

## PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA – PIBIC

### MICROPADRÕES INTELIGENTES: EXPLORANDO COMO O AMBIENTE MOLDA A DIREÇÃO E A POLARIZAÇÃO CELULAR

**Pesquisador(a) responsável:** Renata Santos Rabelo

**Unidade do CNPEM:** Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS)

#### 1. Introdução

A migração celular direcionada representa um processo fundamental em diversos contextos biológicos, desde o desenvolvimento embrionário até a cicatrização de feridas e a progressão tumoral. A capacidade das células de estabelecer polaridade frente-trás e migrar de forma direcionada depende criticamente de sinais espacialmente definidos no microambiente extracelular<sup>1,2</sup>. Estes sinais incluem gradientes de moléculas solúveis (quimiotaxia), distribuição assimétrica de proteínas da matriz extracelular (haptotaxia) e características topográficas e mecânicas do substrato (durotaxia).

A compreensão dos mecanismos que regem a polarização celular durante a migração direcionada permanece incompleta, particularmente no que diz respeito à integração de múltiplos sinais ambientais. Tradicionalmente, estudos de migração celular utilizam sistemas simplificados que não capturam adequadamente a complexidade do microambiente *in vivo*. Câmaras de quimiotaxia convencionais não permitem o controle espacial preciso de proteínas de matriz, enquanto substratos com padrões proteicos uniformes falham em recriar os gradientes e assimetrias encontrados em tecidos nativos.

A tecnologia de micropatterning PRIMO (Alvéole), baseada na fotoablação assistida por laser, oferece uma oportunidade única para superar estas limitações. Esta plataforma permite a criação de microambientes celulares com alta precisão espacial (~1-2µm), possibilitando o desenho de gradientes e padrões assimétricos de proteínas de matriz extracelular que podem direcionar a polarização e migração celular. Este projeto propõe utilizar a PRIMO para criar microambientes celulares que mimetizem aspectos críticos da geometria e gradientes de matriz extracelular encontrados durante processos migratórios *in vivo*, com potencial para elucidar mecanismos fundamentais de polarização celular, identificar diferenças entre células normais e patológicas, e estabelecer bases para o desenvolvimento de terapias que modulem a migração celular em contextos patológicos.

#### 2. Estado da Arte

A migração celular direcionada depende do estabelecimento e manutenção de polaridade frente-trás, um processo complexo que envolve reorganização do citoesqueleto, reposicionamento de organelas e tráfego assimétrico de vesículas<sup>3</sup>. Este processo é governado por reguladores moleculares que incluem as GTPases da família Rho (RhoA, Rac1, Cdc42), fosfolipídios de membrana (PIP2, PIP3) e complexos proteicos envolvendo PTEN, PAR, e Scribble<sup>4</sup>. Na frente migratória, a ativação localizada de Rac1 e Cdc42 promove a polimerização de actina e formação de protrusões (lamelipódios e filopódios), enquanto a ativação de RhoA na região posterior regula a contratilidade mediada por miosina e a desestabilização de adesões. Esta polarização bioquímica é reforçada por ciclos de feedback entre sensores mecânicos (como as integrinas) e reguladores de citoesqueleto, permitindo que a célula responda dinamicamente a sinais do ambiente<sup>5</sup>.

Diversos sinais espaciais podem direcionar a migração celular, incluindo gradientes solúveis (quimiotaxia) formados por moléculas sinalizadoras como quimiocinas, fatores de crescimento e citocinas; gradientes de matriz extracelular (haptotaxia) caracterizados pela distribuição diferencial de proteínas como fibronectina, laminina e colágenos; gradientes de rigidez (durotaxia) representados por variações na rigidez mecânica do substrato; e características topográficas (topografia de contato) evidenciadas pela presença de trilhas, sulcos ou outros elementos estruturais no substrato<sup>6,7</sup>. As células integram estes múltiplos sinais para determinar a direção e velocidade da migração, sendo que estudos recentes sugerem que diferentes linhagens celulares priorizam diferentemente estes sinais, e que células patológicas, como as tumorais, podem apresentar respostas significativamente alteradas a estes estímulos direcionais<sup>8,9</sup>.

Técnicas de micropatterning têm sido cada vez mais utilizadas para investigar a resposta celular a sinais espaciais controlados. Trabalhos pioneiros demonstraram que restrições geométricas influenciam o posicionamento do centróssomo, Golgi e orientação do eixo de migração<sup>10</sup>. Estudos subsequentes revelaram que a distribuição espacial de proteínas de matriz influencia a formação de protrusões e a dinâmica das adesões focais<sup>11</sup>. A tecnologia PRIMO, diferentemente de técnicas convencionais de micropatterning que requerem fotomáscaras físicas, utiliza fotoblação direcionada por laser, oferecendo maior flexibilidade no desenho experimental e permitindo a criação de padrões complexos em múltiplas etapas<sup>12</sup>.

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Investigar como a distribuição espacial de proteínas de matriz extracelular controla a polarização celular e direcionalidade durante a migração, utilizando a plataforma PRIMO para criar microambientes definidos com alta precisão espacial.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Desenvolver e caracterizar gradientes e padrões assimétricos de proteínas de matriz extracelular (fibronectina, laminina, colágeno tipo I) com parâmetros espaciais definidos utilizando a plataforma PRIMO;
- Analisar a polarização do citoesqueleto, distribuição de organelas e dinâmica de adesões focais em células expostas a distintas configurações de matriz;
- Comparar a resposta a gradientes de matriz extracelular entre células normais e tumorais (linhagens de câncer de mama com diferentes potenciais metastáticos);
- Investigar a integração de múltiplos sinais direcionais em células expostas simultaneamente a gradientes de proteínas de matriz e de rigidez do substrato;

### **4. Metodologia**

#### **3.1 Desenvolvimento de Microambientes Controlados via PRIMO**

Os substratos serão limpos, tratados com plasma de oxigênio e passivados com PLL-g-PEG para prevenir adesão celular não-específica. Utilizando a plataforma PRIMO, três tipos de padrões proteicos serão criados: gradientes lineares (5-50% variação/mm) de fibronectina, laminina ou colágeno tipo I; padrões geométricos assimétricos; e padrões compostos com múltiplas proteínas. Para experimentos com sinais mecânicos, hidrogéis de poli(acrilamida) com gradientes de rigidez (3-40 kPa) serão preparados. A validação será realizada com proteínas fluorescentes e microscopia confocal.

## **3.2 Estudo da Resposta Celular aos Microambientes Engenheirados**

### **3.2.1 Modelo Celular e Cultura**

Como modelos celulares, serão utilizados fibroblastos NIH/3T3, que representam um sistema estabelecido para estudos de interação célula-matriz e migração, além de duas linhagens de câncer de mama com distintos potenciais metastáticos: MCF-7 (baixo potencial invasivo, fenótipo epitelial) e MDA-MB-231 (alto potencial invasivo, fenótipo mesenquimal). Todas as linhagens serão cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidas em condições padrão de cultura (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, umidade controlada).

### **3.2.2 Análise de Polarização Celular**

A análise de polarização celular será realizada após fixação das células com paraformaldeído 4% e permeabilização com Triton X-100 0,1%, seguida de imunomarcação para visualização do citoesqueleto e organelas. Os microfilamentos de actina serão marcados com faloidina-TRITC, enquanto microtúbulos e filamentos intermediários serão visualizados usando anticorpos anti- $\alpha$ -tubulina e anti-vimentina, respectivamente. O posicionamento de organelas será analisado através da localização do centróssomo (anti- $\gamma$ -tubulina) e do complexo de Golgi (anti-GM130) em relação ao núcleo e à direção do gradiente. Adicionalmente, será realizada análise quantitativa da formação de protrusões celulares, incluindo lamelipódios e filopódios, avaliando seu número, comprimento e orientação em relação aos gradientes, permitindo determinar o grau e direção da polarização celular induzida pelos microambientes.

## **3.3 Comparação entre Células Normais e Patológicas**

Para comparação entre células normais e patológicas, será realizada análise morfológica comparativa entre fibroblastos NIH/3T3 e linhagens tumorais MCF-7 e MDA-MB-231, expostos a gradientes proteicos idênticos. A análise incluirá quantificação de parâmetros morfológicos, orientação do eixo principal e distribuição de estruturas citoesqueléticas em relação aos gradientes. Diferentes intensidades de gradientes serão testadas para determinar os limiares de detecção e resposta de cada tipo celular, avaliando a sensibilidade diferencial entre células. Além disso, será analisada a capacidade de adaptação morfológica frente a mudanças na orientação ou intensidade dos gradientes, verificando a resposta adaptativa das células a sinais espaciais variáveis. Para análise da integração de múltiplos sinais espaciais, serão desenvolvidos substratos com duplos gradientes, incluindo combinações de diferentes proteínas de matriz (fibronectina/laminina em orientações ortogonais) e gradientes proteína-rigidez (fibronectina vs. rigidez do hidrogel). Estes microambientes apresentarão configurações onde sinais espaciais atuam sinergisticamente (mesma direção) ou antagonisticamente (direções opostas), permitindo investigar como as células integram e priorizam diferentes tipos de informação espacial.

## **3.4 Análise de Dados**

O processamento de dados incluirá análise quantitativa da polarização celular com segmentação celular para extração de parâmetros morfológicos e avaliação da distribuição de marcadores específicos. Testes paramétricos e não-paramétricos serão utilizados conforme apropriado.

## 5. Cronograma de atividades

| Mês  | Atividades                                                                     |
|------|--------------------------------------------------------------------------------|
| 1-2  | - Treinamento na plataforma PRIMO e técnicas de micropatterning                |
|      | - Padronização de protocolos para funcionalização de substratos                |
|      | - Revisão de literatura e planejamento detalhado dos experimentos              |
| 3-4  | - Desenvolvimento e caracterização de gradientes lineares de fibronectina      |
|      | - Otimização dos parâmetros de fotoablação para diferentes proteínas de matriz |
|      | - Validação dos gradientes por microscopia confocal                            |
| 5-6  | - Desenvolvimento de padrões geométricos assimétricos e padrões compostos      |
|      | - Preparação de hidrogéis com gradientes de rigidez                            |
|      | - Cultivo e manutenção das linhagens celulares                                 |
| 7-8  | - Experimentos de polarização celular em fibroblastos NIH/3T3                  |
|      | - Imunomarcagem e análise do citoesqueleto e organelas                         |
|      | - Início do processamento e análise de imagens                                 |
| 9-10 | - Experimentos comparativos com linhagens MCF-7 e MDA-MB-231                   |
|      | - Análise de limiares de detecção de gradientes em diferentes linhagens        |
|      | - Desenvolvimento de substratos com duplos gradientes                          |
| 11   | - Experimentos de integração de múltiplos sinais espaciais                     |
|      | - Análise da hierarquia de sinais migratórios                                  |
|      | - Finalização da coleta de dados                                               |
| 12   | - Análise estatística dos resultados                                           |
|      | - Preparação de relatório final                                                |
|      | - Elaboração de manuscrito para publicação                                     |

## 6. Referências Bibliográficas

1. Ladoux, B. & Mège, R. M. Mechanobiology of collective cell behaviours. *Nat Rev Mol Cell Biol* **18**, 743–757 (2017).
2. Petrie, R. J. & Yamada, K. M. Multiple mechanisms of 3D migration: The origins of plasticity. *Current Opinion in Cell Biology* vol. 42 7–12 (2016).
3. Ridley, A. J. *et al.* Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* **302**, 1704–9 (2003).
4. Etienne-Manneville, S. Polarity proteins in migration and invasion. *Oncogene* vol. 27 6970–6980 (2008).
5. Shellard, A. & Mayor, R. Rules of collective migration: From the wildebeest to the neural crest: Rules of neural crest migration. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* vol. 375 (2020).
6. Friedl, P. & Alexander, S. Cancer invasion and the microenvironment: Plasticity and reciprocity. *Cell* vol. 147 992–1009 (2011).
7. Sunyer, R. *et al.* Collective cell durotaxis emerges from long-range intercellular force transmission. *Science* (1979) **353**, 1157–1161 (2016).
8. Wu, P. H., Giri, A., Sun, S. X. & Wirtz, D. Three-dimensional cell migration does not follow a random walk. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 3949–3954 (2014).
9. Mitrossilis, D. *et al.* Mechanotransductive cascade of Myo-II-dependent mesoderm and endoderm invaginations in embryo gastrulation. *Nat Commun* **8**, (2017).
10. Théry, M., Jiménez-Dalmaroni, A., Racine, V., Bornens, M. & Jülicher, F. Experimental and theoretical study of mitotic spindle orientation. *Nature* **447**, 493–496 (2007).
11. Mahmud, G. *et al.* Directing cell motions on micropatterned ratchets. *Nat Phys* **5**, 606–612 (2009).
12. Strale, P. O. *et al.* Multiprotein Printing by Light-Induced Molecular Adsorption. *Advanced Materials* **28**, 2024–2029 (2016).