

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Patologia

Eduardo de Freitas Rodrigues Weber Gutseit

EFEITOS INICIAIS DA SUPEREXPRESSÃO DE SOX2 SOBRE QUERATINA-19 E

INTEGRINA $\alpha 2\beta 1$ EM CÉLULAS MCF-7:

Análise morfológica e molecular de transição fenotípica

Belo Horizonte

2025

Eduardo de Freitas Rodrigues Weber Gutseit

EFEITOS INICIAIS DA SUPEREXPRESSÃO DE SOX2 SOBRE QUERATINA-19 E

INTEGRINA $\alpha 2\beta 1$ EM CÉLULAS MCF-7:

Análise morfológica e molecular de transição fenotípica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Geral da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Helen Lima Del Puerto

Colaboradores: Prof. Dr. Johannes Eble - Instituto de Química Fisiológica e Patobioquímica (Universidade de Münster, Alemanha) e Prof. Dr. John Choy - Departamento de Biologia, (Universidade Católica da América, EUA).

Belo Horizonte

2025

043

Gutseit, Eduardo de Freitas Rodrigues Weber.

Efeitos iniciais da superexpressão de SOX2 sobre queratina-19 e integrina $\alpha 2\beta 1$ em células MCF-7: análise morfológica e molecular de transição fenotípica [manuscrito] / Eduardo de Freitas Rodrigues Weber Gutseit. – 2025. 57 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Helen Lima Del Puerto. Colaboradores: Prof. Dr. Johannes Eble e Prof. Dr. John Choy.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia.

1. Patologia. 2. Neoplasias da Mama. 3. Fatores de Transcrição SOXB2. 4. Queratina-19. 5. Integrina alfa2beta1. 6. Células MCF-7. I. Puerto, Helen Lima Del. II. Eble, Johannes. III. Choy, John. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 616



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ICB - COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG - ICB/UFMG - SECRETARIA

**ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 510 DE EDUARDO DE FREITAS
RODRIGUES WEBER GUTSEIT**

Realizou-se, no dia 29 de agosto de 2025, às 8:00 horas, no formato on-line, na Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de Dissertação, intitulada "**Efeitos Iniciais da Superexpressão de SOX2 Sobre Queratina-19 e Integrina $\alpha2\beta1$ em Células MCF-7: Análise Morfológica e Molecular de Transição Fenotípica**", apresentada por **Eduardo de Freitas Rodrigues Weber Gutseit** número de registro 2024669500, graduado no curso de Ciências Biológicas, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: **Profa. Dra. Bárbara Andrade de Carvalho**, Fundação Educacional Vale do São Francisco; **Prof. Dr. Felipe Henrique de Souza Silva**, Faculdade Santa Casa de Belo Horizonte; **Profa. Dra. Helen Lima Del Puerto** – ICB/UFMG – **ORIENTADORA**.

A Comissão considerou a Dissertação:

APROVADO

REPROVADO

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 29 de agosto de 2025.

*** De acordo com as Normas Gerais de Pós-Graduação da UFMG o grau de Mestre só será concedido ao aluno que entregar ao Colegiado do Curso, no prazo máximo de 60 dias, a versão final da Dissertação, em conformidade com as indicações da Comissão Examinadora. Após a entrega da versão final com a documentação exigida para emissão de Diploma, a secretaria emitirá Certificado de Conclusão do Mestrado.**



Documento assinado eletronicamente por **Helen Lima Del Puerto, Membro de comissão**, em 29/08/2025, às 10:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Felipe Henrique de Souza Silva, Usuário Externo**, em 29/08/2025, às 12:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bárbara Andrade de Carvalho, Usuária Externa**, em 29/08/2025, às 12:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site



https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 4465922 e o código CRC 8AD79B3D.

Referência: Processo nº 23072.249917/2025-29

SEI nº 4465922



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA - ICB/UFMG
FOLHA DE APROVAÇÃO

“Efeitos Iniciais da Superexpressão de SOX2 Sobre Queratina-19 e Integrina $\alpha 2\beta 1$ em Células MCF-7: Análise Morfológica e Molecular de Transição Fenotípica”

EDUARDO DE FREITAS RODRIGUES WEBER GUTSEIT

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de **Pós-Graduação em Patologia**, como requisito para obtenção do grau de **Mestre em PATOLOGIA**, área de concentração **PATOLOGIA INVESTIGATIVA**.

Aprovada em 29 de agosto de 2025, pela banca constituída pelos membros:

Profa. Dra. Bárbara Andrade de Carvalho, Fundação Educacional Vale do São Francisco
Prof. Dr. Felipe Henrique de Souza Silva, Faculdade Santa Casa de Belo Horizonte
Profa. Dra. Helen Lima Del Puerto – ICB/UFMG - ORIENTADORA

Belo Horizonte, 29 de agosto de 2025.



Documento assinado eletronicamente por **Helen Lima Del Puerto, Membro de comissão**, em 29/08/2025, às 10:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Felipe Henrique de Souza Silva, Usuário Externo**, em 29/08/2025, às 12:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bárbara Andrade de Carvalho, Usuária Externa**, em 29/08/2025, às 12:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4465923** e o código CRC **59DF498D**.

*Aos meus pais, ao meu irmão, às minhas avós e
aos meus amigos por tudo; pela saudade que
sinto e pela vida que vivemos*

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente aos meus pais, Kátia e Wilson, que não mediram esforços para me fornecer educação de qualidade. A eles devo o compromisso com os estudos, com o trabalho e com as pessoas à minha volta que tanto prezo. Agradeço ao meu irmão Bernardo por ser meu amigo durante toda minha vida, às minhas avós Isabel e Veleda[†] por me mostrarem ternura e experiência com a vida. Agradeço aos meus primos e tios, por estenderem o sentimento de pertencimento para além da minha casa. Aos meus amigos por serem presentes em todos os momentos, em especial à Clara, que me acompanhou durante todo meu processo de formação superior. Ao Renato, pelo suporte, evolução, carinho e amor.

Agradeço à minha orientadora de Mestrado, Dra. Helen Del Puerto, que me deu sua confiança e me permitiu andar com meus próprios pés. Por sua atuação exemplar na sala de aula e no laboratório e por me mostrar como eu quero ser no futuro. Por ser atenciosa, compreensiva e amorosa, como um professor deve ser. Helen, obrigado por me trazer para a Patologia, por acreditar nas minhas ideias e guiar minha vida de volta para a pesquisa científica. Agradeço também aos meus companheiros de laboratório, em especial à Déborah, Daiana, Laysa e ao Dr. Enio Ferreira. À Rachel, por fazer esse trabalho imunofluorescer.

Ich danke Dr. Johannes Eble herzlich für die Möglichkeit, in seine Labor zu arbeiten. Hannes, du hast mein Leben verändert, und ich trage diese Erfahrung für immer im Herzen; nicht nur beruflich, sondern auch persönlich. Es hat mir sehr gefreut, dich kennenzulernen und mit dir zu arbeiten, lernen und bilden. Ich sehe zu dir auf. Danke schön.

Agradeço às minhas orientadoras da graduação Dras. Walderez Dutra, Carolina Koh e Vanessa Pinho, por acreditarem em mim e me ensinarem a como ser cientista. A visão de cada uma me transformou, e levo todas vocês comigo em cada novo caminho que trilhar. Agradeço às professoras Luiza Coutinho e Ruana Brito, que me ensinaram sobre Freire e me inspiraram a ser docente.

Finalmente, agradeço à CAPES/CNPQ/FAPEMIG pelo suporte financeiro, a mim e ao laboratório do Comportamento Celular, à Universidade Federal de Minas Gerais pelo suporte estrutural, acadêmico e intelectual e à Universidade de Münster pela exímia colaboração.

"Mestre não é quem sempre ensina, mas quem de repente aprende."
(João Guimarães Rosa)

RESUMO

O câncer de mama é uma doença heterogênea, altamente incidente e fatal, cuja principal causa de morte é a metástase. Apesar de eficiente quando conduzido em estágios iniciais, o tratamento contra o câncer de mama nem sempre é eficaz, observando-se muitos casos de recidiva ou mesmo resistência à quimioterapia. Um motivo para isso é a heterogeneidade da doença, que dificulta uma terapia universal, e faz necessário um maior entendimento do comportamento das lesões. O câncer de mama se distingue em quatro principais subtipos, com diferentes níveis de agressividade; sendo os subtipos luminais A e B menos agressivos e os tipos HER2+ e triplo-negativo os mais agressivos. Frente a isso, estudar mecanismos de promoção e progressão do câncer de mama pode fornecer *insights* para a compreensão de mudanças genéticas e morfológicas que a célula tumoral enfrenta para se tornar tão heterogênea no processo de oncogênese *in vivo*. Assim, esse trabalho buscou compreender o envolvimento do fator de transcrição SOX2, regulador de vias de sinalização de pluripotência, diferenciação e apoptose em um modelo de superexpressão dessa proteína em linhagem imortalizada de células MCF-7, modelo de estudo do subtipo luminal A *in vitro*. Análise de imagens de microscopia confocal demonstram que a superexpressão de SOX2 induziu mudanças morfológicas, como razão de aspecto, circularidade e arredondamento. Essas células, que tradicionalmente têm fenótipo epitelial, passaram a ter morfologia fusiforme, apresentando perda de diferenciação e contato célula-célula, acompanhada de diminuição nos níveis de citoqueratina 19 e F-actina, proteínas do citoesqueleto, que foram mensuradas por citometria de fluxo e microscopia confocal. Além disso, observou-se aumento nos níveis de integrina $\beta 1$. Essas mudanças não são sincronizadas, de forma que ocorre um aumento de integrina $\beta 1$ anterior à perda de citoqueratina 19 e F-actina, levando a especular que a célula MCF-7 superexpressando SOX2 torna-se dedicada em aderir-se e formar protusões a fim de se movimentar, para então iniciar um processo de mudanças no citoesqueleto que fornecerá maleabilidade e plasticidade para que trafegue pela matriz extracelular. Esse trabalho conclui que a superexpressão de SOX2 causa mudanças morfológicas e moleculares compatíveis com menor diferenciação celular, o que pode servir de base para novos estudos direcionados às vias oncogênese ativadas pela superexpressão de SOX2 em células MCF-7.

Palavras-chave: câncer de mama; SOX2; queratina-19; integrina $\alpha 2\beta 1$; MCF-7; transição fenotípica.

ABSTRACT

Breast cancer is a heterogeneous disease, highly incident and lethal worldwide. The main cause for death related to mammary neoplasia is the progression of the lesion, which leads to metastasis. Although being efficient when conducted in early stages, the treatment against breast cancer is not always successful, as many cases of re-incidence and resistance against chemotherapy are registered. One of the reasons for this is the plurality of cases between patients, and the difficulty on finding a universal therapy. There are four main molecular subtypes of breast cancer, which are differently aggressive between each other; the subtypes luminal A and B, the least aggressive; the HER2+ subtype; and the triple negative, the most aggressive. In light of this, investigating initial mechanisms of breast cancer formation might reveal insights to the comprehension of genetical and morphological changes faced by tumoral cells in the oncogenic process *in vivo*. In this sense, this work aimed to comprehend the functioning of the transcription factor SOX2, a regulator of pluripotency, differentiation, apoptosis and pro-tumoral signaling pathways in a model of transfection and overexpression of SOX2 in MCF-7 cell line, which is a model of study for the luminal A molecular subtype. It was observed that early molecular and morphological changes occurred in a time span of 24h. These cells, that traditionally present epithelial phenotype underwent changes towards a fusiform morphology, presenting loss of differentiation and decrease on cytokeratin 19 and F-actin levels, cytoskeletal proteins. Besides this, the well-studied promoter of metastasis and integrin $\beta 1$ presented higher levels in cells overexpressing SOX2. However, these molecular changes are not evenly paced, as integrins levels increases before the decrease of cytokeratin and actin. This leads to the suggestion that SOX2-overexpressing MCF-7 cells commit earlier to adhesion and protrusion formation, in order to acquire mobility, to then initiate the process of cytoskeletal changes that will lead to increased plasticity and malleability, necessary for matrix traffic. This work concludes that overexpression of SOX2 reduces keratin 19 and F-actin levels, anteceded by increase on integrin $\beta 1$ levels, changes that are compatible with characteristics of increased aggressiveness and lesser differentiation, which could serve as platform for new studies directed to oncogenesis of MCF-7 cells.

Keywords: breast cancer; SOX2; keratin-19; integrin $\alpha 2\beta 1$; MCF-7; phenotypic transition.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Letalidade e frequência dos quatro subtipos moleculares do Câncer de Mama.....	15
Figura 2: Morfologia e padrão de adesão e proliferação de células MCF-7	16
Figura 3: Atuação de SOX2 em vias celulares pró tumorais	19
Figura 4: Representação da divisão espacial de proteínas do citoesqueleto e suas interações com proteínas de adesão	21
Figura 5: Os principais tipos de junções celulares.....	24
Figura 6: A integrina $\alpha 2\beta 1$ e sua ativação dependem de espécies reativas de oxigênio.....	25
Figura 7 Vetor pHTC HaloTag® CMV-neo-Vector.....	28
Figura 8: Expressão de SOX2 e a viabilidade celular pós transfecção.....	33
Figura 9: Morfologia de células MCF-7 após superexpressão de SOX2.....	35
Figura 10: Diminuição de CK19 em MCF-7.....	35
Figura 11: Envolvimento dos filamentos de F-actina.....	36
Figura 12: Efeito da superexpressão de SOX2 sobre moléculas de adesão.....	38
Figura 13: Influência da superexpressão de SOX2 sob a expressão de Integrinas $\alpha 2$, $\beta 1$ e N-caderina e E-caderina	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Quantidade de células plaqueadas.....	26
Tabela 2: Anticorpos utilizados.....	28
Tabela 3: Descrição dos parâmetros morfológicos avaliados	30
Tabela 4: Primers para genes-alvo humanos.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CM – Câncer de Mama

CK – Queratina/citoqueratina

DMEM – *Dulbecco's Minimal Essential Medium*

INCA – Instituto Nacional de Câncer

iPSC – *Induced Pluripotent Stem Cells* (Células-tronco pluripotentes induzidas)

ITG α 2 – Integrina alfa 2

ITG β 1 – Integrina beta 1

CK19 – Queratina 19

MFI – *Mean Fluorescence Intensity* (Média da Intensidade da Fluorescência)

ng – Nanogramas

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – Phosphate Buffered Saline (Tampão fosfato)

RT-qPCR – *Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction* (Reação da Cadeia da Polimerase Quantitativa por Transcriptase Reversa)

SOX2 – *SRY-box 2*

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

μ L – Microlitros

SUMÁRIO

1. Introdução.....	11
2. Revisão de literatura.....	12
2.1. Câncer de mama.....	12
2.2. Subtipos do câncer de mama e modelos de estudo <i>in vitro</i>	14
2.3. Fator de transcrição SOX2, família SOX e reprogramação celular.....	17
2.4. Citoesqueleto e a citoqueratina 19.....	19
2.5. Integrina $\alpha 2\beta 1$ e coesão e adesão celular.....	22
3. Objetivos.....	26
3.1. Objetivo geral.....	26
3.2. Objetivos específicos.....	26
4. Materiais e métodos.....	26
4.1. Cultura de células MCF-7 e plaqueamento.....	26
4.2. Transfecção de SOX2.....	27
4.3. Anticorpos e reagentes.....	27
4.4. Citometria de Fluxo.....	29
4.5. Microscopia de Imunofluorescência.....	30
4.6. Quantificação de Espécies Reativas de Oxigênio.....	30
4.7. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR).....	30
4.8. Análise estatística.....	31
5. Resultados.....	32
5.1. Transfecção e superexpressão de SOX2.....	32
5.2. Superexpressão de SOX2 promove mudanças morfológicas em MCF-7.....	34
5.3. Superexpressão de SOX2 e alterações em proteínas do citoesqueleto.....	37
5.4. Influência de SOX2 sobre moléculas de adesão.....	39
6. Discussão.....	40
7. Conclusão.....	43
8. Referências.....	44

1. Introdução

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais prevalente entre as mulheres em todo o mundo e representa uma das principais causas de mortalidade feminina. Apesar dos avanços nos métodos de diagnóstico e terapias, a doença permanece como um desafio clínico e científico, devido à sua acentuada heterogeneidade morfológica e molecular. Essa diversidade resulta em distintos perfis de agressividade, prognóstico e resposta ao tratamento, demandando estratégias cada vez mais personalizadas. De forma geral, os tumores mamários originam-se de células epiteliais localizadas nos ductos lactíferos ou lóbulos mamários, que sofrem alterações genéticas e epigenéticas capazes de promover desregulação do ciclo celular, perda de diferenciação e aquisição de propriedades invasivas.

São diferenciados 4 subtipos moleculares de câncer de mama, com base na expressão de receptores hormonais (estrogênio e progesterona) e do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2), além de marcadores proliferativos como Ki-67. Entre esses subtipos, o luminal A caracteriza-se por baixo índice proliferativo, alta expressão de receptores hormonais e melhor prognóstico. Além disso, é o subtipo de menor letalidade, maior chance de resposta à terapia e maior incidência em relação aos outros três subtipos, Luminal B, HER2+ e triplo negativo. A linhagem celular MCF-7 é um modelo experimental amplamente utilizado para estudos *in vitro* do subtipo luminal A. Essa linhagem mantém características epiteliais bem definidas, como forte adesão célula-célula, morfologia cuboidal e arranjo funcional de proteínas estruturais e coesivas, como queratinas, caderinas, actina e integrinas, que participam da manutenção da arquitetura epitelial, trazendo uma semelhança muito grande entre as células MCF-7 e o tecido neoplásico mamário tipo Luminal A. As MCF-7 foram escolhidas neste trabalho pois fornecem excelente plataforma de estudo para neoplasias mais bem diferenciadas e de comportamento menos agressivo, podendo facilitar a observação de efeitos de transformação fenotípica.

Mesmo tumores classificados como de baixo grau de agressividade podem sofrer alterações fenotípicas que aumentam seu potencial invasivo e de resistência terapêutica. Processos de plasticidade celular, como a transição epitélio-mesenquimal ou a aquisição de características de células indiferenciadas têm sido apontados como fatores determinantes na progressão tumoral. Entre os reguladores moleculares envolvidos, destaca-se SOX2, um fator de transcrição fundamental para a manutenção da pluripotência e auto renovação em células-

tronco normais e malignas. No contexto do câncer de mama, a expressão aberrante de SOX2 têm sido associada à piora prognóstica, resistência a drogas e aumento da capacidade metastática, embora seus efeitos variem de acordo com o subtipo tumoral e o microambiente celular.

Marcadores estruturais constituem indicadores relevantes para o estudo da identidade fenotípica e da interação celular com o estroma tumoral. Nesse trabalho, avaliou-se como alterações na expressão de queratina-19 (CK19), importante para a manutenção do formato cuboidal de células epiteliais, F-actina, principal proteína relacionada à movimentação celular e a integrina $\alpha 2\beta 1$, importante mediadora da adesão célula–matriz, podem refletir mudanças na coesão celular, na organização do citoesqueleto e na capacidade de migração e invasão. Assim, compreender como SOX2 modula esses elementos em modelos de câncer de mama pouco agressivos, como as células MCF-7, pode revelar mecanismos iniciais de plasticidade tumoral ainda pouco explorados.

Diante desse cenário, o presente trabalho teve como objetivo investigar os efeitos iniciais da superexpressão de SOX2 sobre a morfologia e a expressão de queratina 19, F-actina e integrina $\alpha 2\beta 1$ em células MCF-7. Ao integrar análises morfológicas e moleculares, buscou-se gerar evidências que contribuam para o entendimento de vias envolvidas na transição fenotípica e na remodelação das interações célula–célula e célula–matriz, abrindo perspectivas para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas direcionadas ao controle da progressão do câncer de mama. Os principais achados do trabalho mostram diminuição nos níveis de citoqueratina-19 após 24h de superexpressão de SOX2, bem como de F-actina 12h e 24h após. Em contrapartida observou-se aumento nos níveis de integrina $\beta 1$ logo 0h e 12h após a transfecção, acompanhado de mudanças morfológicas em todos os tempos de cinética avaliados. Esses resultados, em conjunto, demonstram um mecanismo de ação inicial do fator de transcrição SOX2 em células MCF-7.

2. Revisão de literatura

2.1. Câncer de mama

Neoplasia é o termo utilizado em patologia utilizado para descrever uma proliferação anormal de células que perderam os mecanismos fisiológicos de controle do ciclo celular, apresentando desregulação mitótica e, frequentemente, perda da diferenciação (FILHO, 2000; KUMAR et al., 2021). As neoplasias benignas caracterizam-se, em geral, por crescimento mais

lento, baixo índice mitótico, manutenção parcial da diferenciação celular e delimitação tecidual nítida, muitas vezes encapsulada. Já as neoplasias malignas apresentam crescimento mais rápido, elevado índice mitótico, acentuada anaplasia, invasão tecidual local, e capacidade de metastatizar. Esses tumores costumam estar associados a neoangiogênese, áreas de necrose e hemorragia, além de infiltrado inflamatório associado (FILHO, 2000; KUMAR *et al.*, HANAHAN, 2022).

Na neoplasia mamária, um dos sinais clínicos mais comuns é a presença de nódulos palpáveis durante o exame físico, advindos do crescimento desordenado de células epiteliais dessa glândula. Quando diagnosticado precocemente, as chances de cura por meio de remoção cirúrgica associada à quimio e/ou radioterapia são elevadas, reforçando a importância da detecção precoce por exames clínicos e mamografias periódicas (FERNANDES *et al.*, 2023). Entretanto, a doença pode evoluir de forma silenciosa, sem manifestações perceptíveis em estágios iniciais, de forma que a negligência dessa atenção primária pode culminar no crescimento exacerbado das células e na metástase para outros órgãos do corpo, aumentando o risco de mortalidade, resistência ao tratamento e recidiva, sendo que as neoplasias malignas da mama humana fazem parte das principais causas globais de morte relacionadas a tumores (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2024).

Segundo a Organização mundial da Saúde (OMS), o Câncer de Mama (CM) foi, em 2022, o segundo tumor mais incidente e o quarto mais mortal, causando mais de 666.100 mortes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022). No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) calculou que 28% dos novos casos de câncer entre mulheres foram neoplasias malignas mamárias, estimando 73.610 casos para o triênio de 2023 a 2025 (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER / MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022). Os fatores que determinam se uma neoplasia terá comportamento benigno ou maligno variam entre diferentes tipos de tumores e não são completamente compreendidos. No câncer de mama, fatores genéticos, hormonais e ambientais contribuem para a diversidade de casos da doença. Apenas cerca de 5% a 10% dos casos estão relacionados a mutações herdadas em genes de susceptibilidade, como BRCA1 e BRCA2, que codificam proteínas envolvidas no reparo de DNA, atuando como supressoras tumorais (WINTERS *et al.*, 2017), enquanto a grande maioria dos casos é esporádica e associada a fatores como idade, densidade mamária aumentada, exposição cumulativa a estrogênio, obesidade pós-menopausa, uso prolongado de terapia hormonal, nuliparidade ou gravidez tardia, sedentarismo, consumo de álcool e exposição à radiação ionizante. Essa diversidade de fatores de risco e etiológicos contribui para a heterogeneidade molecular e

clínica dos subtipos de CM, motivando pesquisas em busca a identificação de novas vias de sinalização e biomarcadores que auxiliem no diagnóstico precoce, na estratificação prognóstica e no desenvolvimento de terapias-alvo (OBEAGO et al., 2024).

2.2. Subtipos do câncer de mama e modelos de estudo *in vitro*

Os tumores mamários geralmente iniciam-se nos ductos lactíferos (carcinoma ductal) ou nos lóbulos (carcinoma lobular), onde células epiteliais glandulares sofrem processos carcinogênicos e adquirem características neoplásicas. Apesar de ter um local mais provável para se originar, o câncer de mama é uma doença morfológica e bioquimicamente heterogênea com diferentes desfechos clínicos (HOWLADER *et al.*, 2018). Classicamente, distinguem-se quatro principais subtipos moleculares de câncer de mama (**Fig. 1**), baseando-se na expressão de receptores de estrogênio, progesterona e fator de crescimento epitelial humano 2 (HER2): Luminal A, luminal B, HER2-positivo e triplo-negativo, cada um relacionado a diferentes padrões histopatológicos, prognósticos e respostas terapêuticas.

O subtipo triplo negativo é o menos frequente, porém o mais letal entre os quatro subtipos de CM. As células dessa lesão apresentam deficiência de receptores hormonais para estrogênio e progesterona, bem como para HER2, o que dificulta o tratamento. A linhagem celular frequentemente utilizada para estudar o subtipo triplo negativo, MDA-MB-231, apresenta padrão de crescimento desordenado, morfologia fusiforme e pouco se assemelha a um epitélio tradicional, possuindo características mais mesenquimais (YIN *et al.*, 2020). O subtipo HER2+, é insensível ao tratamento hormonal, na medida em que apresenta deficiência nos receptores de estrogênio e progesterona, apesar de expressar o receptor para fator de crescimento epitelial humano 2. Pode-se considerar HER2+ como um subtipo entre a forma mais agressiva e a mais branda do câncer de mama. O subtipo luminal B apresenta expressão de todos os marcadores supracitados, maior taxa de divisão celular que o luminal A, porém ainda apresenta semelhança com um epitélio mamário normal (ROULOT *et al.*, 2016).

O subtipo luminal A apresenta-se como a versão de menor gravidade do câncer de mama. Essas células mantêm grande parte de suas características originais, como o fenótipo epitelial de morfologia cuboide, com grande adesão intercelular e menor padrão invasivo. Trata-se do subtipo mais frequente e menos agressivo entre os quatro, sensível ao tratamento hormonal e geralmente curado com quimioterapia e remoção cirúrgica. Células do tipo luminal A têm os receptores para estrogênio e progesterona, e não expressam receptores HER2 (GAO; SWAIN,

2018). Um dos melhores modelos experimentais *in vitro* para o estudo desse subtipo molecular é a linhagem imortalizada de células MCF-7, advinda de um tumor humano do tipo Luminal A.

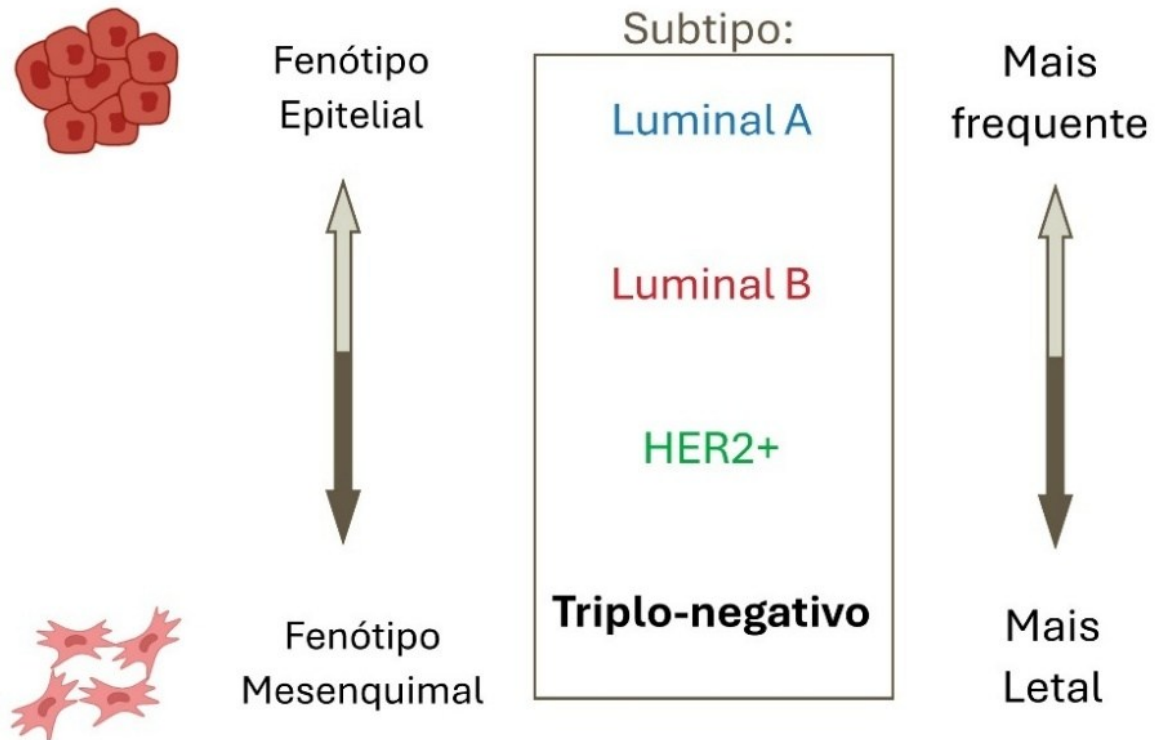


FIGURA 1: Letalidade e frequência dos quatro subtipos moleculares do Câncer de Mama. A figura organiza os subtipos moleculares do Câncer de Mama baseando-se em suas características morfológicas e epidemiológicas, retratando o subtipo Luminal A como menos agressivo e o Triplo-negativo como mais letal. FONTE: autor Eduardo Gutseit (2025), criado parcialmente utilizando recursos do site BioRender.com.

A linhagem MCF-7 consiste em células tumorais mamárias que apresentam comportamento e morfologia epitelial. Na figura 2 (**Fig. 2**) é possível observar que as células apresentam padrão de crescimento regular que forma agregados coesos, semelhantes a “ilhas” celulares, na medida em que aderem ao substrato com baixa confluência (**Fig. 2A e B**). Conforme se proliferam, observa-se que as ilhas de célula começam a se unir formando agregados ainda maiores de células (**Fig. 2C e D**) até o momento em que a confluência celular atinge seu máximo (**Fig. 2E**). Ao serem mantidas em placas de baixa adesão (**Fig. 2F**), as células MCF-7 aderem-se umas às outras, formando um esferoide tridimensional. É possível notar que as células MCF-7 têm a tendência a serem fortemente aderidas entre si, e esse padrão é justamente um dos motivos pelos quais a linhagem é modelo para estudar manutenção do fenótipo epitelial, adesão celular e proteínas estruturais como queratinas, filamentos de actina,

caderinas e integrinas, que atuam em conjunto para a manutenção da morfologia e funcionamento epitelial (VANTANGOLI et al. 2015).

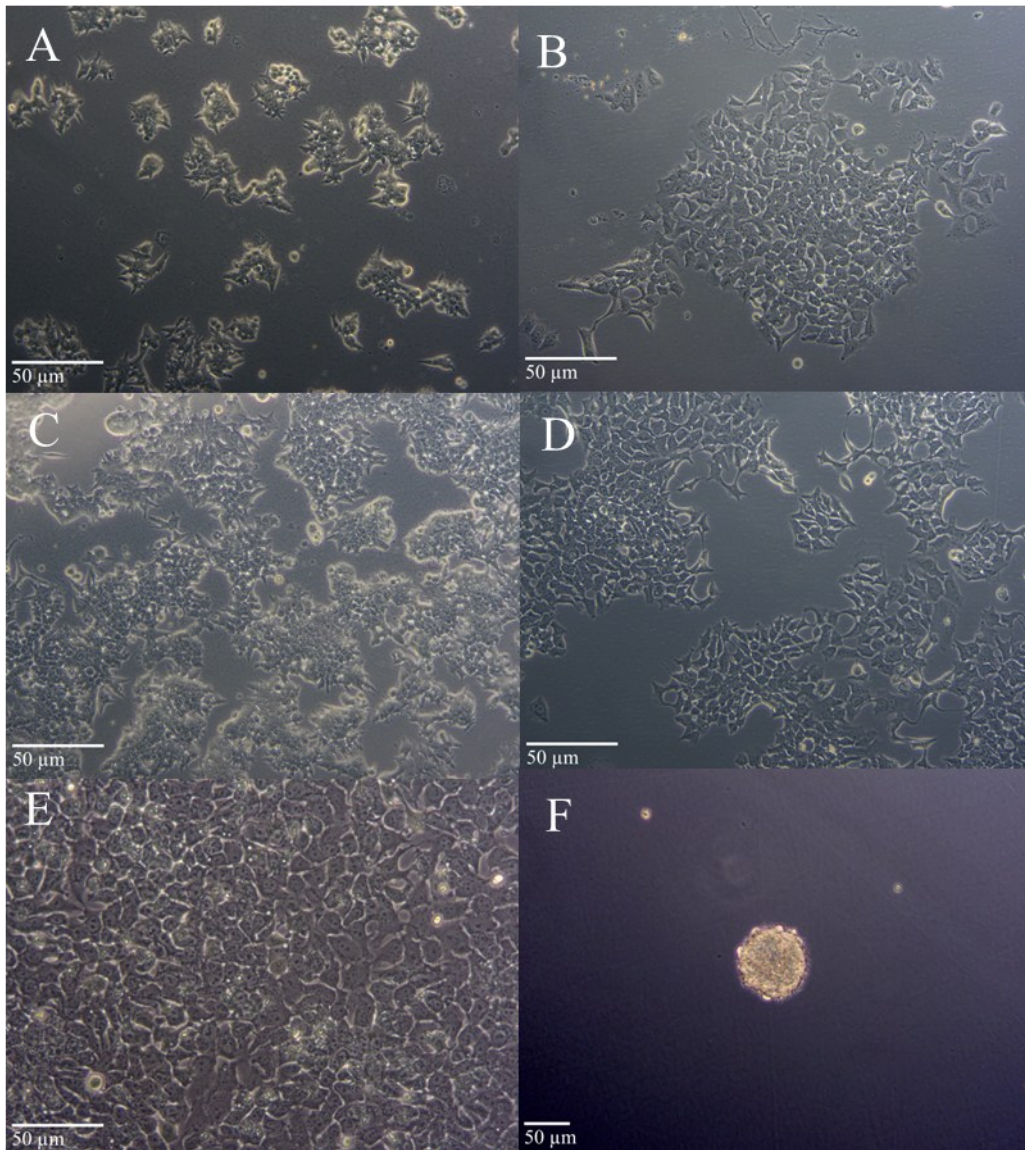


FIGURA 2: Morfologia e padrão de adesão e proliferação de células MCF-7. (A,C) Adesão das células ao colágeno tipo 1, em baixa e média confluência, respectivamente. (B, D e E) Adesão das células ao plástico em baixa, média e alta confluência respectivamente. (F) Formação esferoidal de células MCF-7 mantidas em placas de baixa adesão. Barra de escala representa 50 µm. Imagens adquiridas em microscópio ZeissVert. FONTE: Autor Eduardo Gutseit (2025).

Todavia, não são todos os tipos celulares tumorais de mama que se comportam da mesma forma que MCF-7. Outras linhagens, como a MDA-MB-231, obtidas de um tumor triplo-negativo, apresentam comportamento bem distinto por serem fracamente aderidas entre si e possuírem pouca coesão (FROEHLICH *et al.*, 2016). Ainda não se entende completamente por quais motivos as modificações celulares pré-tumorais, ou seja, de iniciação e promoção do

câncer de mama possam resultar em comportamentos tão diferentes, e quais vias celulares são desreguladas para que diferentes perfis moleculares e comportamentais sejam atingidos. Nesse sentido, estudar fatores de transcrição e vias relacionadas à diferenciação celular e formação de células-tronco do câncer torna-se importante para o entendimento dos diferentes desfechos comportamentais do câncer de mama (SWAIN *et al.*, 2020). Dessa forma, surge o interesse de estudar fatores de transcrição de importância para o surgimento das neoplasias, como o SOX2, e suas vias de atuação em uma célula tumoral pouco agressiva e mais bem diferenciada, a MCF-7. Sugere-se neste trabalho que proteína SOX2, um fator de transcrição associado à manutenção de características de células-tronco tumorais (NOVAK *et al.*, 2020), poderia influenciar a expressão de marcadores como queratina 19, F-actina e integrina $\alpha 2\beta 1$, envolvidos respectivamente na identidade epitelial e na interação célula-matriz. A análise de como a superexpressão de SOX2 modula esses componentes em células MCF-7 pode fornecer novas perspectivas sobre a dinâmica da diferenciação celular e sobre potenciais alvos para intervenção terapêutica (PIVA *et al.*, 2014).

2.3. Fator de transcrição SOX2, família SOX e reprogramação celular

A heterogeneidade de casos de CM é um complicador para o desenvolvimento de terapias universais para o tratamento da doença. Dessa forma, compreender os mecanismos iniciais pelos quais células tumorais tornam-se mais ou menos agressivas é crucial para o desenvolvimento de novas estratégias para tratar o câncer de mama. Nesse sentido, diversos fatores de transcrição têm papel importante na regulação de vias essenciais para progressão tumoral, dentre eles, o SOX2 (SHIAH *et al.*, 2023; VISHNOI *et al.*, 2020).

Os membros da família de fatores de transcrição SOX são cruciais para o desenvolvimento embrionário e sua diferenciação. O descobrimento da SRY (região determinante do sexo no cromossomo Y), que origina a família de proteínas SOX, foi um marco importante na compreensão da biologia desses fatores de transcrição no contexto da determinação sexual (BERTA *et al.*, 1990). O *HMG-box* é um domínio conservado presente em todas as proteínas da família SOX, que atua como um sítio de ligação ao DNA e pode alterar sua estrutura, podendo não apenas levar à expressão alterada de genes-alvo como também recrutar proteínas adicionais como p53, Nanog, OCT-4 e beta-catenina, necessárias para modular o comportamento celular e alterar seu estado de diferenciação (HOU; SRIVASTAVA; JAUCH, 2017; SWAIN *et al.*, 2020).

As proteínas da família SOX são divididas em nove grupos com funções e genes-alvo distintos (BOWLES; SCHEPERS; KOOPMAN, 2000). As proteínas do grupo SOXB1 (SOX1, SOX2 e SOX3) mantêm a proliferação de células-tronco e preservam características multipotentes. Em contraste, os grupos SOXB2 (SOX14 e SOX21), SOXD (SOX5, SOX6 e SOX13) e SOXE (SOX8, SOX9 e SOX10) inibem a proliferação celular, favorecendo a aquisição de identidades celulares específicas de linhagem. Já o grupo SOXC (SOX4, SOX11 e SOX12) se associa à indução da proliferação e da diferenciação terminal em diferentes tipos celulares (CHEW; GALLO, 2009; DEL PUERTO *et al.*, 2024).

A iniciação de um tumor e sua progressão dependem significativamente da expressão dos fatores de transcrição SOX2, OCT-4, c-MYC e KLF4 (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006), que são capazes de reprogramar células adultas em células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC), os chamados de fatores de Yamanaka. No contexto do câncer, essas proteínas promovem pluripotência, capacidade de auto renovação e habilidade de migração e metástase (HU *et al.*, 2023; TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006, 2016). Notavelmente, o *SRY-related HMG-box (SOX) factor 2 (SOX2)* foi demonstrado como promotor de propriedades de célula-tronco (LEIS *et al.*, 2012). Esse fator de transcrição está presente de forma abundante durante a embriogênese, e é importante para diferenciação celular, apoptose e migração (NOVAK *et al.*, 2020). Todavia, ao longo da vida de células adultas já diferenciadas, SOX2 é pouco expresso, exceto em células-tronco adultas (SCHAEFER; LENGGERKE, 2020) e em situações de neoplasia (ZHANG; XIONG; SUN, 2020), em que sua transcrição é aumentada e se correlaciona com desdiferenciação, proliferação, formação de células-tronco do câncer e metástase (NOVAK *et al.*, 2020). Nesse sentido, há consenso na literatura sobre o uso dos fatores de Yamanaka como marcadores e indutores de pluripotência, e, mais especificamente, na formação de células-tronco do câncer e células pluripotentes induzidas (AGUIRRE *et al.*, 2023).

A proteína SOX2 regula uma variedade de processos biológicos relacionados a processos oncogênicos (**Fig.3**). Sua expressão atua inibindo o ciclo celular em resposta a sinais de diferenciação para preservar a pluripotência, mas estimula a progressão do ciclo celular quando há sinais de crescimento, favorecendo sua proliferação. SOX2 pode promover efeito anti-apoptótico para promover a sobrevivência de células tumorais, e atua como gatilho para iniciar transição epitélio-mesenquimal, promovendo invasão tecidual e metástase, e confere quimioresistência às células regulando processos de autofagia (ZHANG; XIONG; SUN, 2020). De uma forma geral, SOX2 pode atuar estimulando ou inibindo vias, que podem culminar em

processos pró-tumorais, como estímulo a produção de survivina (LUO *et al.*, 2019) e fatores de transcrição ZEB1, SNAI e TWIST (LIU *et al.*, 2018). SOX2 pode também controlar ciclo celular e autofagia, regulando mTOR e ciclina D1 (WANG, S. *et al.*, 2013).

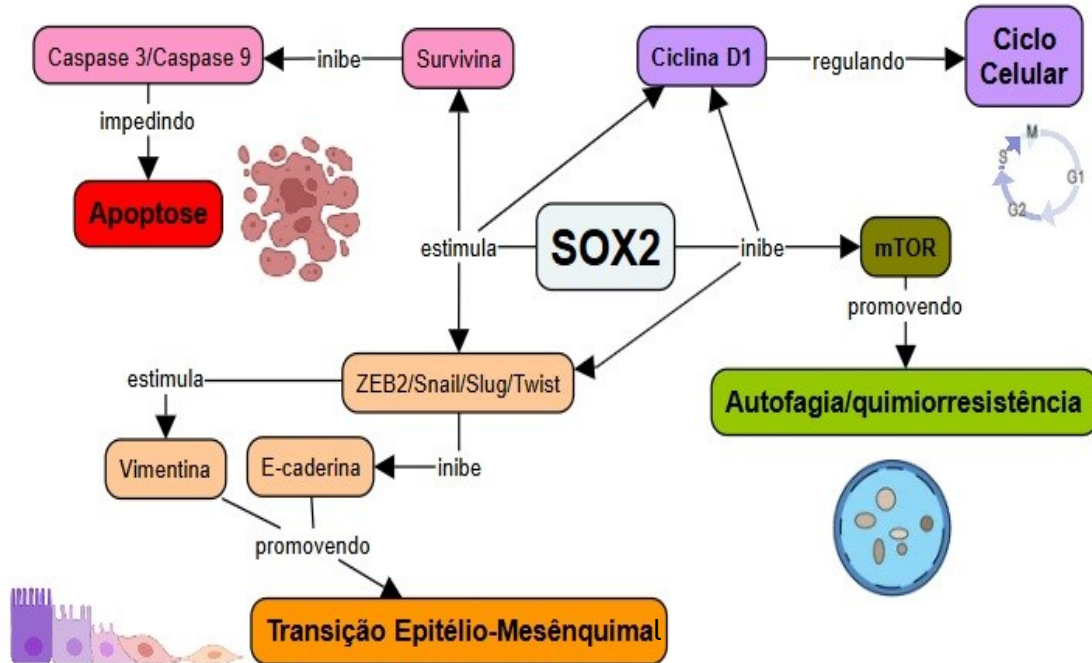


FIGURA 3: Atuação de SOX2 em vias celulares pró-tumorais. A figura exemplifica algumas vias celulares importantes para o contexto de estudo de uma célula tumoral que são influenciadas pela presença de SOX2. Setas e palavras de ligação indicam inibição ou estímulo de moléculas, e guiam o leitor para possíveis desfechos. FONTE: Autor Eduardo Gutseit (2025), criado usando parcialmente recursos do site Biorender.com.

Na medida em que SOX2 pode regular processo de transição epitélio-mesênquimal, torna-se necessário avaliar também os efeitos de sua superexpressão em proteínas do citoesqueleto e de adesão celular.

2.4. Citoesqueleto e a citoqueratina 19

O citoesqueleto é uma rede complexa de proteínas intercambiáveis e dinâmicas, responsáveis por estruturação intracelular, comunicação e sinalização, sendo plataforma para muitas reações químicas e interações moleculares (KIM; COULOMBE, 2010; POLLARD; GOLDMAN, 2018; VERWEI *et al.*, 2022). O citoesqueleto é, além disso, o componente celular responsável por garantir à célula suas habilidades mecânicas e rigidez celular. As várias proteínas que o compõem são categorizadas em três grupos: os microfilamentos de actina; os microtúbulos e os filamentos intermediários (POLLARD *et al.*, 2017; SVITKINA, 2022). Os microfilamentos de actina são polímeros formados por um monômero principal, a G-actina (Fig.4). Esse monômero é fosforilado e se liga a outro monômero de G-actina, formando um

filamento de aproximadamente 6 nanômetros (nm) de diâmetro, a F-actina. Esse polímero é o responsável pelos processos migratórios, ao compor os lamelipódios, que são prolongamentos largos, achatados e em forma de véu, responsáveis por promover o avanço da célula sobre o substrato. A formação da molécula de F-actina segue um padrão molecular de dinâmica de esteira (*treadmilling*), em que monômeros do polo inicial são desconectados para o alongamento do polo final (CARLIER; SHEKHAR, 2017; POLLARD; COOPER, 2009). Ressalta-se que microfilamentos de actina tendem a se localizar no córtex celular, perto da membrana plasmática. Por serem dinâmicos e constantemente remodelados, são importantes alvo para o estudo de células migratórias, como as tumorais (KONG; ZHONG; FANG, 2025).

Os microtúbulos também são polímeros que sofrem *treadmilling*. Formadas pelas subunidades alfa-tubulina e beta-tubulina, que são unidas por fosforilação, essas moléculas são responsáveis por realizar tráfego intracelular de vesículas e coordenar o fuso mitótico. Iniciam sua polimerização no centro organizador de microtúbulos e atingem a espessura de aproximadamente 25 nm. Todavia, não participam de processos de adesão, migração ou rigidez celular (AKHMANOVA; STEINMETZ, 2015; MARGOLIS; WILSON, 1998).

As moléculas de filamentos intermediários têm o diâmetro aproximado de 10 nm e compartilham um domínio alfa-hélice central conservado, com um N- e um C- terminal que servem como sítios de ligação para outras moléculas (CONWAY; PARRY, 1989; FUCHS; WEBER, 1994; HANUKOGLU; FUCHS, 1983; HERRMANN; AEBI, 2016; PARRY; STEINERT, 1992; WANG, Q. *et al.*, 2001). É importante ressaltar que os filamentos intermediários, em contraste com a actina e a tubulina (CARLIER; SHEKHAR, 2017; MARGOLIS; WILSON, 1998), não sofrem *treadmilling* e não são polarizados (GURDON, 1983; WANG, Q. *et al.*, 2001), sendo incapazes de promover transporte intracelular (NDIAYE; KOENDERINK; SHEMESH, 2022). Dessa forma, suas funções celulares envolvem a promoção de rigidez, resistência ao estresse, mecanotransdução de sinais, migração e adesão célula-célula e célula-matriz (HERRMANN *et al.*, 2007; NAFEEY *et al.*, 2016; NDIAYE; KOENDERINK; SHEMESH, 2022; NISHIMURA; KASAHARA; INAGAKI, 2019; ORIOLO *et al.*, 2007; SANGHVI-SHAH; WEBER, 2017). Essa característica faz o entendimento da cinética dos filamentos intermediários de muita importância no contexto de anormalidades celulares como o câncer (FOISNER, 1997; LIM *et al.*, 2021; NISHIMURA; KASAHARA; INAGAKI, 2019; SAWANT; LEUBE, 2017).

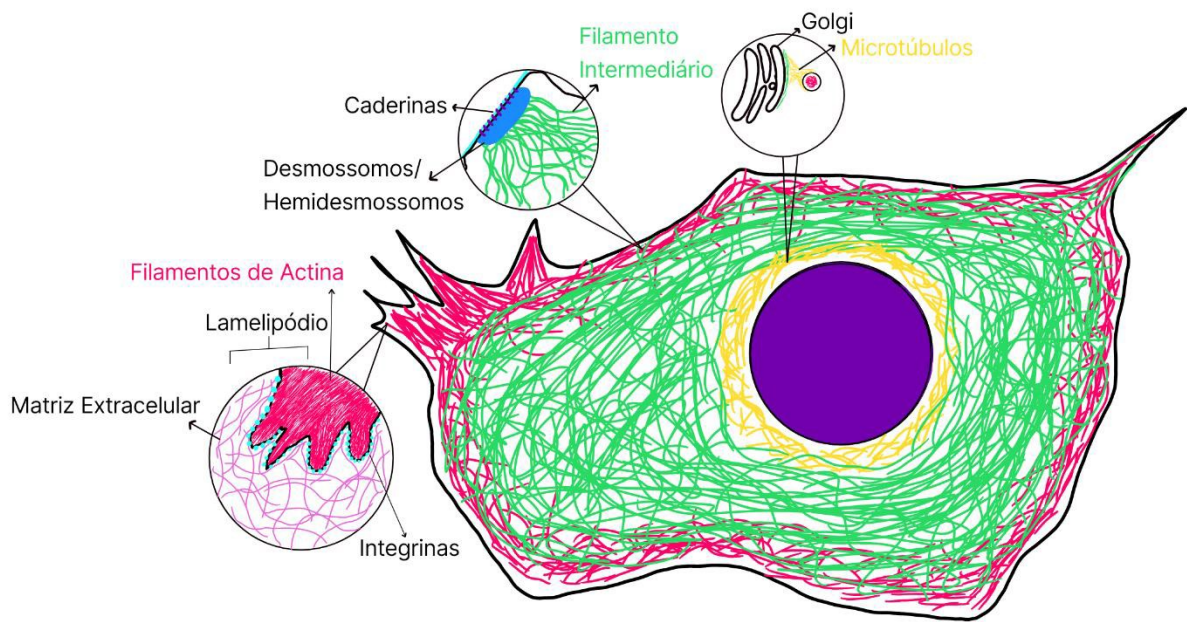


FIGURA 4: Representação da divisão espacial de proteínas do citoesqueleto e suas interações com proteínas de adesão. A figura exemplifica a localização dos grupos de proteínas estruturais, em vermelho, na periferia celular, os microfilamentos de actina, que formam lamelipódios e interagem com integrinas. Em verde, distribuído no citoplasma, os filamentos intermediários, formados principalmente por queratinas em células epiteliais, que interagem com caderinas. Em amarelo, ao redor do núcleo (roxo) os microtúbulos.

As citoqueratinas (CKs), ou apenas queratinas, compreendem o maior grupo de filamentos intermediários, e são expressas exclusivamente em epitélios (JACOB *et al.*, 2018). As CKs apresentam um papel pivotal na manutenção da morfologia original de células epiteliais, sendo um componente decisivo na prevenção de ganho de plasticidade e motilidade, que são traços característicos de células neoplásicas. Há 28 genes que codificam as queratinas ácidas do tipo I (CK9-28; CK31-40) e 26 que codificam as básicas do tipo II (CK1-CK8; CK71-CK86). A expressão dessas proteínas apresenta especificidade para determinados tecidos e tipos celulares, podendo variar conforme o estágio de diferenciação celular. Importante ressaltar que esses filamentos se associam lateralmente (HATZFELD; MAIER; FRANKE, 1987; SAUK *et al.*, 1984) para formar uma rede que se estende da membrana plasmática, onde interagem com hemidesmossomos e desmossomos para promover adesão celular, até o núcleo, onde interagem com lamininas e outras proteínas do envelope nuclear (GONIAS, 2001; YUAN *et al.*, 1997). Além disso, as CKs podem sofrer rápida fosforilação, despolimerizando suas fibras para permitir processos dinâmicos como mitose e migração (SAWANT; LEUBE, 2017). Nesse sentido, entender a dinâmica de citoqueratinas no câncer é fundamental, na medida em que células malignas apresentam descontrole mitótico e motilidade anormal, atividades com intenso envolvimento do citoesqueleto.

A queratina 19 (CK19) é a menor dos filamentos queratinosos, tendo aproximadamente 40 kDa (WU; RHEINWALD, 1981) e é estudada na biologia de tumores tanto como marcadora de célula-tronco (SAHA *et al.*, 2018) quanto por ter valor prognóstico no câncer de mama (ALIX-PANABIÈRES *et al.*, 2009; KABIR; RÖNNSTRAND; KAZI, 2014), de forma que pacientes com pior prognóstico apresentam maiores níveis de queratina 19 solúvel no soro e em células metastáticas (GIOVANELLA *et al.*, 2002; NAKATA *et al.*, 2000; SALOUSTROS; MAVROUDIS, 2010; SKONDRA *et al.*, 2014). Interessantemente, a CK19 não se associa lateralmente a nenhuma outra queratina em células epiteliais e foi demonstrada como responsável por manter a localização membranar da E-caderina em células MCF-7, estabilizando a adesão célula-célula (ALSHARIF *et al.*, 2021). Adicionalmente, foi demonstrado que a linhagem luminal A de câncer de mama MCF-7 têm a capacidade de remover ativamente a queratina 19 de seu citoesqueleto, conferindo mudança na morfologia epitelial das células (ALIX-PANABIÈRES *et al.*, 2009). A plasticidade intrínseca a essa queratina e seu valor prognóstico foram os principais motivos para sua investigação nesse trabalho, que busca compreender seu funcionamento sob a reprogramação celular induzida pela superexpressão de SOX2.

2.5. Integrina $\alpha 2\beta 1$ e coesão e adesão celular

Células epiteliais apresentam especializações de membrana que as permitem ser fortemente aderidas entre si e ao substrato *in vitro* ou à lâmina basal *in vivo*. Lateralmente, células epiteliais apresentam junções oclusivas, junções aderentes e desmossomos (**Fig. 5**). Todas as junções estão presentes no perímetro da membrana plasmática, na fronteira com outra célula vizinha, e funcionam como um sistema de travamento reversível entre elas (POLLARD *et al.*, 2017). Adesão celular é a propriedade mediada pelas moléculas de adesão e os tipos juncionais da membrana plasmática, enquanto coesão é a característica de uniformidade e união tecidual sob uma ótica mais macroscópica. Ambos os conceitos são interdependentes e relevantes para a biologia das células tumorais (HONIG; SHAPIRO, 2020; TANG, 2018).

As junções oclusivas são responsáveis por separar as regiões apical e basolateral da célula, e têm como principais proteínas a claudina e ocludina. Esse complexo proteico é transmembrana e entrelaçado por microfilamentos de actina, formando uma barreira que impede a passagem de moléculas entre as células (ZIHNI *et al.*, 2016). As junções aderentes são responsáveis por regular a tensão e morfologia da região apical da célula, e fornecem a força primária para manter as células aderidas entre si. Esse complexo proteico se conecta

intracelularmente aos microfilamentos de actina por meio das cateninas e intercelularmente por meio das caderinas (CHEN *et al.*, 2025).

Os desmossomos são a principal ferramenta celular para aderência célula-célula. No meio intracelular são ligadas às queratinas, componentes dos filamentos intermediários, que pressionam as placas de desmoplaquinias, realizando a adesão intercelular de forma mecânica. No espaço intercelular dos desmossomos, encontram-se caderinas, que colaboram para que esse complexo proteico seja o elemento de adesão mais forte das células (ZIMMER; KOWALCZYK, 2024). Os hemidesmossomos são junções semelhantes aos desmossomos, que estão na região basal da célula. De forma comparável, também necessitam da pressão de filamentos de queratina para seu funcionamento, mas envolvem integrinas para a adesão célula-substrato, que *in vivo* se traduz para a matriz extracelular e suas proteínas, como colágeno, fibronectina e lamininas. A modulação do funcionamento dos hemidesmossomos é de muita importância para processos como a diferenciação celular, migração e invasão (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012; WALKO; CASTAÑÓN; WICHE, 2015).

As integrinas são uma família de proteínas com um grande domínio extracelular e um curto domínio intracitoplasmático (CAMPBELL; HUMPHRIES, 2011). Esses domínios são responsáveis por iniciar vias de sinalização celular extensas, que conectam a matriz extracelular ao citoesqueleto. Possuem receptores sensíveis, que respondem ao dinamismo do ambiente pericelular e integram a célula ao ambiente extracelular. Em contexto tumoral, as integrinas desempenham importante papel, pois são as iniciadoras dos processos de migração e invasão, na medida em que estão presentes nos filopódios formados pela membrana plasmática de células em movimento (RIDLEY *et al.*, 2003). A integrina $\alpha 2\beta 1$ reconhece proteínas da matriz extracelular como lamininas e colágeno tipo I e IV (MADAMANCHI; SANTORO; ZUTTER, 2014; RUOSLAHTI, 1991). No contexto do câncer de mama, essa integrina se torna particularmente importante para o estudo do processo de metástase.

O principal destino das metástases de carcinomas mamários são os tecidos ósseos, de forma que estimados 70% dos casos de pacientes com câncer de mama avançado apresentem de disseminação tumoral com osteotropismo (BUIJS; VAN DER PLUIJM, 2009; COLEMAN, 2006). O motivo dessa frequente destinação aos ossos ainda é pouco elucidado, mas diversos estudos associam a teoria da “semente e solo”, proposta por Steven Paget, em que se propõe que células

metastáticas apresentem como destino um determinado nicho metastático que haveria sido previamente preparado para receber as células em migração (PAGET, 1889).

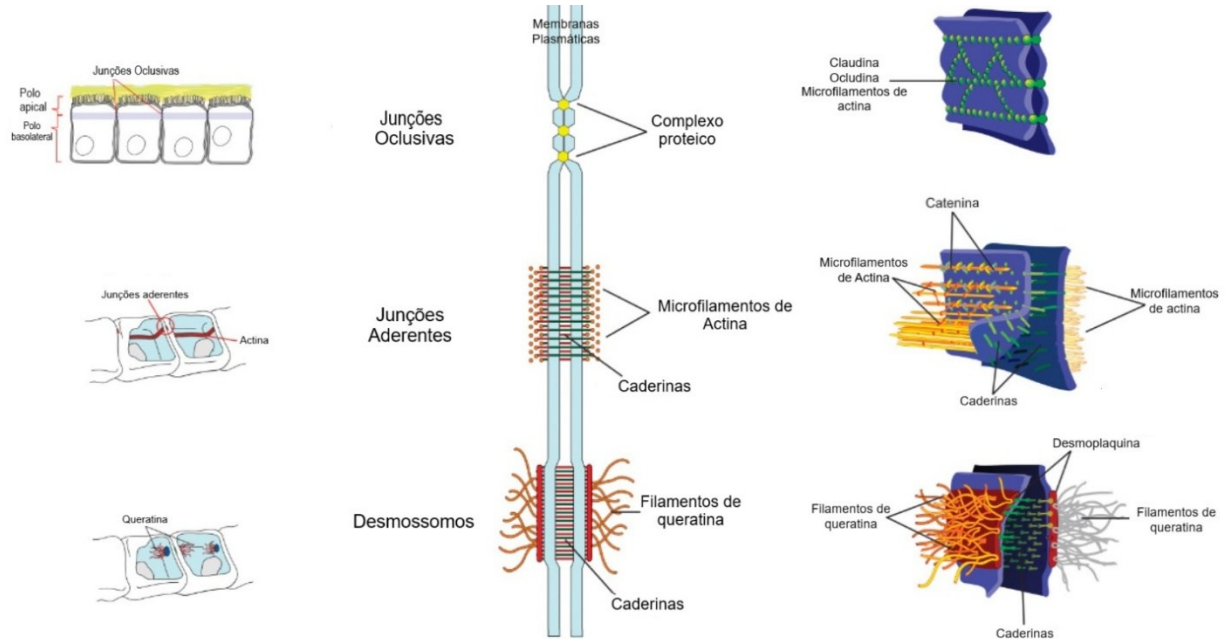


FIGURA 5: Os principais tipos de junções celulares. A figura ilustra a localização e a composição principal dos complexos proteicos adesivos que se encontram na membrana plasmática das células. As junções oclusivas, aderentes e os desmossomos são representações gráficas. FONTE: modificado de Histology Guide, Loyola University Chicago. Disponível em: <https://histologyguide.org>. Acessado em 03/08/2025.

Estudos modernos demonstram evidências para isso, associando desde a produção de exossomos (PEINADO; LAVOTSHKIN; LYDEN, 2011), comunicação de interleucinas (HAIDER *et al.*, 2021), e, interessantemente, a disponibilidade de integrinas na célula metastática (HOSHINO *et al.*, 2015). A integrina $\alpha 2\beta 1$ apresenta papel importante para a migração de células tumorais mamárias, na medida em que é um dos principais receptores do colágeno tipo I, a proteína mais predominante nos ossos (SELVARAJ *et al.*, 2024). Além disso, a expressão aumentada dessa integrina em células tumorais mamárias apresenta correlação com potencial metastático para o osso (MORITZ *et al.*, 2021) e é importante para a ancoragem inicial dessas células no tecido ósseo (LUNDSTRÖM *et al.*, 1998).

Entende-se que a ativação de integrinas depende da produção de espécies reativas de oxigênio (BERGERHAUSEN *et al.*, 2020). As integrinas, quando inativas, apresentam-se na conformação bend, do inglês “torta”, em uma situação de pouca afinidade ao substrato (GINSBERG, 2014). Quando em contato com o substrato de afinidade, que pode ser colágeno, laminina ou outras

proteínas da matriz extracelular, as espécies reativas de oxigênio, como H_2O_2 oxidam grupos tiol da estrutura corporal da integrina, mudando sua conformação (Stegmann L. *et al.*2013) para a forma ativada (**Fig. 6**).

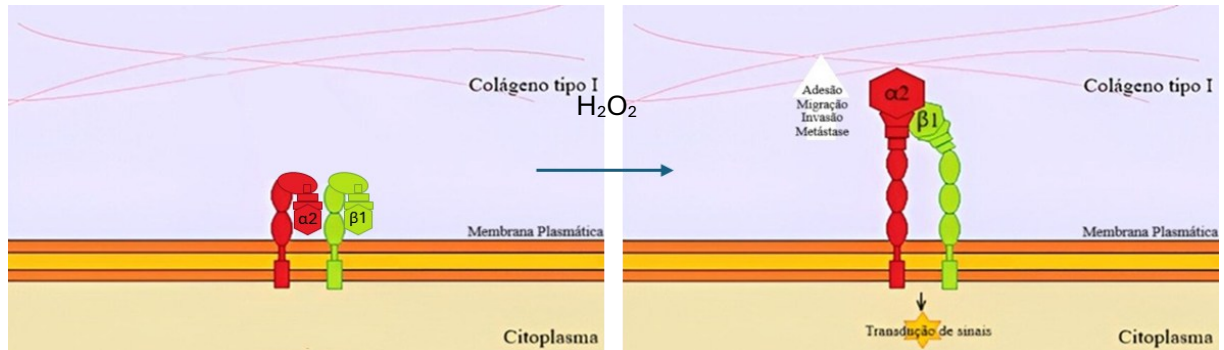


FIGURA 6: A integrina $\alpha 2\beta 1$ e sua ativação dependem de espécies reativas de oxigênio. A figura ilustra a composição do complexo proteico da integrina $\alpha 2$ em vermelho, e $\beta 1$ em verde. Observa-se que a integrina foi representada em conformação *bend* e *extended-open* que ocorre quando há ligação de alta afinidade ao ligante, como é o caso do colágeno tipo I. FONTE: Autor Eduardo Gutseit (2025).

As espécies reativas de oxigênio (ROS), como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), são moléculas altamente reativas que possuem elétrons livres, tornando-as quimicamente instáveis e propensas a reagir com biomoléculas capazes de serem oxidadas. As ROS são produzidas em reações do metabolismo celular e desempenham um papel dual, podendo em baixas concentrações, realizar sinalização celular e funções fisiológicas, e, em níveis elevados, causar estresse oxidativo e danos estruturais a lipídios, proteínas e DNA (JAKUBCZYK *et al.*, 2020). No contexto tumoral, as ROS adquirem importância devido à instabilidade metabólica dessas células neoplásicas, que têm cadeia respiratória mais produtiva, gerando mais radicais de oxigênio (CHEUNG; VOUSDEN, 2022; MOLONEY; COTTER, 2018). Interessantemente, já foi demonstrada associação entre SOX2 e espécies reativas de oxigênio, em processo de transição epitélio-mesenquimal (SHI *et al.*, 2022; VARISLI; TOLAN, 2022).

Nesse sentido, este trabalho hipotetiza que a superexpressão de SOX2 em células MCF-7 pode impactar seu perfil e comportamento epitelial, e revelar novos insights para o entendimento da formação e comportamento epitelial de uma célula tumoral mamária do tipo luminal A. Para isso, investiga-se o envolvimento de componentes citoesqueléticos, como a queratina 19 e a F-actina, e moléculas de adesão como a integrina $\alpha 2\beta 1$, a fim de entender a influência dessas proteínas na morfologia dessas células, em busca de entender um possível mecanismo inicial de ação de SOX2.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Investigar como a superexpressão de SOX2 influencia na morfologia e comportamento de células de câncer de mama luminal A (MCF-7), no tocante a expressão de proteínas do citoesqueleto e de adesão.

3.2. Objetivos específicos

- Comparar, por microscopia de imunofluorescência, a morfologia de células MCF-7 transfectadas com vetor para superexpressão de SOX2 e grupos controle.
- Avaliar, por citometria de fluxo, microscopia de imunofluorescência e RT-qPCR, a expressão de SOX2 na linhagem MCF-7 controle e com superexpressão SOX2;
- Avaliar, por citometria de fluxo e microscopia de imunofluorescência, a expressão das proteínas do citoesqueleto citoqueratina 19 e F-actina;
- Avaliar, por citometria de fluxo e microscopia de imunofluorescência, a expressão das moléculas de adesão E-caderina, N-caderina e Integrina $\alpha 2\beta 1$;
- Avaliar, por microscopia de imunofluorescência, a produção de espécies reativas de oxigênio no contexto de superexpressão de SOX2;

4. Materiais e métodos

4.1. Cultura de células MCF-7 e plaqueamento

As células MCF-7, generosamente doadas pela professora Dra. Elaine Fagundes do departamento de fisiologia do ICB/UFMG, foram cultivadas em placas de Petri de plástico de 100 mm e incubadas em atmosfera úmida a 5% CO₂ e 37°C. O meio de cultura utilizado foi o Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM, Gibco™) alto em glucose, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina e estreptomicina. Para manutenção da cultura celular, as células foram repicadas ao atingir 80-90% de confluência, utilizando solução de 0,05% de tripsina-EDTA.

Para realizar o plaqueamento experimental, as células foram desaderidas e contadas utilizando hemocítmetro. As células foram plaqueadas conforme a **tabela 1**, para que fosse alcançado confluência de 70% após 24h de incubação prévia ao prosseguimento experimental. Os experimentos foram conduzidos em triplicatas, em três eventos independentes. Para os

ensaios que envolveram a análise de integrinas, as células foram plaqueadas sobre poços cobertos com uma camada de colágeno I (10 µg/mL), que foi incubada previamente por 24h a 4°C.

Tipo de placa	Quantidade de células/poço	Área do poço	Volume final (DMEM)
8 poços (IBIDI™)	35.000	0,8 cm ²	300 µL
24 poços (SARSTEDT™)	70.000	2,0 cm ²	500 µL
12 poços (SARSTEDT™)	150.000	4,0 cm ²	1000 µL

Tabela 1: Quantidade de células plaqueadas. A tabela relaciona a quantidade de células inseridas em cada poço, dependendo do tipo de placa utilizada para o experimento, com a área de cada poço e o volume final aplicado.

4.2. Transfecção de SOX2

O vetor pHTC HaloTag™ CMV-neo-Vector (Promega) expressando SOX2 e sua versão vazia foi generosamente doado pelo Dr. Adam Underwood da Universidade de Walsh, North Canton, Ohio, USA (**Fig. 7**). Para a transfecção, o kit Lipofectamina 3000 (Invitrogen™) foi utilizado adaptando instruções do fabricante. Brevemente, 1,5 µL/poço do reagente P3000 foi incubado separadamente com 500 ng/poço de vetor (SOX2 ou vazio) por cinco minutos, enquanto 2,5 µL/poço do reagente Lipofectamina 3000 foi incubado com o volume de DMEM sem soro fetal bovino necessário para cobrir o fundo de cada poço. Após cinco minutos, os volumes contendo Lipofectamina e P3000/vetor foram combinados e incubados por mais 30 minutos antes de serem transferidos para a placa.

Os poços com 70% de confluência de células foram lavados com PBS e receberam quantidades diferentes de meio com vetor (100 µL/poço para placas de 8 poços, 200 µL/poço para 12 poços e 300 µL/poço para 24 poços). As células foram incubadas por quatro horas nessa situação, para que seja realizada a transfecção. Após esse tempo, o meio foi substituído por DMEM a 5% de soro fetal bovino e as células foram acessadas seguindo a cinética de 0h, 12h e 24h depois das quatro horas de transfecção.

4.3. Anticorpos e reagentes

Anteriormente às marcações com anticorpos primários, as células foram submetidas a um bloqueio com PBS 2% de albumina bovina sérica (BSA). Para marcações intracelulares, foi

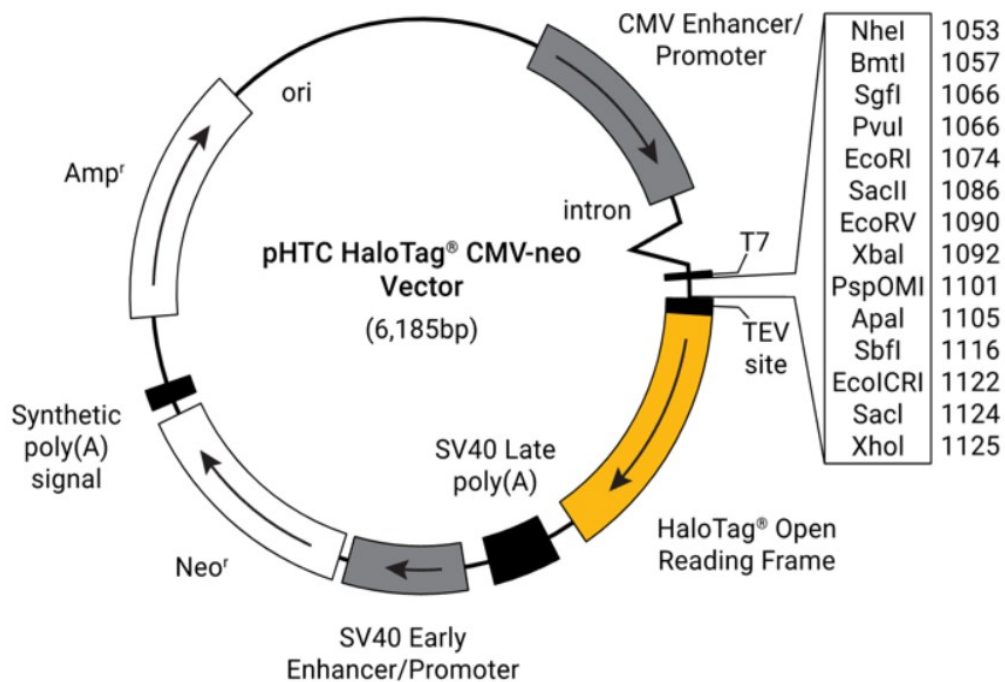


FIGURA 7. Vetor *pHTC HaloTag® CMV-neo-Vector*. Mapa do vetor utilizado para a transfecção de SOX2. O vetor fornece resistência à ampicilina e neomicina, e o gene SOX2 é inserido na região entre T7 e TEV, que são clivadas pelas enzimas de restrição supracitadas. FONTE: <https://www.promega.com/resources/protocols/product-information-sheets/g/phtc-halotag-cmv-neo-vector-protocol/>. Acessado em 03/08/2025.

utilizado PBS 2% BSA 0,5% Saponina para marcação citoplasmática ou PBS 2% BSA 0,1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich™ 102201367) para marcação nuclear. A **Tabela 2** organiza os anticorpos utilizados, espécie hospedeira, diluição, clone, fabricante e seus alvos.

Além dos anticorpos supracitados, foram utilizados os reagentes fluorescentes Hoechst 33342 (1:1000, Thermo Scientific™ 62249) ou DAPI para marcação nuclear. As células foram expostas por 20 minutos aos corantes de DNA ao abrigo da luz e lavadas três vezes com PBS, seguidas da montagem das lâminas com meio de preparo de lamínulas DAKO™ para imunofluorescência.

O kit AnnexinV/PI (BD Pharmingen™ 556547) foi utilizado para detecção de apoptose, seguindo instruções do fabricante. Brevemente, após 24h da transfecção, as células foram recolhidas e 1×10^4 células foram incubadas com 5µL dos reagentes anexina V e iodeto de propídio por 15 minutos ao abrigo da luz. As células foram levadas imediatamente ao citômetro para leitura.

4.4. Citometria de Fluxo

Após 0h, 12h e 24h da transfecção, as células foram coletadas usando tripsina, quando os alvos do experimento foram citoqueratina 19 ou SOX2, ou PBS 10mM EDTA, quando os alvos foram moléculas de adesão. As células foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos e fixadas usando 100 μ L de PBS 4% de Paraformaldeído por 15 minutos à temperatura ambiente. Após

Anticorpo/alvo	Espécie hospedeira	Diluição	Clone	Fabricante
Anti-Citoqueratina 19	Coelho	1:300	10712-1-AP	Proteintech™
Anti-SOX2	Coelho	1:200	PA1-094	Invitrogen™
Anti-E-Caderina	Camundongo	1:200	610181	BD™
Anti-N-Caderina	Coelho	1:200	ab18203	Abcam™
Anti-Integrina α 2	Camundongo	1:200	AB1936	Chemicon™
Anti-Integrina β 1	Coelho	1:200	04-1109	Milipore™
Faloidina 647	Não descrita	1:200	ab176759	Abcam™
Faloidina 568	Não descrita	1:200	A12380	Invitrogen™
Alexa Fluor Anti-camundongo 647	Burro	1:200	A31571	Invitrogen™
Alexa Fluor Anti-coelho 488	Cabra	1:200	A11034	Invitrogen™

TABELA 2: Anticorpos utilizados. A tabela organiza os anticorpos utilizados para todos os experimentos, explicitando a espécie em que foram produzidos, diluição, clone e fabricante.

a fixação, as células foram incubadas por 1h com PBS 2% BSA para marcações de superfície, PBS 2% BSA 0,5% saponina para marcação citoplasmática ou PBS 2% BSA 0,1% Triton X-100 para marcação nuclear. Depois disso, as células foram incubadas com o anticorpo primário (veja item 3.3) por 1h30. Após a incubação, as células foram lavadas três vezes e incubadas com o anticorpo secundário correspondente por 1h30. Após a incubação, as células foram lavadas novamente e armazenadas em PBS a 4°C até o momento de aquisição no citômetro BD LSRFortressa™ (Faculdade de Farmácia da UFMG) ou CyFlow (Instituto de Química Fisiológica e Patobioquímica da Universidade de Münster). As análises foram feitas utilizando o software FlowJo VX (Becton Dickson™, NJ, EUA).

No citômetro, 100.000 eventos foram lidos por replicata. Os parâmetros de *side-scatter* e *forward-scatter* foram utilizados, bem como os filtros compatíveis com as emissões dos anticorpos fluorescentes supracitados.

4.5. Microscopia de Imunofluorescência

Após a transfecção, as células foram bloqueadas, permeabilizadas e marcadas seguindo o mesmo protocolo usado para citometria de fluxo (veja item 3.4). Após a incubação do anticorpo secundário, e da faloidina quando aplicável, as células foram incubadas com Hoechst por 20 minutos ou DAPI por 30 segundos (1:1000), lavadas três vezes com a solução de bloqueio e três vezes com PBS. As lâminas foram montadas usando o meio de montagem ProLong™ Diamond Antifade (ThermoFischer) ou o Dako Fluorescence Mounting Medium (DAKO). Imagens foram adquiridas usando o microscópio BX60 (Olympus) (Instituto de Ciências Biológicas da UFMG) ou o microscópio confocal Zeiss LSM800 (Instituto de Química Fisiológica e Patobioquímica da Universidade de Münster).

As descrições das imagens foram previamente ocultadas e analisadas usando os softwares ZEN Blue (Zeiss) e Image J. Este foi utilizado para medir a média da intensidade de fluorescência das imagens, separando os canais de cor e quantificando globalmente a média da intensidade de fluorescência da imagem. Também foi utilizado o Image J para realizar as medições dos parâmetros morfológicos de circularidade, razão de aspecto e arredondamento. As células ($n = 200$) foram delimitadas manualmente em sua circunferência e analisadas com a ferramenta *measure*, cujos parâmetros usados foram *fit ellipse*, *area* e *perimeter*.

Parâmetro	Fórmula	Interpretação
Circularidade	$4\pi \times \text{Área} \div \text{Perímetro}^2$	1 → círculo perfeito < 1 → perímetro irregular
Razão de Aspecto	Maior diâmetro ÷ menor diâmetro	1 → objeto circular > 1 → objeto fusiforme
Arredondamento	$4 \times \text{Área} \div (\pi \times \text{Maior diâmetro}^2)$	1 → circunferência perfeita < 1 → área irregular

TABELA 3. Descrição dos parâmetros morfológicos avaliados. A tabela organiza parâmetro, fórmula e interpretação.

4.6. Quantificação de Espécies Reativas de Oxigênio

A produção intracelular de H_2O_2 foi quantificada usando o reagente Peroxy Orange 1 (PO1, Tocris Bioscience). Após a cinética de 0h, 12h e 24h, as células foram incubadas com meio DMEM 1% SFB sem fenol e 10 μM de PO1 por 1h a 37°C. As células foram fixadas e levadas ao microscópio confocal para análise.

4.7. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR)

O RNA total foi isolado usando o reagente TRIzol™ (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante para 600 µL. Brevemente, após a coleta com TRIzol, foram adicionados 120 µL de clorofórmio aos tubos, para serem fortemente homogeneizados. Os tubos foram centrifugados a 12000 rpm a 4°C para separação das fases, e a fase aquosa, contendo o RNA foi transferida para um novo tubo, e precipitada com isopropanol (800 µL) por pelo menos 1 hora a -80°C. Após esse período os tubos foram novamente centrifugados, o sobrenadante descartado e o pellet ressuspensão e lavado em etanol 80%. Após uma última centrifugação, descarte do sobrenadante, e manutenção do pellet nos tubos, os tubos foram levados ao banho seco por 10 min a 55°C para evaporação de qualquer resquício de álcool, e então ressuspensos em 50 µL de água DEPEC. O RNA foi quantificado usando o NanoDrop Lite (ThermoFisherScientific).

A transcrição reversa foi feita usando 400 ng de RNA total e o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (ThermoFischer Scientific), com inibidor de nuclease, seguindo o protocolo do fabricante. A PCR em tempo real foi realizada usando o kit Power Sybr Green Master Mix (Invitrogen), 40 ng (2 µL) de cDNA em um volume final de 20 µL. O gene RPS18 (*Ribosomal Protein S18*) foi utilizado para normalização da expressão dos genes SOX2, CK19, N-caderina e E-caderina (**Tabela 3**). A reação foi realizada no equipamento QuantStudio 3 Real-Time PCR System Instrument (Applied Biosystems), seguindo os seguintes parâmetros para ciclagem: 1 ciclo de 2 min a 50°C; 1 ciclo de 10 min a 95°C; 40 ciclos de 15 segundos a 95°C; 1 min a 58°C; 1 ciclo a 95°C; 1 min a 60°C e 1 segundo a 95°C. A expressão relativa dos genes foi realizada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Alvo	Primer senso (5'-3')	Primer antisenso (5'-3')
RPS18	GCAGAATCCACGCCAGTACAAG	GCTTGTTGTCCAGACCAATTGGC
SOX2	GCTACAGCATGATGCAGGACCA	TCTGCGAGCTGGTCATGGAGTT
CK19	AGCTAGAGGTGAAGATCCGCGA	GCAGGACAATCCTGGAGTTCTC

TABELA 4: Primers para genes-alvo humanos. A tabela organiza os primers utilizados para o RT-qPCR. FONTE: autor

4.8. Análise estatística

O software GraphPad Prism 8 (Boston, MA, USA) foi utilizado para todas as análises estatísticas e geração de gráficos. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk (alfa = 0,05) e à análise de *outliers* ROUT (Q = 1%). O teste ANOVA *Two-way* foi utilizado, com correção de Tukey, e valores foram considerados estatisticamente significativos quando $p \leq 0,05$.

5. Resultados

5.1. Transfecção e superexpressão de SOX2

A eficiência da transfecção de SOX2 utilizando o vetor *pHTC HaloTagTM CMV-neo-Vector* foi analisada por citometria de fluxo e RT-qPCR (**Fig. 8**). A expressão proteica de SOX2, avaliada por citometria de fluxo (**Fig. 8A**) pelo parâmetro de média da intensidade de fluorescência, apresentou-se elevada no grupo transfectado com o vetor contendo SOX2 em comparação com os grupos controle e vetor vazio. Ainda assim, nota-se expressão basal dessa proteína em todos os grupos, o que vai de acordo com dados da literatura (CHIANG *et al.*, 2024). A expressão relativa de SOX2, medida por $2^{-\Delta\Delta CT}$ mostra aumento (eixo Y em Log 10) de transcritos no grupo transfectado com o vetor SOX2 (**Fig. 8B**) em comparação com o grupo transfectado com vetor vazio. Juntos, os dados de expressão gênica e proteica de SOX2 confirmam que a transfecção em células MCF-7 foi bem-sucedida, de forma que há aumento expressivo da proteína e dos transcritos de SOX2. As imagens de microscopia confocal demonstram a presença da proteína no citoplasma celular e no núcleo. O grupo vetor vazio (**Fig. 8C**) apresenta uma expressão basal e discreta dessa proteína, enquanto no grupo transfectado com vetor SOX2 (**Fig. 8D**) há intensa produção proteica. Nota-se, também, uma sugestiva diferença na morfologia dessas duas células, sendo que o grupo transfectado com vetor vazio apresenta a morfologia tradicional de uma célula MCF-7, cuboidal, enquanto o grupo superexpressando SOX2 apresenta-se mais fusiforme com protusões de membrana. Para melhor investigar isso, marcação com F-actina foi realizada em sequência.

O reagente Lipofectamina 3000 e todo o processo de transfecção é danoso à célula, causando estresse, e, possivelmente, a ativação de mecanismos de morte celular. A fim de descartar a possibilidade de que os efeitos da superexpressão de SOX2 estejam relacionados à morte celular, o ensaio de anexina V/PI foi realizado, e graficamente observa-se pouca diferença entre os grupos SOX2 e controle (**Fig. 8E**). Apesar disso, observa-se sutil aumento de células vivas no grupo transfectado com SOX2 em comparação com o grupo transfectado com vetor vazio. No eixo X, a intensidade de fluorescência do iodeto de propídio, e no eixo Y a intensidade de fluorescência de anexina V. Os quadrantes Q1 e Q2 setorizam populações de células em apoptose e em apoptose tardia ou lise celular. O quadrante Q4 setoriza a população de células vivas (**Fig. 8F**).

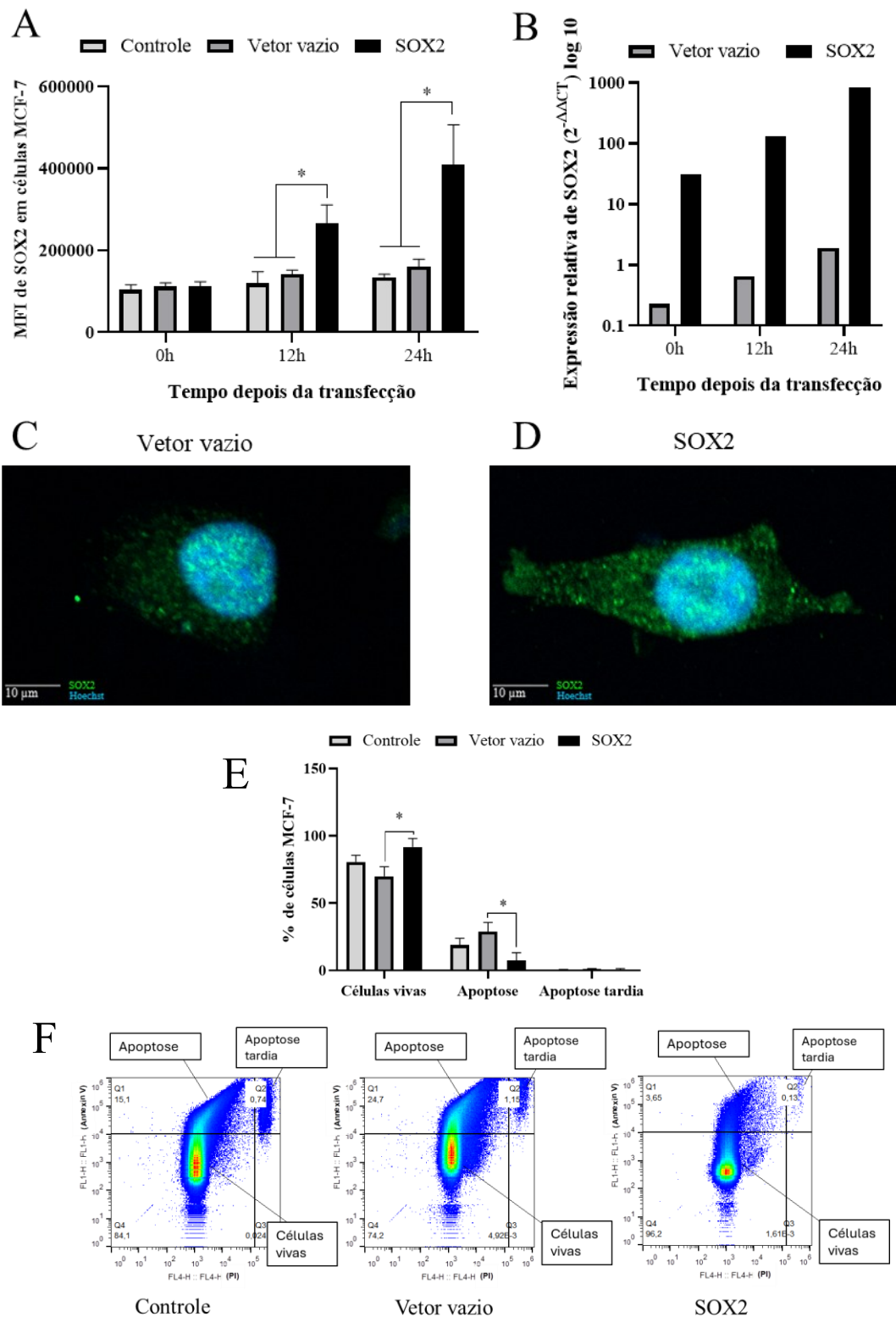


FIGURA 8. Expressão de SOX2 e a viabilidade celular pós-transfecção. A: Média da Intensidade de Fluorescência de SOX2, medida por citometria de fluxo. B: Expressão relativa de SOX2 avaliada por RT-qPCR, eixo Y em escala Log₁₀. C: Microscopia confocal de MCF-7 do grupo vetor vazio. D: Microscopia confocal de MCF-7 do grupo SOX2. Barra de escala = 10 μm. E: Gráfico de barras demonstrando a frequência de células viáveis. F: Gráfico populacional de células controle, transfectadas com vetor vazio e vetor SOX2, relativos à expressão de anexina V (eixo Y) e iodeto de propídio (eixo X). Asteriscos simbolizam diferença estatística.

5.2. Superexpressão de SOX2 promove mudanças morfológicas em MCF-7

Ao analisar as imagens de microscopia de imunofluorescência, três parâmetros foram mensurados para avaliar mudanças morfológicas induzidas pela superexpressão de SOX2: circularidade, razão de aspecto e arredondamento. O primeiro parâmetro, circularidade, diz respeito a quão regular é o perímetro celular. Ou seja, células com menos projeções de membrana se parecem mais com um círculo e possuem valor de circularidade próximo de 1 (**Fig. 9A**). A razão de aspecto mede o quociente entre o maior e o menor diâmetro da célula, e resultados mais distantes de 1 demonstram que as células são mais fusiformes (**Fig. 9B**) e valores próximos de 1 correspondem a células mais semelhantes a uma circunferência. O parâmetro de arredondamento mensura o quanto a área da célula se parece com uma circunferência, ou seja, células cuboidais têm um valor mais próximo de 1 (**Fig.9C**) enquanto células alongadas e com projeções de membrana têm valores mais distantes de 1.

Na figura **9D** é possível visualizar imagens de microscopia de imunofluorescência que mostram diferenças morfológicas nas culturas de MCF-7 que superexpressam SOX2. Observa-se que o grupo SOX2 (D1-D3) apresenta mudanças morfológicas marcantes, como o formato celular mais achatado e menor número de adesões célula-célula (setas brancas). Essas mudanças são observadas imediatamente (0h) após a transfecção e 12h e 24h após. Observa-se que as células tradicionalmente cuboidais passam a ter menos adesões entre si e formato alongado. Os grupos vetor vazio (D4-D6) e controle (D7-D9) não apresentam diferenças morfológicas, se assemelhando às células em cultura regular (**Fig. 1**). Essas células continuam apresentando o comportamento típico epitelial, com muitas adesões celulares e formato cuboidal.

Interessantemente, as mudanças no formato e comportamento celular já são perceptíveis 0h e 12h após o tempo da transfecção, quando os níveis proteicos e de transcritos de SOX2 ainda estão baixos. A fim de avaliar possíveis mecanismos por trás dessas mudanças morfológicas, investigou-se em seguida o possível envolvimento de proteínas do citoesqueleto, a citoqueratina-19, por seu valor prognóstico e a relação da diminuição de seus níveis proteicos com a formação do perfil indiferenciado, e a F-actina, por se relacionar com a formação de lamelipódios, estruturas que quando formadas causam irregularidade no perímetro celular.

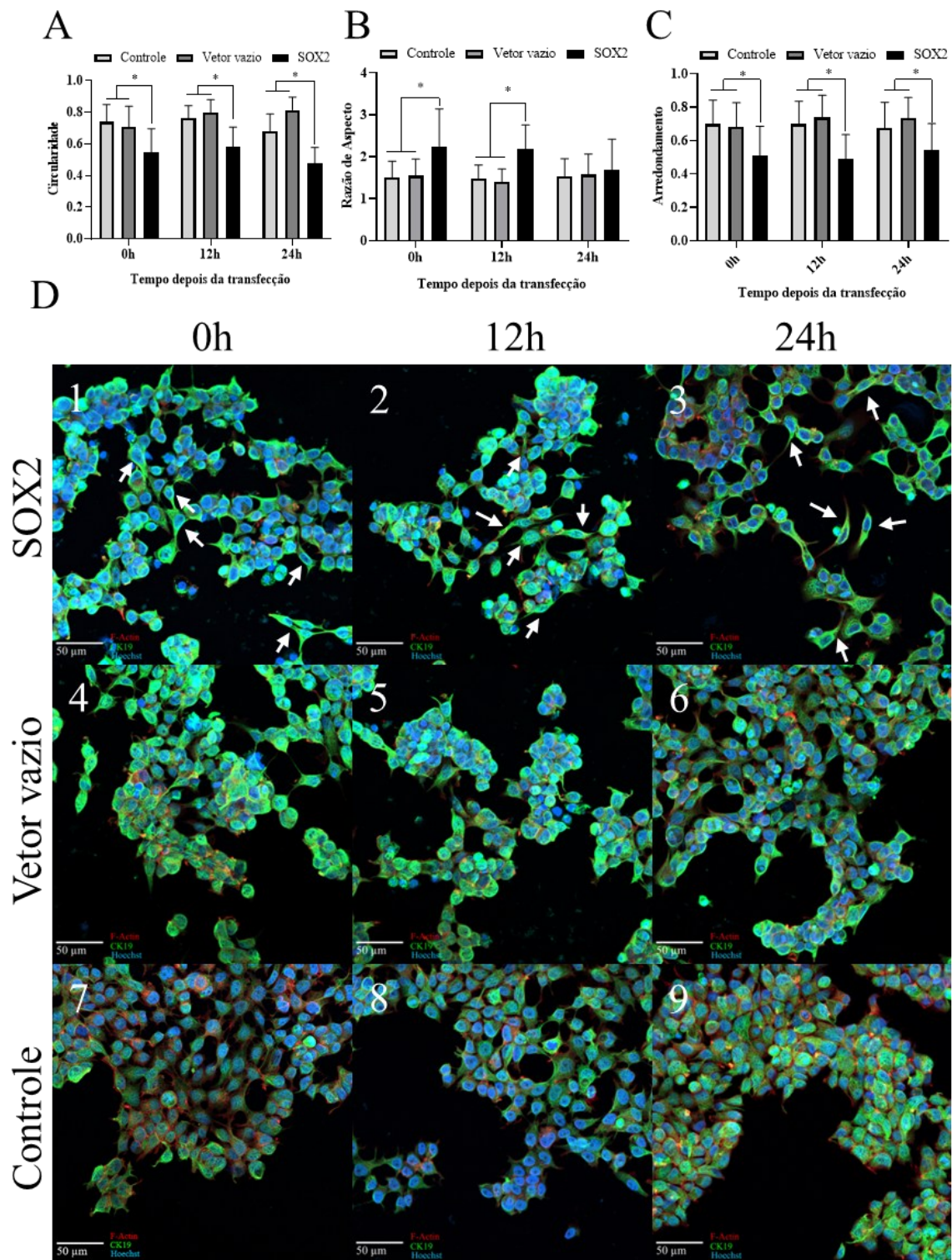


FIGURA 9. Morfologia de células MCF-7 após superexpressão de SOX2. A: Taxa de circularidade de células MCF-7, parâmetro que mede o perímetro celular, analisando o quão próximo é de um círculo perfeito; asteriscos simbolizam diferenças estatísticas em que $p \leq 0,05$. B: Gráfico de barras mostrando a razão de aspecto entre os grupos analisados. Este parâmetro mede o quociente entre o maior e o menor diâmetro da célula, e valores próximos a 1 se assemelham mais com uma circunferência. C: Taxa de arredondamento comparando os grupos, sendo o parâmetro que mede o quanto a área celular se parece com uma circunferência. D: Microscopias confocais dos grupos SOX2 (1-3), vetor vazio (4-6) e controle (7-9). Barra de escala = 50 µm.

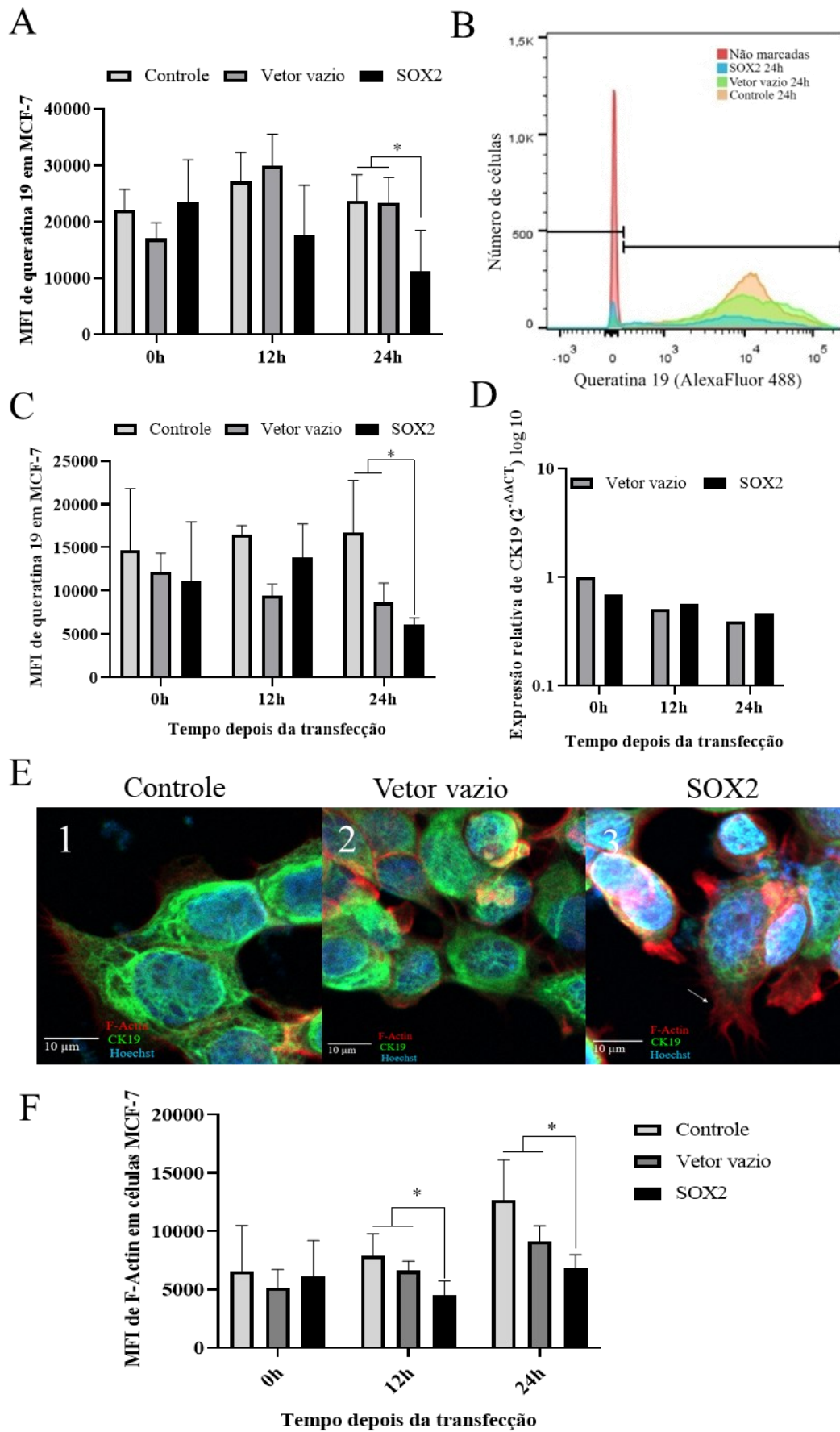


FIGURA 10. Diminuição de CK19 e F-actina em MCF-7. A: Média da intensidade de fluorescência medida por citometria de fluxo para citoqueratina 19. Asteriscos representam diferença estatística em que $p \leq 0,05$. B: Histograma da intensidade da fluorescência do fluoróforo AlexaFluor 488, que marca a citoqueratina 19. C: Média da intensidade de fluorescência medida por microscopia de fluorescência para citoqueratina 19. D: Resultados de RT-qPCR para transcritos de CK19. E: Microscopias confocais da marcação por *peroxy-orange* em células MCF-7. Barra de escala = 50 μm . F: Média da intensidade de fluorescência medida por microscopia de fluorescência de F-actina.

5.3. Superexpressão de SOX2 e alterações em proteínas do citoesqueleto

Após constatar que a transfecção de SOX2 promove mudanças fenotípicas, buscou-se entender quais proteínas do citoesqueleto poderiam ter sido afetadas. Dessa forma, a citoqueratina 19, por seu alto valor prognóstico e propriedades moleculares, teve seus níveis acessados. A quantificação fornecida pela citometria de fluxo (**Fig. 10A**), através da média da intensidade de fluorescência (MFI), demonstra que 24h após a transfecção há uma diminuição nos níveis de queratina 19. É possível observar pelo histograma que o grupo com alta expressão de SOX2 apresenta níveis mais baixos da proteína após 24h (**Fig. 10B**). Não obstante, a quantificação por imunofluorescência (**Fig. 10C**) apresentou o mesmo resultado, porém isso ainda não explica as mudanças fenotípicas observadas às 0h e 12h após transfecção que leva a questionar que a diminuição de CK19 é um dos mecanismos iniciais de ação de SOX2, mas junto a ele pode haver outros mecanismos. Além disso, a quantificação de transcritos para CK19, avaliada por RT-qPCR (**Fig. 10D**) não revelou diferenças na quantidade de RNA mensageiro produzido pela célula transfectada com SOX2. Isso leva a hipotetizar que essas células possam então estar retirando a citoqueratina ou a clivando de seu citoesqueleto.

Para tentar compreender se a CK19 é a única proteína do citoesqueleto afetada, foi feita a medição da média da intensidade de fluorescência de F-actina (**Fig. 10E e F**). A análise das imagens de microscopia confocal demonstra que, de forma semelhante à queratina, os microfilamentos de actina também são afetados pela transfecção de SOX2, inclusive apresentando resultados significativos às 12h pós transfecção, um tempo anterior aos resultados da CK19. Além disso, observam-se filopódios (seta branca), estruturas de movimentação celular, no grupo tratado. Isso leva a questionar o envolvimento de moléculas de adesão presentes na membrana plasmática, que têm intimidade com o citoesqueleto de actina.

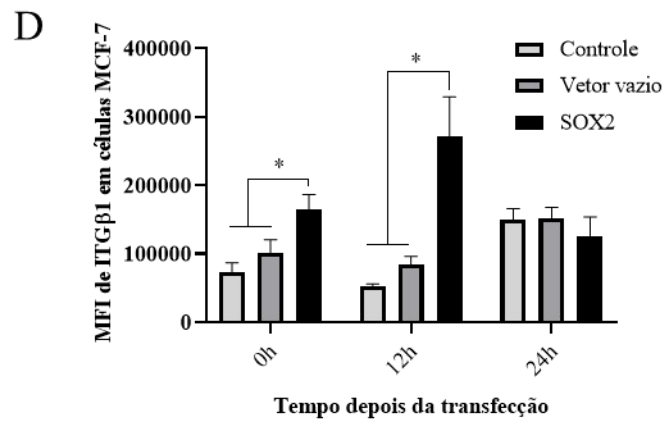
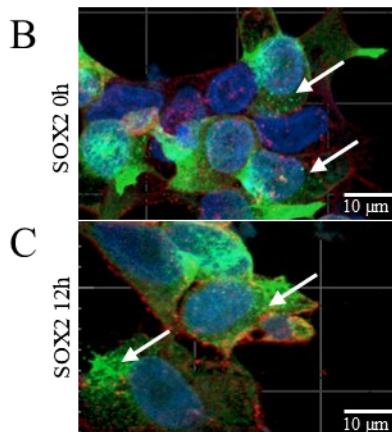
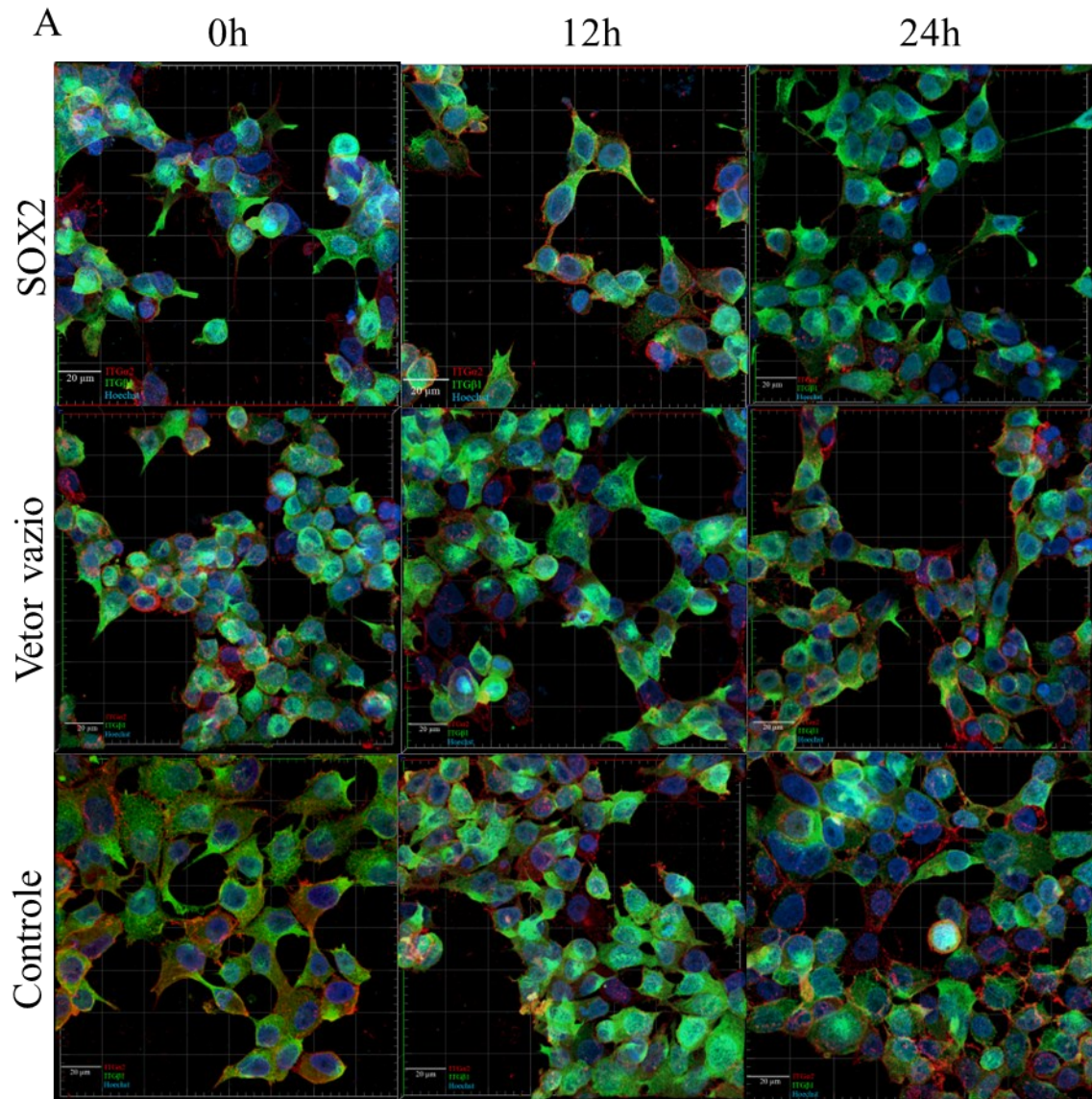


FIGURA 12. Efeito da superexpressão de SOX2 sobre moléculas de adesão. A: Microscopias de imunofluorescência com enfoque nas integrinas $\alpha 2$ (vermelho) e $\beta 1$ (verde), em série Z. Barra de escala = 20 μm ; B, C: Enfoque nos grupos 0h e 12h de SOX2, onde é possível observar pontos de adesão focal da integrina $\beta 1$. D: Média da intensidade de fluorescência de integrina $\beta 1$ medida por Citometria de fluxo. Asteriscos simbolizam diferenças estatísticas em que $p \leq 0,05$.

5.4. Influência de SOX2 sobre moléculas de adesão

De forma muito interessante, nos grupos SOX2 0h e 12h foi possível observar a formação de complexos adesivos (setas brancas) da integrina $\beta 1$, que não foi observada nos outros grupos (**Fig. 12 A, B, C**). As microscopias em série Z permitem observar a combinação de planos, evidenciando também as áreas de adesão celular.

Corroborando com isso, a integrina $\beta 1$ apresentou alterações consideravelmente iniciais após a transfecção de SOX2. Imediatamente às 0h e 12h depois da transfecção, os níveis de integrina $\beta 1$ aumentaram significativamente (**Fig. 12D**), enquanto os de $\alpha 2$ (**Fig.13A**) não apresentam alterações significativas, mas sugerem uma delicada diminuição. Esses resultados são relevantes para a compreensão do mecanismo de ação inicial de SOX2, que promove mudanças morfológicas, provavelmente por meio da alteração inicial nos níveis de integrinas, especialmente a integrina $\beta 1$, que sofre aumento considerável.

A fim de entender se essas integrinas estavam sendo influenciadas pela produção de peróxido de hidrogênio, uma espécie reativa de oxigênio capaz de ativar as integrinas, as células foram coradas com o reagente *peroxy-orange*. A análise das imagens de microscopia de fluorescência mostra que a média da intensidade de fluorescência não se alterou entre os grupos, sugerindo que a superexpressão de SOX2 não causa alterações nos níveis de H_2O_2 (**Fig. 13B e C**). Ao analisar a morfologia das células MCF-7 após a superexpressão de SOX2, foi questionado se esse evento se trata de uma transição epitelial-mesenquimal, que sabidamente pode ser induzida pela expressão de SOX2 (ZHU *et al.*, 2021). Todavia, nenhuma diferença nos níveis de E-caderina, marcador de células epiteliais, e N-caderina, marcador de células mesenquimais foi observada nessas 24h iniciais de superexpressão de SOX2, como demonstrado pela MFI dessas proteínas (**Fig. 13 E e F**).

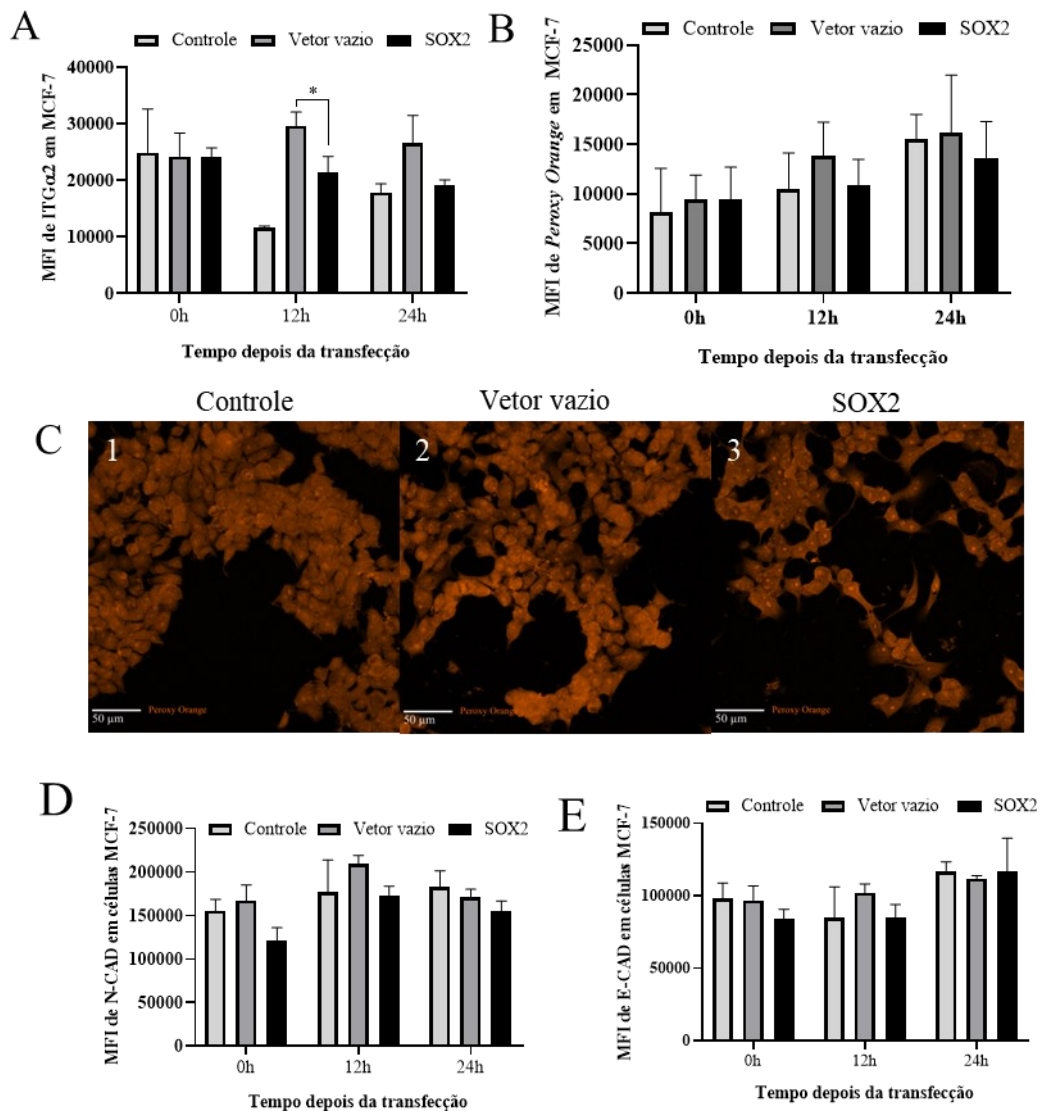


FIGURA 13: Influência da superexpressão de SOX2 sob a expressão de Integrinas $\alpha 2$, $\beta 1$ e N-caderina e E-caderina. (A) Média da intensidade de fluorescência de integrina alfa 2 em células MCF-7. (B) MFI de *peroxy-orange*. (C) Microscopias de Imunofluorescência da marcação por *peroxy-orange*, em laranja, onde a barra de escala demarca 50 micrômetros. (D) MFI de N-caderina. (E) MFI de E-caderina.

6. Discussão

Os resultados deste trabalho evidenciam SOX2 como potencial fator para alterações morfológicas e moleculares em modelo MCF-7, que representa o câncer de mama luminal A. Esse fator de transcrição é amplamente estudado como promotor de pluripotência, mantenedor de perfil de células-tronco, orquestrador da diferenciação celular, apoptose e migração celular durante a embriogênese (LEIS *et al.*, 2012; NOVAK *et al.*, 2020; SWAIN *et al.*, 2020). No contexto tumoral, SOX2 é descrito como um fator importante na formação de células-tronco pluripotentes induzidas, e células-tronco do câncer. Neste trabalho, foi realizada a

superexpressão de SOX2 em uma linhagem classicamente usada como modelo de estudo para neoplasia mamária de fenótipo epitelial, buscando compreender os papéis desse fator de transcrição e sua expressão gênica e proteica na biologia tumoral das células MCF-7.

A transfecção, realizada por meio do reagente Lipofectamina 3000 apresenta toxicidade baixa, comparada com outros protocolos de transfecção (THERMOFISCHER SCIENTIFIC, 2016), o que foi avaliado pelo ensaio de anexina V/Iodeto de propídio (PI). Células apoptóticas exibem fosfatidilserina em sua membrana, que é o epítipo de ligação da anexina V, enquanto células com comprometimento nuclear são permissivas à passagem e ligação do Iodeto de Propídio (PI) ao DNA. Dessa forma, observou-se um número pouco relevante de células em apoptose (ANXV+/PI-) e em apoptose tardia/necrose (ANXV+/PI+) tanto para o grupo superexpressando SOX2 quanto para o grupo transfectado com o vetor vazio. O ensaio de anexina V/PI é muito importante nesse contexto pois descarta a possibilidade de que os efeitos observados por conta da superexpressão de SOX2 sejam advindos da morte celular (LAKSHMANAN; BATRA, 2013). Interessantemente, o grupo superexpressando SOX2 teve uma sobrevivência maior em comparação ao grupo transfectado com vetor vazio, o que mostra a capacidade de SOX2 de inibir apoptose. A quantificação de SOX2 através da técnica de MFI por citometria de fluxo nos revela aumento progressivo dos níveis proteicos intracelulares, tendo as 24h pós-transfecção com o valor mais alto. Os resultados de RT-qPCR estão em concordância com a avaliação proteica, apresentando progressivo aumento no número de transcritos. Curiosamente, o grupo tratado apresentou diferenças morfológicas e moleculares comparado aos grupos controle tão cedo quanto 0h e 12h pós-transfecção, momento em que os níveis proteicos e de transcritos não estavam tão discrepantes dos grupos controle. Esse fenômeno pode sugerir um possível efeito de correção gênica causada pela presença artificial de SOX2 nessas células. Genes e regiões gênicas interagem entre si, se regulam, bem como há interações proteína-gene (LI *et al.*, 2014). Essa questão não foi precisamente investigada, de forma que permanece sem explicação clara a via celular de sinalização exata responsável pela influência inicial (0h-12h) de SOX2 na célula MCF-7, sendo então uma limitação desse trabalho.

Apesar de seu exato mecanismo não ter sido totalmente investigado, os efeitos iniciais da superexpressão de SOX2 são evidentes. As células transfectadas apresentam mudanças fenotípicas e morfológicas, de forma que abandonam seu perfil epitelial, cuboide e fortemente aderido às células vizinhas para adquirir um corpo celular alongado, com prolongamentos de membrana do tipo filopódio e espaçamento entre as células. SOX2 induziu uma mudança

morfológica e comportamental em células epiteliais, conduzindo-as a ter um perfil menos diferenciado, sugestivo de fenótipo mesenquimal. Os parâmetros de circularidade, arredondamento e razão de aspectos foram utilizados para quantificar as mudanças morfológicas vistas nas células, e apresentaram diferença significativa entre o grupo tratado e os grupos controle.

Apesar de ser sugestiva, a transição epitelial-mesenquimal não pôde ser comprovada nesta configuração experimental. Os níveis de E-caderina, clássica molécula de adesão de junções aderentes de células epiteliais não apresentou diferenças significativas entre os grupos. Em consonância, os níveis de N-caderina, clássico marcador de células mesenquimais, tampouco apresentou diferenças (PASTUSHENKO; BLANPAIN, 2019). Todavia, não foi avaliado os níveis de transcritos desses genes, bem como outros marcadores da TEM como a vimentina. Esses fatos, bem como o curto tempo de superexpressão (24h) foram uma limitação para a avaliação completa da possível e provável transição epitelial-mesenquimal dessas células.

Ao contrário das caderinas, as integrinas, moléculas de adesão à matriz extracelular apresentaram alguma diferença entre os grupos. A integrina $\alpha 2\beta 1$, cuja expressão muito se relaciona com a metástase óssea (LUNDSTRÖM *et al.*, 1998), apresentou diferença entre os grupos superexpressando SOX2 e controles. Imediatamente após (0h) o fim da transfecção e 12h depois, os níveis proteicos da integrina $\beta 1$ estavam aumentados no grupo tratado em comparação com o grupo controle. Esses achados podem traçar uma possível correlação entre a superexpressão de SOX2, as mudanças morfológicas e a expressão alterada de integrinas. O aumento inicial e não duradouro da integrina $\beta 1$ é intrigante, mas possível, na medida em que diversas outras integrinas podem sofrer alterações em suas expressões, e todas essas modificações proteicas são finamente reguladas pelas células. Apesar disso, a presença da integrina $\beta 1$ é muito relevante para migração, não apenas em câncer de mama, mas em outros processos de invasão (MARTINS CAVACO *et al.*, 2018), que envolvem outras proteínas da matriz que não sejam o colágeno I utilizado neste trabalho.

Para se moverem, as células precisam tanto das integrinas que as aderem ao substrato quando do citoesqueleto, que promove sua movimentação. Os resultados deste trabalho demonstram uma diminuição nos níveis proteicos de citoqueratina 19 às 24h pós transfecção, e de F-actina às 12h e 24h. Isso é de relevância na medida em que leva a sugestão de que essas células se tornam menos rígidas, e mais propensas a realizar movimentos. As citoqueratinas são o principal elemento que confere rigidez às células, e, especialmente a citoqueratina 19 é reportada como molécula de valor prognóstico em diversos tipos de tumores. A presença de

citoqueratina 19 no soro de pacientes com câncer de mama se relaciona com menor sobrevivência das pacientes (ALIX-PANABIÈRES et al., 2009; BUGALHO et al., 2013; GIOVANELLA et al., 2002; SALOUSTROS; MAVROUDIS, 2010; YUAN et al., 1997), e o achado de que SOX2 regula a expressão de citoqueratina 19 é muito importante para estudos futuros. Interessantemente, já foi demonstrado que as células MCF-7 são capazes de ativamente remover fragmentos intactos de citoqueratina 19 de seu citoesqueleto (ALIX-PANABIÈRES et al., 2009), o que é de muita relevância na medida em que essa proteína mantém a localização da E-caderina na membrana e é fundamental para manutenção do perfil epitelial (ALSHARIF et al., 2021; KABIR; RÖNNSTRAND; KAZI, 2014; LAM et al., 2020).

A avaliação da produção de peróxido de hidrogênio, uma espécie reativa de oxigênio, foi muito importante para compreender se há participação dessa molécula nos efeitos observados. Como integrinas são reguladas por balanço redox, avaliou-se a produção de H₂O₂ intracelular, porém não se constatou diferenças nos níveis de fluorescência de *peroxy-orange*, o que sinaliza inalteração nos níveis de peróxido de hidrogênio intracelular. Esse dado leva a hipotetizar que a integrina beta 1 possa estar sendo produzida *de novo* ao invés de estar sendo ativada.

7. Conclusão

Em conclusão, este estudo se propôs a investigar efeitos iniciais da superexpressão de SOX2 em uma linhagem luminal A de câncer de mama. Os resultados demonstram que o aumento de SOX2 nessas células provoca mudanças morfológicas rápidas, de forma que as células transitam pela perda da arquitetura epitelial para apresentarem uma morfologia mais fusiforme e menos aderida umas às outras. Em associação a esse efeito, os níveis proteicos de integrina $\beta 1$ aumentam, enquanto os de citoqueratina 19 e F-actina diminuem, sinalizando um ganho de habilidade locomotiva dessas células, que passam a possuir maior capacidade de se aderir ao substrato e maior liberdade para se movimentar por ele. Apesar de sugestiva transição epitelial-mesenquimal, o estudo não foi capaz de comprová-la, e pode ser reestruturado para responder novas perguntas como essa. Todavia, descreve-se neste trabalho uma associação da superexpressão de SOX2 com alterações nas proteínas essenciais para a manutenção de um perfil menos agressivo no modelo de câncer de mama luminal A (MCF-7). Conclui-se que SOX2 influencia a morfologia de células MCF-7 influenciando a disponibilidade de citoqueratina 19, F-actina e Integrina $\alpha 2\beta 1$, podendo fornecer novos *insights* para estudos futuros em MCF-7 e outras linhagens tumorais.

8. Referências

- AGUIRRE, M. et al. Application of the Yamanaka Transcription Factors Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc from the Laboratory to the Clinic. *Genes*, v. 14, n. 9, 26 ago. 2023.
- AKHMANOVA, A.; STEINMETZ, M. O. Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 16, n. 12, p. 711–726, 12 dez. 2015.
- ALIX-PANABIÈRES, C. et al. Full-length cytokeratin-19 is released by human tumor cells: A potential role in metastatic progression of breast cancer. *Breast Cancer Research*, v. 11, n. 3, 23 jun. 2009.
- ALSHARIF, S. et al. Keratin 19 maintains E-cadherin localization at the cell surface and stabilizes cell-cell adhesion of MCF7 cells. *Cell Adhesion & Migration*, v. 15, n. 1, p. 1–17, 1 jan. 2021.
- BERTA, P. et al. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature*, v. 348, n. 6300, p. 448–450, nov. 1990.
- BOWLES, J.; SCHEPERS, G.; KOOPMAN, P. Phylogeny of the SOX Family of Developmental Transcription Factors Based on Sequence and Structural Indicators. *Developmental Biology*, v. 227, n. 2, p. 239–255, nov. 2000.
- BUGALHO, A. et al. Cytokeratin 19, Carcinoembryonic Antigen, and Epithelial Cell Adhesion Molecule Detect Lung Cancer Lymph Node Metastasis in Endobronchial Ultrasound-Guided Transbronchial Aspiration Samples. *Clinical Lung Cancer*, v. 14, n. 6, p. 704–712, nov. 2013.
- BUIJS, J. T.; VAN DER PLUIJM, G. Osteotropic cancers: From primary tumor to bone. *Cancer Letters*, v. 273, n. 2, p. 177–193, jan. 2009.
- CAMPBELL, I. D.; HUMPHRIES, M. J. Integrin Structure, Activation, and Interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 3, n. 3, p. a004994–a004994, 1 mar. 2011.
- CARLIER, M. F.; SHEKHAR, S. Global treadmilling coordinates actin turnover and controls the size of actin networks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. [S.l.]: Nature Publishing Group., 1 jun. 2017
- CHEN, Z. et al. Adherent junctions: Physiology, role in hydrocephalus and potential therapeutic targets. *IBRO Neuroscience Reports*, v. 18, p. 283–292, jun. 2025.

CHEW, L.; GALLO, V. The Yin and Yang of Sox proteins: Activation and repression in development and disease. *Journal of Neuroscience Research*, v. 87, n. 15, p. 3277–3287, 15 nov. 2009.

CHIANG, Y.-F. et al. Hinokitiol Inhibits Breast Cancer Cells In Vitro Stemness-Progression and Self-Renewal with Apoptosis and Autophagy Modulation via the CD44/Nanog/SOX2/Oct4 Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 7, p. 3904, 31 mar. 2024.

COLEMAN, R. E. Clinical Features of Metastatic Bone Disease and Risk of Skeletal Morbidity. *Clinical Cancer Research*, v. 12, n. 20, p. 6243s–6249s, 15 out. 2006.

CONWAY, J. F.; PARRY, D. A. D. Structure and Spatial Organisation of Intermediate Filament and Nuclear Lamin Molecules. *Springer Series ed. Berlin: Springer*, 1989. v. 3. p. 140–149. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-73925-5_28>.

DEL PUERTO, H. L. et al. Clinical Correlation of Transcription Factor SOX3 in Cancer: Unveiling Its Role in Tumorigenesis. *Genes*, v. 15, n. 6, p. 777, 13 jun. 2024.

FERNANDES, J. O. et al. Breast cancer survival after mammography dissemination in Brazil: a population-based analysis of 2,715 cases. *BMC Women's Health*, v. 23, n. 1, p. 644, 4 dez. 2023.

FILHO, G. B. Bogliolo - Patologia Geral. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

FOISNER, R. Dynamic organisation of intermediate filaments and associated proteins during the cell cycle. *BioEssays*, v. 19, n. 4, p. 297–305, 5 abr. 1997. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bies.950190407>>.

FUCHS, E.; WEBER, K. INTERMEDIATE FILAMENTS: Structure, Dynamics, Function and Disease. *Annual Review of Biochemistry*, v. 63, n. 1, p. 345–382, jun. 1994. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.bi.63.070194.002021>>.

GIOVANELLA, L. et al. Serum Cytokeratin Fragment 21.1 (CYFRA 21.1) as Tumour Marker for Breast Cancer: Comparison with Carbohydrate Antigen 15.3 (CA 15.3) and Carcinoembryonic Antigen (CEA). *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, v. 40, n. 3, 10 jan. 2002.

GONIAS, S. L. Cytokeratin 8 functions as a major plasminogen receptor in select epithelial and carcinoma cells. *Frontiers in Bioscience*, v. 6, n. 1, p. d1403, 2001.

GURDON, J. B. Molecular biology of the cell. Trends in Biochemical Sciences, v. 8, n. 10, p. 383–384, out. 1983. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0968000483903699>>.

HAIDER, M.-T. et al. Interleukins as Mediators of the Tumor Cell—Bone Cell Crosstalk during the Initiation of Breast Cancer Bone Metastasis. International Journal of Molecular Sciences, v. 22, n. 6, p. 2898, 12 mar. 2021.

HANNA, J. et al. Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 107, n. 20, p. 9222–7, 18 maio 2010.

HANUKOGLU, I.; FUCHS, E. The cDNA Sequence of a Type II Cytoskeletal Keratin Reveals Constant and Variable Structural Domains among Keratins. Cell. [S.l: s.n.], 1983.

HATZFELD, M.; MAIER, G.; FRANKE, W. W. Cytokeratin domains involved in heterotypic complex formation determined by in-vitro binding assays. Journal of Molecular Biology, v. 197, n. 2, p. 237–255, set. 1987.

HERRMANN, H. et al. Intermediate filaments: From cell architecture to nanomechanics. Nature Reviews Molecular Cell Biology. [S.l: s.n.], jul. 2007

HERRMANN, H.; AEBI, U. Intermediate filaments: Structure and assembly. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, v. 8, n. 11, 1 nov. 2016.

HOSHINO, A. et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. Nature, v. 527, n. 7578, p. 329–335, 19 nov. 2015.

HOU, L.; SRIVASTAVA, Y.; JAUCH, R. Molecular basis for the genome engagement by Sox proteins. Seminars in Cell & Developmental Biology, v. 63, p. 2–12, mar. 2017.

HOWLADER, N. et al. Differences in Breast Cancer Survival by Molecular Subtypes in the United States. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, v. 27, n. 6, p. 619–626, 1 jun. 2018.

HU, H. et al. Evaluation of the determinants for improved pluripotency induction and maintenance by engineered SOX17. Nucleic acids research, v. 51, n. 17, p. 8934–8956, 22 set. 2023.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER / MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estimativa | 2023 Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: [s.n.], 2022.

JACOB, J. T. et al. Types I and II keratin intermediate filaments. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 10, n. 4, 1 abr. 2018.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. *Biologia Celular e Molecular*. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

KABIR, N. N.; RÖNNSTRAND, L.; KAZI, J. U. Keratin 19 expression correlates with poor prognosis in breast cancer. *Molecular Biology Reports*, v. 41, n. 12, p. 7729–7735, 26 dez. 2014.

KIM, S.; COULOMBE, P. A. Emerging role for the cytoskeleton as an organizer and regulator of translation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. [S.l: s.n.], jan. 2010

KUMAR, Vinay; ABBAS, Abul K.; ASTER, Jon C. *Robbins Patologia Básica*. 10. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2021.

LAKSHMANAN, I.; BATRA, S. Protocol for Apoptosis Assay by Flow Cytometry Using Annexin V Staining Method. *BIO-PROTOCOL*, v. 3, n. 6, 2013.

LAM, V. K. et al. Morphology, Motility, and Cytoskeletal Architecture of Breast Cancer Cells Depend on Keratin 19 and Substrate. *Cytometry Part A*, v. 97, n. 11, p. 1145–1155, 14 nov. 2020.

LEIS, O. et al. Sox2 expression in breast tumours and activation in breast cancer stem cells. *Oncogene*, v. 31, n. 11, p. 1354–1365, 15 mar. 2012.

LI, Q. V.; ROSEN, B. P.; HUANGFU, D. Decoding pluripotency: Genetic screens to interrogate the acquisition, maintenance, and exit of pluripotency. *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine*, v. 12, n. 1, p. e1464, jan. 2020.

LI, X. et al. The Transcriptional Regulation of SOX2 on FOXA1 Gene and its Application in Diagnosis of Human Breast and Lung Cancers. *Clinical Laboratory*, v. 60, n. 06/2014, 2014.

LIM, Y. et al. Keratin 8/18 regulate the akt signaling pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 17, 1 set. 2021.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.

LUNDSTRÖM, Å. et al. The Role of $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 3\beta 1$ Integrin Receptors in the Initial Anchoring of MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells to Cortical Bone Matrix. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 250, n. 3, p. 735–740, set. 1998.

MADAMANCHI, A.; SANTORO, S. A.; ZUTTER, M. M. $\alpha 2\beta 1$ Integrin. [S.l: s.n.], 2014. p. 41–60.

MARGOLIS, R. L.; WILSON, L. Microtubule treadmilling: what goes around comes around. *BioEssays*, v. 20, n. 10, p. 830–836, 12 dez. 1998. Disponível em: <[https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(199810\)20:10<830:AID-BIES8>3.0.CO;2-N](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1521-1878(199810)20:10<830:AID-BIES8>3.0.CO;2-N)>.

MARTINS CAVACO, A. C. et al. The Interaction between Laminin-332 and $\alpha 3\beta 1$ Integrin Determines Differentiation and Maintenance of CAFs, and Supports Invasion of Pancreatic Duct Adenocarcinoma Cells. *Cancers*, v. 11, n. 1, p. 14, 21 dez. 2018.

MORITZ, M. N. O. et al. Biphasic $\alpha 2\beta 1$ Integrin Expression in Breast Cancer Metastasis to Bone. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 13, p. 6906, 27 jun. 2021.

NAFEEY, S. et al. Branching of keratin intermediate filaments. *Journal of Structural Biology*, v. 194, n. 3, p. 415–422, 1 jun. 2016.

NAKATA, B. et al. Serum CYFRA 21-1 is one of the most reliable tumor markers for breast carcinoma. *Cancer*, v. 89, n. 6, p. 1285–1290, 15 set. 2000.

NDIAYE, A. B.; KOENDERINK, G. H.; SHEMESH, M. Intermediate Filaments in Cellular Mechanoresponsiveness: Mediating Cytoskeletal Crosstalk from Membrane to Nucleus and Back. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. [S.l.]: Frontiers Media S.A., 11 abr. 2022

NISHIMURA, Y.; KASAHARA, K.; INAGAKI, M. Intermediate filaments and IF-associated proteins: From cell architecture to cell proliferation. *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences*. [S.l.]: Japan Academy., 2019

NOVAK, D. et al. SOX2 in development and cancer biology. *Seminars in Cancer Biology*. [S.l.]: Academic Press., 1 dez. 2020

OBEAGU EI, Obeagu GU. Breast cancer: A review of risk factors and diagnosis. *Medicine (Baltimore)*. 2024 Jan 19;103(3): e36905. doi: 10.1097/MD.00000000000036905. PMID: 38241592; PMCID: PMC10798762.

- ORIOLO, A. S. et al. Intermediate filaments: A role in epithelial polarity. *Experimental Cell Research*. [S.l.]: Academic Press Inc., 10 jun. 2007
- PAGET, S. THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST. *The Lancet*, v. 133, n. 3421, p. 571–573, mar. 1889.
- PARRY, D. A. D.; STEINERT, P. M. Intermediate filament structure. . [S.l: s.n.], 1992.
- PASTUSHENKO, I.; BLANPAIN, C. EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends in Cell Biology*, v. 29, n. 3, p. 212–226, mar. 2019.
- PEINADO, H.; LAVOTSHKIN, S.; LYDEN, D. The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: Old sayings and new thoughts. *Seminars in Cancer Biology*, v. 21, n. 2, p. 139–146, abr. 2011.
- PIVA M, Domenici G, Iriondo O, Rábano M, Simões BM, Comaills V, Barredo I, López-Ruiz JA, Zabalza I, Kypta R, Vivanco Md. Sox2 promotes tamoxifen resistance in breast cancer cells. *EMBO Mol Med*. 2014 Jan;6(1):66-79. doi: 10.1002/emmm.201303411. PMID: 24178749; PMCID: PMC3936493.
- POLLARD, T. D. et al. *Cell Biology*. United States: Elsevier, 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/C20140002729>>.
- POLLARD, T. D.; COOPER, J. A. Actin, a Central Player in Cell Shape and Movement. *Science*, v. 326, n. 5957, p. 1208–1212, 27 nov. 2009.
- POLLARD, T. D.; GOLDMAN, R. D. Overview of the cytoskeleton from an evolutionary perspective. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 10, n. 7, 1 jul. 2018.
- RIDLEY, A. J. et al. Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. *Science*, v. 302, n. 5651, p. 1704–1709, 5 dez. 2003.
- RUOSLAHTI, E. Integrins. *Journal of Clinical Investigation*, v. 87, n. 1, p. 1–5, 1 jan. 1991.
- SAHA, S. et al. Cytokeratin 19 (KRT19) has a Role in the Reprogramming of Cancer Stem Cell-Like Cells to Less Aggressive and More Drug-Sensitive Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 5, p. 1423, 9 maio 2018.
- SALOUSTROS, E.; MAVROUDIS, D. Cytokeratin 19-Positive Circulating Tumor Cells in Early Breast Cancer Prognosis. *Future Oncology*, v. 6, n. 2, p. 209–219, 28 fev. 2010.

SANGHVI-SHAH, R.; WEBER, G. F. Intermediate filaments at the junction of mechanotransduction, migration, and development. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. [S.l.]: Frontiers Media S.A, 14 set. 2017

SAUK, J. J. et al. Reconstitution of cytokeratin filaments in vitro: further evidence for the role of nonhelical peptides in filament assembly. *The Journal of cell biology*, v. 99, n. 5, p. 1590–1597, 1 nov. 1984.

SAWANT, M. S.; LEUBE, R. E. Consequences of Keratin Phosphorylation for Cytoskeletal Organization and Epithelial Functions. *International Review of Cell and Molecular Biology*. [S.l.]: Elsevier Inc., 2017. v. 330. p. 171–225.

SCHAEFER, T.; LENGGERKE, C. SOX2 protein biochemistry in stemness, reprogramming, and cancer: the PI3K/AKT/SOX2 axis and beyond. *Oncogene*, v. 39, n. 2, p. 278–292, jan. 2020.

SELVARAJ, V. et al. Type 1 collagen: Synthesis, structure and key functions in bone mineralization. *Differentiation*, v. 136, p. 100757, mar. 2024.

SHIAH JV, Johnson DE, Grandis JR. Transcription Factors and Cancer: Approaches to Targeting. *Cancer J*. 2023 Jan-Feb 01;29(1):38-46. doi: 10.1097/PPO.0000000000000639. PMID: 36693157; PMCID: PMC9881838.

SKONDRA, M. et al. Detection of circulating tumor cells in breast cancer patients using multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction and specific primers for MGB, PTHRP and KRT19 correlation with clinicopathological features. *Anticancer research*, v. 34, n. 11, p. 6691–9, nov. 2014.

SVITKINA, T. Imaging CytoskeletonCytoskeletonsComponents by Electron Microscopy. In: GAVIN, R. H. (Org.) *Cytoskeleton: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer US, 2022. p. 25–52. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1661-1_2>.

SWAIN, N. et al. SOX2, OCT4 and NANOG: The core embryonic stem cell pluripotency regulators in oral carcinogenesis. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, v. 24, n. 2, p. 368, 2020.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. [S.l.]: Nature Publishing Group. , 1 mar. 2016

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, v. 126, n. 4, p. 663–676, ago. 2006.

THERMOFISCHER SCIENTIFIC. Lipofectamine 3000 Transfection Reagent.

VANTANGOLI MM, Madnick SJ, Huse SM, Weston P, Boekelheide K. MCF-7 Human Breast Cancer Cells Form Differentiated Microtissues in Scaffold-Free Hydrogels. *PLoS One*. 2015 Aug 12;10(8):e0135426. doi: 10.1371/journal.pone.0135426. PMID: 26267486; PMCID: PMC4534042.

VERWEI, H. N. et al. Quantifying Cytoskeleton Dynamics Using Differential Dynamic Microscopy. *Journal of Visualized Experiments*, v. 2022, n. 184, 1 jun. 2022.

VISHNOI K, Viswakarma N, Rana A, Rana B. Transcription Factors in Cancer Development and Therapy. *Cancers (Basel)*. 2020 Aug 15;12(8):2296. doi: 10.3390/cancers12082296. PMID: 32824207; PMCID: PMC7464564.

WALKO, G.; CASTAÑÓN, M. J.; WICHE, G. Molecular architecture and function of the hemidesmosome. *Cell and Tissue Research*, v. 360, n. 3, p. 529–544, 29 jun. 2015.

WANG, Q. et al. Sites of nucleic acid binding in type I-IV intermediate filament subunit proteins. *Biochemistry*, v. 40, n. 34, p. 10342–10349, 28 ago. 2001.

WELTNER, J. et al. Human pluripotent reprogramming with CRISPR activators. *Nature communications*, v. 9, n. 1, p. 2643, 6 jul. 2018.

WINTERS, S. et al. *Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening*. p. 1–32, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, I. A. FOR R. ON C. Cancer Today. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/today/en>>. Acesso em: 31 jul. 2025.

WU, Y.-J.; RHEINWALD, J. G. A new small (40 kd) keratin filament protein made by some cultured human squamous cell carcinomas. *Cell*, v. 25, n. 3, p. 627–635, set. 1981.

YUAN, C.-C. et al. Cytokeratin-19 associated with apoptosis and chemosensitivity in human cervical cancer cells. *Apoptosis*, v. 2, n. 1, p. 101–105, 1997.

ZHANG, S.; XIONG, X.; SUN, Y. Functional characterization of SOX2 as an anticancer target. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 5, n. 1, p. 135, 29 jul. 2020.

ZHANG, Z. et al. Caspase-3-mediated GSDME induced Pyroptosis in breast cancer cells through the ROS/JNK signalling pathway. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 25, n. 17, p. 8159–8168, 8 set. 2021.

ZHU, Y. et al. SOX2 promotes chemoresistance, cancer stem cells properties, and epithelial–mesenchymal transition by β -catenin and Beclin1/autophagy signaling in colorectal cancer. *Cell Death & Disease*, v. 12, n. 5, p. 449, 5 maio 2021.

ZIHNI, C. et al. Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 17, n. 9, p. 564–580, 29 set. 2016.

ZIMMER, S. E.; KOWALCZYK, A. P. The desmosome as a dynamic membrane domain. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 90, p. 102403, out. 2024.