular apresentava alta dinamicidade em todas as linhagens celulares e não era preservada entre as células irmãs. A polarização da célula é fortemente regulada por Cdc42, que influencia a formação dos lamelipódios, a

localização do centro de organização dos microtúbulos e o aparelho de Golgi na região frontal do núcleo (RIDLEY *et al.*, 2003), sendo assim a alta dinâmica do processo já era esperada. De fato, RhoGTPases também atuam na participação da divisão assimétrica (JOSSIN, 2020), Rap1 por exemplo, coordena orientação de eixos mitóticos, localização apical de proteínas e a própria divisão celular assimétrica (CARMENA; MAKAROVA; SPEICHER, 2011). Em conjunto dos nossos dados, se destaca o papel desempenhado pela mitose assimétrica na criação de heterogeneidade em relação a dinâmica do processo de polaridade celular. Nossos dados indicam que a mitose exerce um papel potencial na manutenção da área celular em fibroblastos, uma vez que células irmãs demonstraram similaridade de área pós-mitose, sendo que essa similaridade se manteve ao longo do período de migração, indicado pela baixa dinâmica. Não conseguimos definir se a mitose ou o tempo influencia a similaridade de polaridade entre células irmãs. Entretanto, em células-tronco hematopoiéticas, a polaridade celular esta fortemente associada com o modo de divisão e prediz um desfecho assimétrico em células filhas relacionadas ao envelhecimento (FLORIAN *et al.*, 2018). Portanto, nossas células provavelmente sofrem divisão assimétrica em relação a polaridade, que não persiste ao longo do tempo, sugerindo a necessidade de outros estudos sobre a influência do microambiente ao longo do tempo.

Apesar de não termos demonstrado o estado epigenético de células irmãs pós divisão, é muito provável que a perda de similaridade entre elas se dê por modificações epigenéticas. As alterações causadas na cromatina podem levar a expressão de genes responsáveis por aumentar o fenótipo migratório em uma célula mas não de outra após a divisão celular (Hsia *et al.*, 2023). Além disso, alterações na cromatina induzidas pela biomecânica de ECM são responsáveis pelo estabelecimento de “memória” e plasticidade celular (Price *et al.*, 2021; Scott *et al.*, 2023).

A interação entre células tumorais e ECM pode modular o comportamento celular, assim, o remodelamento da ECM consegue modificar fenótipos celulares e promover características malignas da célula tumoral (VAN HELVERT; STORM; FRIEDL, 2018; YAMADA; SIXT, 2019). O aumento da rigidez tecidual é uma

característica usual em tumores epiteliais e tem potencial de promover a transição maligna em células tumorais (BAKER *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2015; MATTE *et al.*, 2018; STOWERS *et al.*, 2019a). Contudo, a interação entre células de OSCC e rigidez da ECM tem sido pouco explorada, o que nos levou a investigar como modificações de histonas em células de OSCC são afetadas pela rigidez tecidual da ECM. Nosso grupo de pesquisa demonstrou previamente que a linhagem celular Cal27 não invasiva de OSCC adquire uma maior velocidade de migração quando condicionada em matriz rígida (MATTE *et al.*, 2018). Além disso, demonstramos que essa linhagem adquire memória da matriz rígida que permite as células manterem seu novo fenótipo mesmo estando em ambiente macio e que AKT e FAK exercem papel chave nesse processo (YOUN MOON *et al.*, 2023). Aqui, nós ampliamos esse estudo para investigar quais modificações em histonas induzem um fenótipo mais mesenquimal em OSCC, de forma a explorar o conceito de “aquisição de memória”.

Enquanto ocorre a evolução de regiões displásicas em OSCC invasivo, as células adquirem marcadores mesenquimais, por exemplo, vimentina (WEBBER *et al.*, 2017) e N-caderina (MATTE *et al.*, 2018), concomitantemente com metilação em H3K4 (ROGENHOFER *et al.*, 2013) e H3K27 e diminuição da H3K4Ac e H3K9Ac (CHEN *et al.*, 2013). Durante o condicionamento em PAAGs rígidos, células Cal27 exibiram níveis significativamente maiores na metilação de H3K9, e na acetilação de H3K9 e H3K27, em comparação com as células condicionadas em PAAGs macios. Esse perfil observado sugere que as modificações de histonas estão associadas com a aquisição de um fenótipo mais invasivo das células. Em amostras de tumores de OSCC, os níveis de metilação em H3K9 se mantiveram similares em diferentes estágios do tumor (CHEN *et al.*, 2013), no entanto, níveis mais elevados de metilação nesse resíduo estão associados a um prognóstico pior do paciente com câncer de próstata (ELLINGER *et al.*, 2010), mama e colorretal (LESZINSKI *et al.*, 2012). Enquanto nossos dados demonstram que níveis mais altos de acetilação em H3K9 foram observados em ambiente macio e rígido, indicando que essa modificação pode ser necessária para aquisição de um fenótipo mais agressivo, lesões de OSCC apresentam uma redução da acetilação em H3K9, também associada a pior

prognóstico de pacientes com câncer de boca (WEBBER *et al.*, 2017). Considerando o tempo de evolução de uma lesão tumoral de câncer de boca, o que pode estar acontecendo é que a acetilação em H3K9 seja necessária no início do processo de progressão tumoral. Assim, a cromatina mais frouxa permite a interação com fatores de transcrição, e ao longo do tempo a acetilação pode não ser mais necessária. Logo, seria explicado a redução de acetilação em H3K9 em pacientes com pior prognóstico, destacando o estudo desse condicionamento em um maior período para avaliação dessas modificações epigenéticas. Além do mais, o aumento na acetilação de H3K9 tem sido relatado em pacientes com câncer de pulmão (BARLÉSI *et al.*, 2007) e de mama com pior prognóstico (ELLINGER *et al.*, 2010; JUDES *et al.*, 2016). Devemos considerar que os dados obtidos de perfil de modificações em histonas refletem um conjunto de modificações pós-traducionais global de uma população celular. Entretanto, as modificações em regiões específicas da cromatina é o que impacta na célula, e as modificações pós-traducionais atuam como uma indicação do que acontece a nível de modificação na cromatina, logo estudar os sítios de acesso de modificação na cromatina é uma das ideias que contribuem para elucidar esses dados.

A progressão de OSCC tem sido associada com alterações em acetilação e metilação, indicando uma provável regulação da memória mecânica através de enzimas como histonas acetilases, desacetilases e metiltransferases (ARIF *et al.*, 2010; POGODA *et al.*, 2021). O fenótipo migratório e a expressão de genes relacionados ao EMT foram avaliados como indicadores de progressão tumoral em OSCC. Inibidores farmacológicos de HAT, HDAC e HMT foram empregados para analisar o impacto dessas modificações no perfil migratório de células Cal27 durante o condicionamento em PAAGs macios e rígidos. E, embora conseguimos demonstrar a inibição efetiva das modificações através de *western blot*, a inibição dessas enzimas não impactou a migração das células no ambiente rígido, apenas no ambiente macio. Considerando que o uso inibidor de HDAC (TSA) elevou os níveis de acetilação, o aumento na velocidade de migração das células no ambiente macio indica que a acetilação atua na aquisição de capacidade migratória aumentada. Enquanto o papel do inibidor de HAT (A485) era diminuir a acetilação, a redução na velocidade de

migração observada reafirma o papel que a acetilação exerce na progressão tumoral. Além disso, por essas modificações terem sido observadas em ambiente macio, corrobora com a hipótese de que a acetilação seria necessária apenas no início da progressão tumoral em OSCC. Em conjunto esses dados sugerem que a dinâmica de acetilação-metilação acompanha a progressão tumoral e pode ocorrer concomitantemente com o estabelecimento da rigidez e da memória.

A aquisição da expressão de marcadores mesenquimais em células de OSCC ocorre de acordo com o aumento da progressão do tumor (MATTE *et al.*, 2018). Estudos prévios mostraram que células de OSCC aumentam a sua expressão de N-caderina e de fatores de transcrição de EMT com o condicionamento em ambiente rígido (MATTE *et al.*, 2018). Inicialmente, nossos dados mostraram esse fenótipo mais mesenquimal de Cal27 com o condicionamento em ambiente rígido. Adicionalmente verificamos o que acontece quando inibimos acetilação e metilação durante o condicionamento em ambiente rígido. Em células tumorais de ovário tratadas com inibidores de HDAC e HMT, foi demonstrado que a diminuição da migração celular foi realizada a partir da indução da expressão de E-caderina e inibição da N-caderina (MENG *et al.*, 2013), ou seja, neste caso esta modulação epigenética promoveu um perfil epitelial. Diferentemente, mostramos que a inibição dessas modificações não interferiu na migração celular, apesar de aumentar a expressão de N-caderina e Snail-1, e não reduziu os níveis de E-caderina. Sendo assim, o perfil mesenquimal promovido pela rigidez da matriz foi potencializado com a modulação epigenética das modificações nas histonas. Em células tumorais do colón, a histona demetilase UTX reduziu níveis de trimetilação em H3K27 no promotor da E-caderina e sua interação com a histona acetilase CBP resultou na acetilação de H3K27 no promotor de E-caderina, resultando no aumento de E-caderina e inibição da migração (ZHA *et al.*, 2016). Nossos dados mostraram que Cal27 no ambiente rígido aumentou os níveis de acetilação de H3K27 sem afetar a velocidade de migração. Uma vez que os níveis de E-caderina não foram reduzidos com a inibição da acetilação e metilação, há uma sugestão de a E-caderina estar bloqueando o aumento da migração mesmo com uma potencialização dos marcadores mesenquimais. Seria interessante uma maior

investigação da ação da UTX no promotor de E-caderina nas células de OSCC, verificando se o que acontece em câncer de colón é similar em OSCC.

Dado que a expressão do mRNA Snail-1 e -2 aumenta em células Cal27 condicionadas em ECM rígida quando comparada a ECM macia (MATTE *et al.*, 2018), e sabendo que a ativação de fatores de transcrição pode ser influenciada por mecanismos epigenéticos, verificamos a resposta dos mesmos em células tratadas com inibidores de HAT e HMT. Nossos dados demonstram um aumento significativo (3x) na expressão de Snail-1 em células tratadas com inibidor de metilação e cultivadas em ECM rígida. Enquanto que, nas mesmas células tratadas com inibidor de acetilação o aumento foi menos significativo (1x). Em relação a Snail-2, a modulação epigenética não impactou sua expressão, o que pode estar relacionado com a baixa velocidade de migração dessas células nas mesmas condições. Snail-2 está associado com a indução de invasão e metástase em carcinoma hepatocelular, devido ao aumento de metilação de H3K9 e redução de acetilação em H3K4 e H3K56 (HU *et al.*, 2019). Ao observarmos o aumento de Snail-1 e -2 no grupo controle, e o aumento de Snail-1, mas não de Snail-2 nos grupos com inibidores de HAT e HMT, os dados sugerem Snail-2 é fundamental para migração e que os inibidores regulam Snail-2 negativamente. Entretanto, maiores estudos precisam ser realizados para determinar o papel do efeito de modificações epigenéticas no mecanismo de ação de Snail-2.

A análise ampla do conjunto desses dados experimentais nos fornece evidências que acetilação e metilação exercem papel na aquisição de memória mecânica do fenótipo de migração celular induzida pela rigidez em OSCC. No entanto, o papel da regulação de fatores de transcrição precisa ser explorado através da investigação da remodelação da cromatina mediada por modificações de histonas. O mapeamento de sítios acessíveis da cromatina seria uma alternativa de relevância significativa para estudos posteriores em câncer de boca.

CONCLUSÃO

1. A mitose assimétrica gera heterogeneidade no comportamento migratório de células tumorais.
2. Modificações de histonas em células não invasivas durante condicionamento em ambiente rígido participam da aquisição de comportamento mais invasivo em câncer de boca.

CONCLUSÃO REFERENTE AO CAPÍTULO II

- Células normais e tumorais podem exibir um fenótipo migratório similar;
- Células filhas não conservam o fenótipo migratório de sua mãe;
- Células irmãs mostraram diferença em seu comportamento migratório, indicando que mitose assimétrica influencia a migração;
- Mitose não influenciou a dinâmica de área celular e polaridade entre células irmãs.

CONCLUSÃO REFERENTE AO CAPÍTULO III

- ECM rígida aumentou a metilação de H3K9 e a acetilação de H3K9 e H3K27;
- A inibição de metilação e acetilação não alterou o comportamento migratório de Cal27 na ECM rígida;
- A inibição da metilação e acetilação aumentou a expressão de N-caderina e a expressão transcricional de Snail-1 em Cal27 na ECM rígida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AL-MEHDI, A B *et al.* Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 100–102, 2000.
2. ARIF, Mohammed *et al.* Nitric Oxide-Mediated Histone Hyperacetylation in Oral Cancer: Target for a Water-Soluble HAT Inhibitor, CTK7A. **Chemistry & Biology**, [s. l.], v. 17, n. 8, p. 903–913, 2010.
3. BAKER, A-M *et al.* Lysyl oxidase enzymatic function increases stiffness to drive colorectal cancer progression through FAK. **Oncogene**, [s. l.], v. 32, n. 14, p. 1863–1868, 2013.
4. BAKHOUM, Samuel F. *et al.* Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response. **Nature**, [s. l.], v. 553, n. 7689, p. 467–472, 2018.
5. BARLÉSI, Fabrice *et al.* Global Histone Modifications Predict Prognosis of Resected Non-Small-Cell Lung Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 25, n. 28, p. 4358–4364, 2007.
6. BAX, Noortje A.M. *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transformation alters electrical conductivity of human epicardial cells. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, [s. l.], v. 15, n. 12, p. 2675–2683, 2011.
7. BELLIN, Robert M *et al.* Defining the role of syndecan-4 in mechanotransduction using surface-modification approaches. **PNAS**, [s. l.], v. 106, n. 52, p. 22102–22107, 2009. Disponível em: www.pnas.org/cgi/content/full/.
8. BENAYOUN, Bérénice A. *et al.* H3K4me3 breadth is linked to cell identity and transcriptional consistency. **Cell**, [s. l.], v. 158, n. 3, p. 673–688, 2014.
9. BERGER, Shelley L. *et al.* An operational definition of epigenetics. **Genes and Development**, [s. l.], v. 23, n. 7, p. 781–783, 2009.
10. BONNANS, Caroline; CHOU, Jonathan; WERB, Zena. **Remodelling the extracellular matrix in development and disease**. [S. l.]: Nature Publishing Group, 2014.
11. BRABLETZ, Thomas *et al.* **EMT in cancer**. [S. l.]: Nature Publishing Group, 2018.
12. BRAGANHOL, Elizandra *et al.* Purinergic Signaling in Glioma Progression. *Em: [S. l.: s. n.]*, 2020. p. 87–108.
13. BRUFISKY, Adam M.; DICKLER, Maura N. Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer: Exploiting Signaling Pathways Implicated in Endocrine Resistance. **The Oncologist**, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 528–539, 2018.
14. BUSS, Julieti Huch *et al.* The role of mitosis in generating fitness heterogeneity. **Journal of Cell Science**, [s. l.], v. 136, n. 1, 2023.
15. CALVO, Fernando *et al.* Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. **Nature Cell Biology**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 637–646, 2013.
16. CAMPANALE, Joseph P.; MONTELL, Denise J. **Who's really in charge: Diverse follower cell behaviors in collective cell migration**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2023.

17. CAMPANALE, Joseph P.; SUN, Thomas Y.; MONTELL, Denise J. Development and dynamics of cell polarity at a glance. **Journal of Cell Science**, [s. l.], v. 130, n. 7, p. 1201–1207, 2017.
18. CAMPOY, Emanuel M. *et al.* Intratumor heterogeneity index of breast carcinomas based on DNA methylation profiles. **BMC Cancer**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 1–15, 2019.
19. CARMENA, Ana; MAKAROVA, Aljona; SPEICHER, Stephan. The Rap1–Rgl–Ral signaling network regulates neuroblast cortical polarity and spindle orientation. **Journal of Cell Biology**, [s. l.], v. 195, n. 4, p. 553–562, 2011.
20. CARTER, Benjamin; ZHAO, Keji. **The epigenetic basis of cellular heterogeneity**. [S. l.]: Nature Research, 2021.
21. CEJAS, Paloma *et al.* Subtype heterogeneity and epigenetic convergence in neuroendocrine prostate cancer. **Nature Communications**, [s. l.], v. 12, n. 1, 2021.
22. CHAFFER, Christine L. *et al.* EMT, cell plasticity and metastasis. **Cancer and Metastasis Reviews**, [s. l.], v. 35, n. 4, p. 645–654, 2016.
23. CHAMBERS, Ann F.; GROOM, Alan C.; MACDONALD, Ian C. **Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites**. [S. l.: s. n.], 2002.
24. CHEN, Ya-Wei *et al.* Histone modification patterns correlate with patient outcome in oral squamous cell carcinoma. **Cancer**, [s. l.], v. 119, n. 24, p. 4259–4267, 2013.
25. CHEN, Yulong *et al.* Lysyl hydroxylase 2 induces a collagen cross-link switch in tumor stroma. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 125, n. 3, p. 1147–1162, 2015.
26. CHINTHALAPUDI, Krishna; RANGARAJAN, Erumbi S.; IZARD, Tina. The interaction of talin with the cell membrane is essential for integrin activation and focal adhesion formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 115, n. 41, p. 10339–10344, 2018.
27. CHOI, Hye Yeon *et al.* p53 destabilizing protein skews asymmetric division and enhances NOTCH activation to direct self-renewal of TICs. **Nature Communications**, [s. l.], v. 11, n. 1, 2020.
28. CLARK, Andrew G.; VIGNJEVIC, Danijela Matic. **Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2015.
29. COLEGIO, Oscar R. *et al.* Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. **Nature**, [s. l.], v. 513, n. 7519, p. 559–563, 2014.
30. COSTA, Guilherme *et al.* Asymmetric division coordinates collective cell migration in angiogenesis. **Nature Cell Biology**, [s. l.], v. 18, n. 12, p. 1292–1301, 2016.
31. COX, Thomas R. *et al.* **Recent advances in understanding the complexities of metastasis**. [S. l.]: F1000 Research Ltd, 2018.
32. CROSAS-MOLIST, Eva *et al.* **RHO GTPase SIGNALING IN CANCER PROGRESSION AND DISSEMINATION**. [S. l.]: American Physiological Society, 2022.
33. CUDDAPAH, Vishnu Anand *et al.* A neurocentric perspective on glioma invasion. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 15, n. 7, p. 455–465, 2014.
34. DAGOGO-JACK, Ibiayi; SHAW, Alice T. **Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies**. [S. l.]: Nature Publishing Group, 2018.

35. DELEON-PENNELL, Kristine Y.; BARKER, Thomas H.; LINDSEY, Merry L. **Fibroblasts: The arbiters of extracellular matrix remodeling**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2020.
36. DENARDO, David G. *et al.* CD4+ T Cells Regulate Pulmonary Metastasis of Mammary Carcinomas by Enhancing Protumor Properties of Macrophages. **Cancer Cell**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 91–102, 2009.
37. DONNELLY, Sara K.; BRAVO-CORDERO, Jose Javier; HODGSON, Louis. **Rho GTPase isoforms in cell motility: Don't fret, we have FRET**. [S. l.]: Landes Bioscience, 2014.
38. ECCLES, Suzanne A; WELCH, Danny R. **Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies**. [S. l.: s. n.], 2007.
39. ELLINGER, Jörg *et al.* Global levels of histone modifications predict prostate cancer recurrence. **The Prostate**, [s. l.], v. 70, n. 1, p. 61–69, 2010.
40. ERLER, Janine T. *et al.* Hypoxia-Induced Lysyl Oxidase Is a Critical Mediator of Bone Marrow Cell Recruitment to Form the Premetastatic Niche. **Cancer Cell**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 35–44, 2009.
41. ESLAMI-S, Zahra; CORTÉS-HERNÁNDEZ, Luis Enrique; ALIX-PANABIÈRES, Catherine. **Epithelial Cell Adhesion Molecule: An Anchor to Isolate Clinically Relevant Circulating Tumor Cells**. [S. l.]: NLM (Medline), 2020.
42. FENG, Zixin *et al.* Circulating tumor cells in the early detection of human cancers. **International Journal of Biological Sciences**, [s. l.], v. 18, n. 8, p. 3251–3265, 2022.
43. FLORIAN, M. Carolina *et al.* Aging alters the epigenetic asymmetry of HSC division. **PLOS Biology**, [s. l.], v. 16, n. 9, p. e2003389, 2018.
44. FRIEDL, Peter. **Prespecification and plasticity: Shifting mechanisms of cell migration**. [S. l.: s. n.], 2004.
45. FRIEDL, Peter; ALEXANDER, Stephanie. **Cancer invasion and the microenvironment: Plasticity and reciprocity**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2011.
46. GADEA, Gilles *et al.* Loss of p53 promotes RhoA-ROCK-dependent cell migration and invasion in 3D matrices. **Journal of Cell Biology**, [s. l.], v. 178, n. 1, p. 23–30, 2007.
47. GAGGIOLI, Cedric *et al.* Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. **Nature Cell Biology**, [s. l.], v. 9, n. 12, p. 1392–1400, 2007.
48. GAHMBERG, Carl G.; GRÖNHOLM, Mikaela. **How integrin phosphorylations regulate cell adhesion and signaling**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2022.
49. GARRIDO-NAVAS, Carmen *et al.* **Cooperative and escaping mechanisms between circulating tumor cells and blood constituents**. [S. l.]: MDPI, 2019.
50. GIRES, Olivier *et al.* **Expression and function of epithelial cell adhesion molecule EpCAM: where are we after 40 years?**. [S. l.]: Springer, 2020.
51. GLENTIS, Alexandros; GURCHENKOV, Vasily; VIGNJEVIC, Danijela Matic. **Assembly, heterogeneity, and breaching of the basement membranes**. [S. l.]: Landes Bioscience, 2014.
52. GREAVES, Mel. **Evolutionary determinants of cancer**. [S. l.]: American Association for Cancer Research Inc., 2015.

53. GUAN, Xiaoying *et al.* **Rho GTPases and related signaling complexes in cell migration and invasion.** [S. l.]: Elsevier Inc., 2020.
54. GUDBERGSSON, Johann Mar *et al.* A tumorsphere model of glioblastoma multiforme with intratumoral heterogeneity for quantitative analysis of cellular migration and drug response. **Experimental Cell Research**, [s. l.], v. 379, n. 1, p. 73–82, 2019.
55. GUPTA, Gaorav P *et al.* **ID genes mediate tumor reinitiation during breast cancer lung metastasis.** [S. l.: s. n.], 2007. Disponível em: www.pnas.org/cgi/content/full/.
56. HANAHAN, Douglas. Hallmarks of cancer: New dimensions. **Cancer Discovery**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 31–46, 2022. Disponível em: [doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1059](https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059). Acesso em: 21 maio 2023.
57. HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. **Hallmarks of cancer: The next generation.** [S. l.: s. n.], 2011.
58. HARTMAN, Christopher D. *et al.* Extracellular matrix type modulates cell migration on mechanical gradients. **Experimental Cell Research**, [s. l.], v. 359, n. 2, p. 361–366, 2017.
59. HAUSMAN, Daniel. What is cancer?. **Persp Biol Med**, [s. l.], v. 62, n. 4, p. 778–784, 2019.
60. HEMA, K. N. *et al.* **Epigenetics in oral squamous cell carcinoma.** [S. l.]: Medknow Publications, 2017.
61. HINO, Naoya *et al.* A feedback loop between lamellipodial extension and HGF-ERK signaling specifies leader cells during collective cell migration. **Developmental Cell**, [s. l.], v. 57, n. 19, p. 2290-2304.e7, 2022.
62. HINOHARA, Kunihiro; POLYAK, Kornelia. **Intratumoral Heterogeneity: More Than Just Mutations.** [S. l.]: Elsevier Ltd, 2019.
63. HIRATA, Eishu; KIYOKAWA, Etsuko. **ERK activity imaging during migration of living cells in vitro and in vivo.** [S. l.]: MDPI AG, 2019.
64. HOHENESTER, Erhard; YURCHENCO, Peter D. **Laminins in basement membrane assembly.** [S. l.]: Taylor and Francis Inc., 2013.
65. HOWARD, Sara *et al.* A positive role of cadherin in wnt/ β -catenin signalling during epithelial-mesenchymal transition. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 6, n. 8, 2011.
66. HU, Yue *et al.* G9a and histone deacetylases are crucial for Snail2-mediated E-cadherin repression and metastasis in hepatocellular carcinoma. **Cancer Science**, [s. l.], v. 110, n. 11, p. 3442–3452, 2019.
67. INCA. **Estimativa 2023: Incidência do câncer no Brasil.** [S. l.: s. n.], 2023.
68. IOZZO, Renato V.; SCHAEFER, Liliana. **Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans.** [S. l.]: Elsevier, 2015.
69. ISER, Isabele Cristiana *et al.* The crossroads of adenosinergic pathway and epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. **Seminars in Cancer Biology**, [s. l.], v. 86, p. 202–213, 2022.
70. ISOZAKI, Yusuke *et al.* The Rho-guanine nucleotide exchange factor Solo decelerates collective cell migration by modulating the Rho-ROCK pathway and keratin networks. **Molecular Biology of the Cell**, [s. l.], v. 31, n. 8, p. 741–752, 2020.

71. JANISZEWSKA, Michalina; PRIMI, Marina Candido; IZARD, Tina. Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 295, n. 8, p. 2495–2505, 2020a.
72. JANISZEWSKA, Michalina; PRIMI, Marina Candido; IZARD, Tina. Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 295, n. 8, p. 2495–2505, 2020b.
73. JANSSEN, Erin; GEHA, Raif S. **Primary immunodeficiencies caused by mutations in actin regulatory proteins**. [S. l.]: Blackwell Publishing Ltd, 2019.
74. JOO, Mina *et al.* GDF15 Promotes Cell Growth, Migration, and Invasion in Gastric Cancer by Inducing STAT3 Activation. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 24, n. 3, 2023.
75. JOSSIN, Yves. Molecular mechanisms of cell polarity in a range of model systems and in migrating neurons. **Molecular and Cellular Neuroscience**, [s. l.], v. 106, p. 103503, 2020.
76. JUDES, Gaëlle *et al.* H3K4 acetylation, H3K9 acetylation and H3K27 methylation in breast tumor molecular subtypes. **Epigenomics**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 909–924, 2016.
77. KADZIK, Rachel S.; HOMA, Kaitlin E.; KOVAR, David R. **F-Actin Cytoskeleton Network Self-Organization through Competition and Cooperation**. [S. l.]: Annual Reviews Inc., 2020.
78. KAHNEY, Elizabeth W. *et al.* Symmetry from Asymmetry or Asymmetry from Symmetry?. **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**, [s. l.], v. 82, p. 305–318, 2017.
79. KAI, Fui Boon; DRAIN, Allison P.; WEAVER, Valerie M. **The Extracellular Matrix Modulates the Metastatic Journey**. [S. l.]: Cell Press, 2019.
80. KANAMORI, Mizuho *et al.* **Mammalian germ cell migration during development, growth, and homeostasis**. [S. l.]: John Wiley and Sons Ltd, 2019.
81. KANG, Sung Gu *et al.* Effect of laminin 332 on motility and invasion in bladder cancer. **Kaohsiung Journal of Medical Sciences**, [s. l.], v. 29, n. 8, p. 422–429, 2013.
82. KATSUNO, Yoko; DERYNCK, Rik. **Epithelial plasticity, epithelial-mesenchymal transition, and the TGF- β family**. [S. l.]: Cell Press, 2021.
83. KATSUNO, Yoko; LAMOUILLE, Samy; DERYNCK, Rik. TGF- β signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression. **Curr Opin Oncol**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 76–84, 2013.
84. KECHAGIA, Jenny Z.; IVASKA, Johanna; ROCA-CUSACHS, Pere. **Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment**. [S. l.]: Nature Publishing Group, 2019.
85. KESSENBROCK, Kai; WANG, Chih Yang; WERB, Zena. **Matrix metalloproteinases in stem cell regulation and cancer**. [S. l.]: Elsevier, 2015.
86. KHALIL, Antoine A.; FRIEDL, Peter. **Determinants of leader cells in collective cell migration**. [S. l.: s. n.], 2010.
87. KLASSEN, Liliane M.B. *et al.* MMP9 gene expression regulation by intragenic epigenetic modifications in breast cancer. **Gene**, [s. l.], v. 642, p. 461–466, 2018.

88. KRESO, Antonija; DICK, John E. **Evolution of the cancer stem cell model**. [S. l.]: Cell Press, 2014.
89. LÅNG, Emma *et al.* Coordinated collective migration and asymmetric cell division in confluent human keratinocytes without wounding. **Nature Communications**, [s. l.], v. 9, n. 1, 2018a.
90. LÅNG, Emma *et al.* Coordinated collective migration and asymmetric cell division in confluent human keratinocytes without wounding. **Nature Communications**, [s. l.], v. 9, n. 1, 2018b.
91. LAVOIE, Hugo; GAGNON, Jessica; THERRIEN, Marc. **ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate**. [S. l.]: Nature Research, 2020.
92. LAWSON, Devon A. *et al.* **Tumour heterogeneity and metastasis at single-cell resolution**. [S. l.]: Nature Publishing Group, 2018.
93. LE ROY, Hélène *et al.* Asymmetric distribution of epidermal growth factor receptor directs the fate of normal and cancer keratinocytes in vitro. **Stem Cells Dev**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 209–220, 2010a.
94. LE ROY, Hélène *et al.* Asymmetric distribution of epidermal growth factor receptor directs the fate of normal and cancer keratinocytes in vitro. **Stem Cells and Development**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 209–220, 2010b.
95. LEHMANN, Steffi *et al.* Hypoxia Induces a HIF-1-Dependent Transition from Collective-to-Amoeboid Dissemination in Epithelial Cancer Cells. **Current Biology**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 392–400, 2017.
96. LENZ, Luana S. *et al.* Cancer Cell Fitness Is Dynamic. **Cancer Research**, [s. l.], v. 81, n. 4, p. 1040–1051, 2021.
97. LENZ, Guido *et al.* The Origins of Phenotypic Heterogeneity in Cancer. **Cancer Research**, [s. l.], v. 82, n. 1, p. 3–11, 2022.
98. LESZINSKI, Gloria *et al.* Relevance of Histone Marks H3K9me3 and H4K20me3 in Cancer. **Anticancer Research**, [s. l.], v. 32, p. 2199–2206, 2012.
99. LI, Zizhu *et al.* **Asymmetric Cell Division and Tumor Heterogeneity**. [S. l.]: Frontiers Media S.A., 2022.
100. LI, Chao *et al.* Characterizing tumor invasiveness of glioblastoma using multiparametric magnetic resonance imaging. **Journal of Neurosurgery**, [s. l.], v. 132, n. 5, p. 1465–1472, 2020.
101. LI, Shun; PRITCHARD, David Mark; YU, Lu Gang. **Regulation and Function of Matrix Metalloproteinase-13 in Cancer Progression and Metastasis**. [S. l.]: MDPI, 2022.
102. LIN, Danfeng *et al.* **Circulating tumor cells: biology and clinical significance**. [S. l.]: Springer Nature, 2021.
103. LINDNER, Pablo *et al.* EMT transcription factor ZEB1 alters the epigenetic landscape of colorectal cancer cells. **Cell Death and Disease**, [s. l.], v. 11, n. 2, 2020.
104. LINTZ, Marianne; MUÑOZ, Adam; REINHART-KING, Cynthia A. **The Mechanics of Single Cell and Collective Migration of Tumor Cells**. [S. l.]: American Society of Mechanical Engineers (ASME), 2017a.

105. LINTZ, Marianne; MUÑOZ, Adam; REINHART-KING, Cynthia A. **The Mechanics of Single Cell and Collective Migration of Tumor Cells**. [S. l.]: American Society of Mechanical Engineers (ASME), 2017b.
106. LIU, Juan *et al.* **Dendritic cell migration in inflammation and immunity**. [S. l.]: Springer Nature, 2021.
107. LIU, Chun *et al.* Heterogeneous microenvironmental stiffness regulates pro-metastatic functions of breast cancer cells. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 131, p. 326–340, 2021.
108. LIU, Yongqing *et al.* Mitotic polarization of transcription factors during asymmetric division establishes fate of forming cancer cells. **Nature Communications**, [s. l.], v. 9, n. 1, 2018.
109. LOESEL, Kristen E. *et al.* An adaptive and versatile method to quantitate and characterize collective cell migration behaviors on complex surfaces. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 11, 2023.
110. LOHI, J *et al.* Basement membrane laminin-5 is deposited in colorectal adenomas and carcinomas and serves as a ligand for alpha3beta1 integrin. **APMIS**, [s. l.], v. 108, n. 3, p. 161–172, 2000.
111. LOHR, Jens G. *et al.* Whole-exome sequencing of circulating tumor cells provides a window into metastatic prostate cancer. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 32, n. 5, p. 479–484, 2014.
112. MALIK, Ruchi; LELKES, Peter I.; CUKIERMAN, Edna. **Biomechanical and biochemical remodeling of stromal extracellular matrix in cancer**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2015.
113. MATTE, Bibiana F. *et al.* Matrix stiffness mechanically conditions EMT and migratory behavior of oral squamous cell carcinoma. **Journal of Cell Science**, [s. l.], 2018.
114. MCGRANAHAN, Nicholas; SWANTON, Charles. **Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future**. [S. l.]: Cell Press, 2017.
115. MENG, Fanliang *et al.* Inhibition of DNA methyltransferases, histone deacetylases and lysine-specific demethylase-1 suppresses the tumorigenicity of the ovarian cancer ascites cell line SKOV3. **International Journal of Oncology**, [s. l.], v. 43, n. 2, p. 495–502, 2013.
116. MERINO-CASALLO, Francisco *et al.* **Unravelling cell migration: defining movement from the cell surface**. [S. l.]: Taylor and Francis Ltd., 2022.
117. MOHAN, Vishnu; DAS, Alakesh; SAGI, Irit. **Emerging roles of ECM remodeling processes in cancer**. [S. l.]: Academic Press, 2020.
118. MOSQUERA, Matthew J. *et al.* Extracellular Matrix in Synthetic Hydrogel-Based Prostate Cancer Organoids Regulate Therapeutic Response to EZH2 and DRD2 Inhibitors. **Advanced Materials**, [s. l.], v. 34, n. 2, 2022.
119. MOUW, Janna K.; OU, Guanqing; WEAVER, Valerie M. **Extracellular matrix assembly: A multiscale deconstruction**. [S. l.]: Nature Publishing Group, 2014.
120. NAJAFI, Masoud; FARHOOD, Bagher; MORTEZAEE, Keywan. Extracellular matrix (ECM) stiffness and degradation as cancer drivers. **Journal of Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 120, n. 3, p. 2782–2790, 2019.

121. NEUMÜLLER, Ralph A.; KNOBLICH, Juergen A. **Dividing cellular asymmetry: Asymmetric cell division and its implications for stem cells and cancer.** [S. l.: s. n.], 2009.
122. NGUYEN, Don X.; BOS, Paula D.; MASSAGUÉ, Joan. **Metastasis: From dissemination to organ-specific colonization.** [S. l.: s. n.], 2009.
123. NIETO, M. Angela. **Epithelial plasticity: A common theme in embryonic and cancer cells.** [S. l.]: American Association for the Advancement of Science, 2013.
124. NILAND, Stephan; RISCANEVO, Andrea Ximena; EBLE, Johannes Andreas. **Matrix metalloproteinases shape the tumor microenvironment in cancer progression.** [S. l.]: MDPI, 2022.
125. NOCTOR, Stephen C. *et al.* Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 136–144, 2004.
126. ORTIZ-OTERO, Nerymar *et al.* Chemotherapy-induced release of circulating-tumor cells into the bloodstream in collective migration units with cancer-associated fibroblasts in metastatic cancer patients. **BMC Cancer**, [s. l.], v. 20, n. 1, 2020.
127. PADUA, David *et al.* TGF β Primes Breast Tumors for Lung Metastasis Seeding through Angiopoietin-like 4. **Cell**, [s. l.], v. 133, n. 1, p. 66–77, 2008.
128. PALMIERO, Miriam *et al.* Collective directional migration drives the formation of heteroclonal cancer cell clusters. **Molecular Oncology**, [s. l.], 2023.
129. PANDIANI, Charlotte *et al.* Single-cell RNA sequencing reveals intratumoral heterogeneity in primary uveal melanomas and identifies HES6 as a driver of the metastatic disease. **Cell Death and Differentiation**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 1990–2000, 2021.
130. PASTORE, Alessandro *et al.* Corrupted coordination of epigenetic modifications leads to diverging chromatin states and transcriptional heterogeneity in CLL. **Nature Communications**, [s. l.], v. 10, n. 1, 2019.
131. PEI, Jing *et al.* Epigenetic regulator KDM4A activates Notch1-NICD-dependent signaling to drive tumorigenesis and metastasis in breast cancer. **Translational Oncology**, [s. l.], v. 28, 2023.
132. PENG, Qiyao; VERMOLEN, Fred J.; WEIHS, Daphne. Physical confinement and cell proximity increase cell migration rates and invasiveness: A mathematical model of cancer cell invasion through flexible channels. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, [s. l.], v. 142, 2023.
133. PISTOLLATO, Francesca *et al.* Intratumoral hypoxic gradient drives stem cells distribution and MGMT expression in glioblastoma. **Stem Cells**, [s. l.], v. 28, n. 5, p. 851–862, 2010.
134. POGODA, Katarzyna *et al.* Inhomogeneity of stiffness and density of the extracellular matrix within the leukoplakia of human oral mucosa as potential physicochemical factors leading to carcinogenesis. **Translational Oncology**, [s. l.], v. 14, n. 7, 2021.

135. POINCIUX, Renaud; LIZÁRRAGA, Floria; CHAVRIER, Philippe. Matrix invasion by tumour cells: A focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia. **Journal of Cell Science**, [s. l.], v. 122, n. 17, p. 3015–3024, 2009.
136. PROVENZANO, Paolo P. *et al.* Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. **BMC Medicine**, [s. l.], v. 6, 2008.
137. PSAILA, Bethan; LYDEN, David. The metastatic niche: adapting the foreign soil. **Nature Reviews**, [s. l.], v. 9, p. 285–293, 2009.
138. QIAN, Bin Zhi *et al.* CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. **Nature**, [s. l.], v. 475, n. 7355, p. 222–225, 2011.
139. QIN, Nan *et al.* Intratumoral heterogeneity of MYC drives medulloblastoma metastasis and angiogenesis. **Neuro-oncology**, [s. l.], v. 24, n. 9, p. 1509–1523, 2022.
140. REN, Bo *et al.* High-resolution Hi-C maps highlight multiscale 3D epigenome reprogramming during pancreatic cancer metastasis. **Journal of Hematology and Oncology**, [s. l.], v. 14, n. 1, 2021.
141. RIDLEY, Anne J. *et al.* Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. **Science**, [s. l.], v. 302, n. 5651, p. 1704–1709, 2003.
142. ROGENHOFER, Sebastian *et al.* Histone Methylation Defines an Epigenetic Entity in Penile Squamous Cell Carcinoma. **Journal of Urology**, [s. l.], v. 189, n. 3, p. 1117–1122, 2013.
143. SANTI, Alice; KUGERATSKI, Fernanda G.; ZANIVAN, Sara. **Cancer Associated Fibroblasts: The Architects of Stroma Remodeling**. [S. l.]: Wiley-VCH Verlag, 2018.
144. SCHWARZBAUER, Jean E.; DESIMONE, Douglas W. **Fibronectins, their fibrillogenesis, and in vivo functions**. [S. l.]: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2011.
145. SENGUPTA, Shuvasree; PARENT, Carole A.; BEAR, James E. **The principles of directed cell migration**. [S. l.]: Nature Research, 2021.
146. STORR, Sarah J. *et al.* **The calpain system and cancer**. [S. l.: s. n.], 2011.
147. STOWERS, Ryan S. *et al.* Matrix stiffness induces a tumorigenic phenotype in mammary epithelium through changes in chromatin accessibility. **Nature Biomedical Engineering**, [s. l.], v. 3, n. 12, p. 1009–1019, 2019a.
148. STOWERS, Ryan S. *et al.* Matrix stiffness induces a tumorigenic phenotype in mammary epithelium through changes in chromatin accessibility. **Nature Biomedical Engineering**, [s. l.], v. 3, n. 12, p. 1009–1019, 2019b.
149. STUELTEN, Christina H.; PARENT, Carole A.; MONTELL, Denise J. **Cell motility in cancer invasion and metastasis: Insights from simple model organisms**. [S. l.]: Nature Publishing Group, 2018.
150. SUHAIL, Yasir *et al.* **Systems Biology of Cancer Metastasis**. [S. l.]: Cell Press, 2019.
151. SUN, Yu *et al.* **Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis**. [S. l.]: Taylor and Francis Ltd, 2015.
152. SUN, Yu; GODERIE, Susan K.; TEMPLE, Sally. Asymmetric distribution of EGFR receptor during mitosis generates diverse CNS progenitor cells. **Neuron**, [s. l.], v. 45, n. 6, p. 873–886, 2005a.

153. SUN, Yu; GODERIE, Susan K.; TEMPLE, Sally. Asymmetric distribution of EGFR receptor during mitosis generates diverse CNS progenitor cells. **Neuron**, [s. l.], v. 45, n. 6, p. 873–886, 2005b.
154. SUNG, Hyuna *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**, [s. l.], v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.
155. SZNURKOWSKA, Magdalena K.; ACETO, Nicola. **The gate to metastasis: key players in cancer cell intravasation**. [S. l.]: John Wiley and Sons Inc, 2022.
156. TAKEMOTO, Ryuhei *et al.* Lysyl oxidase expression is regulated by the H3K27 demethylase Jmjd3 in tumorrassociated M2like macrophages. **J. Clin. Biochem. Nutr**, [s. l.], v. 66, n. 2, p. 110–115, 2020.
157. TAKEUCHI, Takashi; GONDA, Tatsuo. **Distribution of the Pores of Epithelial Basement Membrane in the Rat Small Intestine**. **J. Vet. Med. Sci.** [S. l.: s. n.], 2004.
158. TAN, Wei *et al.* Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancermetastasis through RANKL-RANK signalling. **Nature**, [s. l.], v. 470, n. 7335, p. 548–553, 2011.
159. TE BOEKHORST, Veronika; PREZIOSI, Luigi; FRIEDL, Peter. **Plasticity of Cell Migration in Vivo and in Silico**. [S. l.]: Annual Reviews Inc., 2016.
160. THIERY, Jean Paul *et al.* **Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease**. [S. l.: s. n.], 2009.
161. ULLO, Maria F.; LOGUE, Jeremy S. Adf and cofilin-1 collaborate to promote cortical actin flow and the leader bleb-based migration of confined cells. **eLife**, [s. l.], v. 10, 2021.
162. VALASTYAN, Scott; WEINBERG, Robert A. **Tumor metastasis: Molecular insights and evolving paradigms**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2011.
163. VAN HELVERT, Sjoerd; STORM, Cornelis; FRIEDL, Peter. Mechanoreciprocity in cell migration. **Nature Cell Biology**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 8–20, 2018.
164. VESSONI, Alexandre Teixeira *et al.* **Tumor propagating cells: drivers of tumor plasticity, heterogeneity, and recurrence**. [S. l.]: Springer Nature, 2020.
165. VICENTE-MANZANARES, Miguel; HORWITZ, Alan Rick. Cell Migration: An Overview. *Em: METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY*. [S. l.]: Humana Press Inc., 2011. v. 769, p. 1–24.
166. VICENTE-MANZANARES, Miguel; WEBB, Donna J.; HORWITZ, A. Rick. Cell migration at a glance. **Journal of Cell Science**, [s. l.], v. 118, n. 21, p. 4917–4919, 2005.
167. VITALE, Ilio *et al.* **Intratumoral heterogeneity in cancer progression and response to immunotherapy**. [S. l.]: Nature Research, 2021.
168. VOLLMANN-ZWERENZ, Arabel *et al.* **Tumor cell invasion in glioblastoma**. [S. l.]: MDPI AG, 2020.
169. WALKER, Cameron; MOJARES, Elijah; DEL RÍO HERNÁNDEZ, Armando. **Role of extracellular matrix in development and cancer progression**. [S. l.]: MDPI AG, 2018.

170. WAN, Guoqing *et al.* SLFN5 suppresses cancer cell migration and invasion by inhibiting MT1-MMP expression via AKT/GSK-3 β / β -catenin pathway. **Cellular Signalling**, [s. l.], v. 59, p. 1–12, 2019.
171. WARNER, Harry; WILSON, Beverley J.; CASWELL, Patrick T. **Control of adhesion and protrusion in cell migration by Rho GTPases**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2019.
172. WEBBER, Liana P *et al.* Hypoacetylation of acetyl-histone H3 (H3K9ac) as marker of poor prognosis in oral cancer. **Histopathology**, [s. l.], v. 71, n. 2, p. 278–286, 2017.
173. WEI, Bo *et al.* Human colorectal cancer progression correlates with LOX-induced ECM stiffening. **International Journal of Biological Sciences**, [s. l.], v. 13, n. 11, p. 1450–1457, 2017.
174. WEI, Spencer C. *et al.* Matrix stiffness drives epithelial-mesenchymal transition and tumour metastasis through a TWIST1-G3BP2 mechanotransduction pathway. **Nature Cell Biology**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 678–688, 2015.
175. WEIDEMÜLLER, Paula *et al.* **Transcription factors: Bridge between cell signaling and gene regulation**. [S. l.]: John Wiley and Sons Inc, 2021.
176. WEISSE, Jonas *et al.* Identification of lymphocyte cell-specific protein-tyrosine kinase (LCK) as a driver for invasion and migration of oral cancer by tumor heterogeneity exploitation. **Molecular Cancer**, [s. l.], v. 20, n. 1, 2021.
177. WEN, Yanhua *et al.* Cell subpopulation deconvolution reveals breast cancer heterogeneity based on DNA methylation signature. **Briefings in Bioinformatics**, [s. l.], p. bbw028, 2016.
178. WENGER, Anna *et al.* Intratumor DNA methylation heterogeneity in glioblastoma: implications for DNA methylation-based classification. **Neuro-Oncology**, [s. l.], v. 21, n. 5, p. 616–627, 2019.
179. WINSLOW, Monte M. *et al.* Suppression of lung adenocarcinoma progression by Nkx2-1. **Nature**, [s. l.], v. 473, n. 7345, p. 101–104, 2011.
180. XU, Jiasheng *et al.* **Using single-cell sequencing technology to detect circulating tumor cells in solid tumors**. [S. l.]: BioMed Central Ltd, 2021.
181. YAMADA, Kenneth M.; SIXT, Michael. Mechanisms of 3D cell migration. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 20, n. 12, p. 738–752, 2019.
182. YAMAGUCHI, Hideki; WYCKOFF, Jeffrey; CONDEELIS, John. **Cell migration in tumors**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2005.
183. YAMAMOTO, Shoji *et al.* JARID1B is a luminal lineage-driving oncogene in breast cancer. **Cancer Cell**, [s. l.], v. 25, n. 6, p. 762–777, 2014.
184. YANG, Jing *et al.* **Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition**. [S. l.]: Nature Research, 2020.
185. YANG, Li; PANG, Yanli; MOSES, Harold L. **TGF- β and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression**. [S. l.: s. n.], 2010.
186. YASUDA, Tadahito *et al.* Inflammation-driven senescence-associated secretory phenotype in cancer-associated fibroblasts enhances peritoneal dissemination. **Cell Reports**, [s. l.], v. 34, n. 8, 2021.

187. YEUNG, Kay T.; YANG, Jing. **Epithelial–mesenchymal transition in tumor metastasis**. [S. l.]: John Wiley and Sons Ltd, 2017.
188. YU, Min *et al.* RNA sequencing of pancreatic circulating tumour cells implicates WNT signalling in metastasis. **Nature**, [s. l.], v. 487, n. 7408, p. 510–513, 2012.
189. YURCHENCO, Peter D; RUBEN, George C. **Basement Membrane Structure In Situ: Evidence for Lateral Associations in the Type IV Collagen Network****The Journal of Cell Biology**. [S. l.: s. n.], 1987. Disponível em: <http://rupress.org/jcb/article-pdf/105/6/2559/1055787/2559.pdf>. .
190. ZHA, Lin *et al.* Epigenetic regulation of E-cadherin expression by the histone demethylase UTX in colon cancer cells. **Medical Oncology**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 21, 2016.
191. ZHANG, Yingnan *et al.* Zeb1 facilitates corneal epithelial wound healing by maintaining corneal epithelial cell viability and mobility. **Communications biology**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 434, 2023.

CURRÍCULO VITAE RESUMIDO

TAMBORINDEGUY, M. T.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Maurício Tavares Tamborindeguy

Local e data de nascimento: Santana do Livramento, Rio Grande do Sul, Brasil, 15 de agosto de 1993.

Endereço profissional: Instituto de Biociências - Dep. Biofísica - Prédio 43431 - Sala 115, Avenida Bento Gonçalves, 9500 - Bloco IV, Bairro Agronomia, Porto Alegre, 91501-970, Brasil

Telefone: +55 51 997874178

E-mail: mauriciotamborindeguy@gmail.com

Currículo lattes: <http://lattes.cnpq.br/3227420672873690>

2. FORMAÇÃO

Bacharel em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas (2012-2015).

Mestre em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2016-2018)

Doutorando em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2018-atual)

3. ESTÁGIOS

2013 – 2015: Bolsista de Iniciação Científica (CNPq e FAPERGS) no Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas do Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas. Orientado pelo Dr. Alan John Alexander McBride. Durante o período teve experiência na área de expressão de proteínas recombinantes para uso na formulação de vacinas e como alvos para diagnóstico de leptospirose humana e animal. Teve experiência em: expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*; cultivo celular bacteriano de *Leptospira interrogans*; PCR convencional; SDS-PAGE; quantificação de proteínas; experimentação animal; e testes de diagnósticos baseados em princípio de imunologia como, teste de microaglutinação, ELISA, Western blot e dot blot.

4. PRÊMIOS E DISTINÇÕES

2016: Menção Honrosa na categoria Mestrado no “XVIII Congress of the Brazilian Society for Cell Biology” da Sociedade Brasileira de Biologia Celular com o trabalho “Cell contractility modulates migratory behavior in oral squamous cell carcinoma”.

5. ARTIGOS CIENTÍFICOS COMPLETOS PUBLICADOS EM REVISTAS INTERNACIONAIS

TAVARES TAMBORINDEGUY, MAURÍCIO; LORENZATTO, PAOLA FARIAS ; LAMERS, MARCELO LAZZARON ; LENZ, GUIDO . Asymmetric mitosis contributes to different migratory performance in sister cells. EXPERIMENTAL CELL RESEARCH **JCR** , v. 430, p. 113715, 2023.

LENZ, LUANA S. ; FACCIONI, JULIANO L. ; BRACCO, PAULA A. ; SANTOS, JEPHESSON A.F. ; PEREIRA, LUIZA C. ; BUSS, JULIETI H. ; **TAMBORINDEGUY, MAURICIO T.** ; TORGO, DAPHNE ; MONTEIRO, THAYANA ; MANTOVANI, GIOVANA B. ; SANTO, CAROLINA N. ; MARCOLIN, JULIA C. ; DAL SIN, ELOISA ; VIGO, ALVARO ; CALLEGARI-JACQUES, SIDIA M. ; SILVA, ANDREW O. ; ONZI, GIOVANA R. ; BEGNINI, KARINE R. ; LENZ, GUIDO . Cancer Cell Fitness Is Dynamic. CANCER RESEARCH **JCR** , v. 81, p. 1040-1051, 2021.

TAMBORINDEGUY, MAURÍCIO TAVARES; MATTE, BIBIANA FRANZEN ; DE OLIVEIRA RAMOS, GRASIELI ; ALVES, ALESSANDRO MENNA ; BERNARDI, LISIANE ; LAMERS, MARCELO LAZZARON . NADPH-oxidase-derived ROS alters cell migration by modulating adhesions dynamics. BIOLOGY OF THE CELL **JCR** , v. 110, p. 1-12, 2018.