

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

MATHEUS CORREIA CASOTTI

**Avaliação das Respostas ao Estresse Celular no Câncer do Sistema Nervoso Central
relacionadas à Variação de Ploidia**

VITÓRIA

2025

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

C341a Casotti, Matheus Correia, 1999-
Avaliação das Respostas ao Estresse Celular no Câncer do Sistema Nervoso Central relacionadas à Variação de Ploidia / Matheus Correia Casotti. - 2025.
(recurso não paginado). : il.

Orientador: Débora Dummer Meira.
Coorientador: Iúri Drumond Louro.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Carcinogênese. 2. Resistência à drogas. 3. Evolução (Biologia). 4. Citologia. 5. Patologia celular. I. Meira, Débora Dummer. II. Louro, Iúri Drumond. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Ata da 237ª sessão de Defesa de Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, do discente **Matheus Correia Casotti**, realizada às catorze horas do dia vinte e seis de fevereiro de dois mil e vinte e cinco. A sessão pública foi realizada em formato virtual, por videoconferência, no link <https://meet.google.com/tqm-evsc-afw>. A presidente da Banca, Profª Drª Débora Dummer Meira (orientadora), apresentou os demais membros da comissão examinadora constituída pelos Doutores: Iúri Drumond Louro (UFES), coorientador; Daniel Cláudio de Oliveira Gomes (UFES), examinador interno; Vivaldo Moura Neto (Instituto Estadual do Cérebro Paulo Niemeyer - IECPN), examinador externo. Em seguida, passou a palavra ao aluno que apresentou a sua proposta de dissertação intitulada **“Avaliação das Respostas ao Estresse Celular no Câncer do Sistema Nervoso Central relacionadas à Variação de Ploidia”**. Terminada a apresentação, a presidente retomou a palavra e a cedeu aos membros da Comissão Examinadora, um a um, para procederem à arguição. Em seguida, a presidente convidou a Comissão Examinadora a se reunir em separado para deliberação. Ao final, a Comissão Examinadora retornou e a presidente informou aos presentes que a Dissertação havia sido **APROVADA**. A Presidente, então, deu por encerrada a sessão, e lavrou a presente ata, que é assinada pelos membros da Comissão Examinadora. Vitória, 26 de fevereiro de 2025.

Débora Dummer Meira
 Universidade Federal do Espírito Santo – Orientador

Documento assinado digitalmente
 **DEBORA DUMMER MEIRA**
 Data: 26/02/2025 15:05:14 -0300
 Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Iúri Drumond Louro
 Universidade Federal do Espírito Santo – Coorientadora

Documento assinado digitalmente
 **IURI DRUMOND LOURO**
 Data: 12/03/2025 17:41:21 -0300
 Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Daniel Cláudio de Oliveira Gomes
 Universidade Federal do Espírito Santo - Examinador interno

Documento assinado digitalmente
 **DANIEL CLAUDIO DE OLIVEIRA GOMES**
 Data: 10/03/2025 21:49:59 -0300
 Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Vivaldo Moura Neto
 Instituto Estadual do Cérebro Paulo Niemeyer - IECPN - Examinador externo

Documento assinado digitalmente
 **VIVALDO MOURA NETO**
 Data: 12/03/2025 12:09:30 -0300
 Verifique em <https://validar.it.gov.br>



Avaliação das Respostas ao Estresse Celular no Câncer do Sistema Nervoso Central relacionadas à Variação de Ploidia

Dissertação/Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.
Apresentada em 26 de fevereiro de 2025.

Orientadora: Profa. Dra. Débora Dummer Meira

Coorientador: Prof. Dr. Iúri Drumond Louro

Vitória
2025

MATHEUS CORREIA CASOTTI

Avaliação das Respostas ao Estresse Celular no Câncer do Sistema Nervoso Central
relacionadas à Variação de Ploidia

Data da realização do exame: 26/02/2025

Banca examinadora:

Profa. Dra. Débora Dummer Meira (Orientadora)

Doutora em Biociências Nucleares pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Iúri Drumond Louro (Coorientador)

Doutor em Bioquímica e Genética Molecular pela University of Alabama

Prof. Dr. Daniel Cláudio de Oliveira Gomes (Membro Interno)

Doutor em Ciências Biológicas (Biofísica) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro e Harvard Medical School (Boston-USA)

Prof. Dr. Vivaldo Moura Neto (Membro Externo)

Doutor em Ciências pela Université Pierre et Marie Curie

Prof. Dr. Teodiano Freire Bastos Filho (Suplente Interno)

Doutor em Ciências Físicas (Electricidad y Electrónica) pela Universidad Complutense de Madrid

Profa. Dra. Gláucia Maria Machado-Santelli (Suplente Externo)

Doutora em Biologia/Genética pela Universidade de São Paulo

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho é o resultado de uma jornada intensa e desafiadora, que só foi possível graças ao apoio e à colaboração de muitas pessoas e instituições. A todos que, de alguma forma, contribuíram para a concretização desta dissertação, registro aqui minha mais sincera gratidão.

Ao NGHM, por ser mais do que um espaço de trabalho, foi um ambiente de aprendizado, crescimento e trocas valiosas. Agradeço especialmente aos colegas de laboratório que compartilharam ideias, incentivaram e ajudaram nos momentos mais difíceis, e aos meus orientadores (Dra. Débora D Meira, Dr. Lúri D. Louro e Dra. Flavia de Paula) pela paciência, orientação e confiança depositada em mim.

Aos hospitais colaboradores e suas equipes, com destaque ao Hospital Estadual Central junto à iNOVA Capixaba, pelo apoio essencial na obtenção de materiais e dados que possibilitaram o desenvolvimento deste estudo. Sua dedicação à ciência e à medicina foi uma inspiração constante.

À minha família, pelo amor incondicional, compreensão e apoio em todas as fases deste percurso. Vocês foram meu porto seguro nos momentos mais difíceis e a motivação para seguir adiante.

A Deus, por me conceder força, sabedoria e serenidade para superar os desafios enfrentados ao longo desta caminhada. Sem essa fé inabalável, este sonho não seria possível.

À banca de avaliação e da qualificação do mestrado, por aceitar o convite para contribuir com sua experiência e conhecimento, ajudando a elevar o nível deste trabalho com observações e sugestões valiosas.

Aos amigos (Aléxia, Karen, Isabele, Debora G., Felipe Mion, Vinícius, Giulia, João Augusto, Lorena Altoé, Lorena Mauricio, e outros) e colegas do laboratório, da pós-graduação e de fora da UFES, pela amizade, troca de ideias e suporte em todas as etapas da trajetória acadêmica e pessoal.

Por fim, agradeço a todas as pessoas e instituições (LAPAES - Ronny, Daizi, Dr. Cássio, etc; CEFAP/USP - Dr. Mario; iNOVA Capixaba - Dr. Leandro, Dra. Ana, Juliana, Brenda, e outros) que, de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização desta dissertação.

EPÍGRAFE

“What I cannot create, I do not understand”

Richard Feynman

“If you want to really understand about a tumor, you've got be be a tumor”

Barbara McClintock

“Cancer is a creative disorder”

Jekaterina Erenpreisa

CASOTTI, M.C. **Avaliação das Respostas ao Estresse Celular no Câncer do Sistema Nervoso Central relacionadas à Variação de Ploidia**. 2025. 166f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

Avaliação das Respostas ao Estresse Celular no Câncer do Sistema Nervoso Central relacionadas à Variação de Ploidia

Resumo

Dentre os cânceres mais incidentes, o do sistema nervoso central (CSNC) é a décima segunda, representando, 11.490 novos casos estimados anualmente no Brasil. Muitos obstáculos impedem o sucesso dos cuidados oncológicos no CSNC, como a complexa relação da instabilidade genômica e cromossômica frente à indução de resistência tumoral e metástases. Neste contexto, investigou-se como a variação de ploidia afeta a resposta tumoral, especialmente em gliomas, com ênfase nas células poliploides/multinucleadas cancerígenas gigantes (*PGCCs/MNGCs*). Para tanto, o objetivo principal foi elucidar os mecanismos de estresse terapêutico que favorecem a plasticidade tumoral e identificar biomarcadores prognósticos potenciais, utilizando uma abordagem integrada de biologia computacional ao estudo translacional por patologia digital. Para tal proposta, incluíram-se análises *in silico* de redes de interação proteína-proteína usando ferramentas como *STRING* e *Cytoscape* (realizando avaliações topológica e funcionais por meio dos aplicativos *MCODE*, *stringApp* e *Cytohubba*), ensaios *in vitro* com células U87 tratadas com temozolomida (feito por meio de um rastreamento de célula única com análises de biomagens microscópicas) e estudo translacional de amostras histológicas obtidas de pacientes com tumores do sistema nervoso central do Hospital Estadual Central/iNOVACapixaba, sendo analisadas pelo programa *QuPath*. Os resultados destacaram principais biomarcadores identificados pelas vias de sinalização como EGFR/RAS/MAPK, PI3K/mTOR e STAT3, sustentando resiliência metabólica e invasividade das *PGCCs/MNGCs*. Além disso, mutações em IDH, alterações no metabolismo lipídico e glicólise aeróbica, autofagia, proteínas como cofilina, fascin-1 e

tropomiosinas, instabilidade genômica e os transportadores ABC apontaram impacto sobre quimiorresistência e progressão tumoral. Para histomorfometria evidenciaram a distribuição de células com núcleos gigantes em diferentes subtipos tumorais, com predomínio em Metástase/Invasão (31%), Meningioma Grau I (28%) e Schwannoma (27%). Foi constatada baixa prevalência de núcleos gigantes em tumores como Ependimoma Grau II (7%) e GB/Astrocitoma Grau IV (3%), reforçando a heterogeneidade morfológica já descrita na literatura. E a estatística indicou normalidade nos valores de área ($p=0.759$) e homogeneidade das variâncias ($p=0.367$), enquanto o Teste de ANOVA revelou diferenças significativas na área entre os grupos tumorais ($p=0.032$), com destaque para a diferença estatisticamente significativa entre GB/Astrocitoma Grau IV e Metástase/Invasão, validada pelo Teste de Tukey HSD ($p=0.017$). E tendo Schwannoma com alta variabilidade na área nuclear ($CV=12,92\%$), indicando diversidade estrutural. Assim, confirmaram-se possíveis correlações entre variação de ploidia e progressão tumoral, além de identificá-las como potenciais biomarcadores para prognósticos ou fatores prognósticos mais precisos. Concluiu-se que a integração de métodos computacionais, laboratoriais e análises histológicas permite avançar na personalização de terapias antitumorais, reforçando a importância de estratégias adaptativas no manejo de CSNC, em especial aos gliomas. Este trabalho contribui significativamente para a biotecnologia e abre perspectivas para novas abordagens terapêuticas baseadas na dinâmica de *PGCCs/MNGCs*. Ademais, proporcionou um avanço profissional perante às diversas produções, sendo elas: bibliográficas (71 no total), técnicas e de extensão (4 cursos ministrados), eventos (7, sendo 3 internacionais - Espanha, NASA/EUA, Houston/EUA) e estágio técnico-científico (Portugal - Financiamento pela FAPES).

CASOTTI, M.C. **Evaluation of Cellular Stress Responses in Central Nervous System Cancer Related to Ploidy Variation**. 2025. 166f. Dissertation (Master in Biotechnology) - Postgraduation Biotechnological Programme, UFES, Espírito Santo. Brazil.

Evaluation of Cellular Stress Responses in Central Nervous System Cancer Related to Ploidy Variation

Abstract

Among the most common cancers, central nervous system cancer (CNSC) ranks twelfth, representing an estimated 11,490 new cases annually in Brazil. Many obstacles hinder successful oncology care for CNSC, including the complex relationship between genomic and chromosomal instability in driving tumor resistance and metastasis. In this context, this study investigated how ploidy variation affects tumor response, particularly in gliomas, with a focus on polyploid/multinucleated giant cancer cells (*PGCCs/MNGCs*). The main objective was to elucidate therapeutic stress mechanisms that promote tumor plasticity and to identify potential prognostic biomarkers through an integrated approach combining computational biology and translational studies with digital pathology. This approach included *in silico* analyses of protein-protein interaction networks using tools like STRING and Cytoscape (performing topological and functional evaluations via MCODE, stringApp, and Cytohubba), *in vitro* assays with U87 cells treated with temozolomide (conducted through single-cell tracking and microscopic image analyses), and a translational study of histological samples from CNS tumor patients at the Central State Hospital/iNOVACapixaba, analyzed using the QuPath program. The results highlighted key biomarkers identified through signaling pathways such as EGFR/RAS/MAPK, PI3K/mTOR, and STAT3, supporting the metabolic resilience and invasiveness of *PGCCs/MNGCs*. Additionally, IDH mutations, lipid metabolism alterations, aerobic glycolysis, autophagy, proteins such as cofilin, fascin-1, and tropomyosins, genomic instability, and ABC transporters were shown to impact chemoresistance and tumor progression. Histomorphometric analysis revealed the distribution of giant nuclei cells

across different tumor subtypes, with a predominance in Metastasis/Invasion (31%), Grade I Meningioma (28%), and Schwannoma (27%). A lower prevalence of giant nuclei was observed in tumors such as Grade II Ependymoma (7%) and GB/Grade IV Astrocytoma (3%), reinforcing the morphological heterogeneity described in the literature. Statistical analysis indicated normality in area values ($p=0.759$) and homogeneity of variances ($p=0.367$), while ANOVA testing revealed significant differences in area among tumor groups ($p=0.032$), notably between GB/Grade IV Astrocytoma and Metastasis/Invasion, validated by the Tukey HSD test ($p=0.017$). Schwannoma displayed high variability in nuclear area ($CV=12.92\%$), indicating structural diversity. These findings confirmed potential correlations between ploidy variation and tumor progression, identifying them as potential prognostic biomarkers or tools for more precise prognostic assessments. It was concluded that integrating computational, laboratory, and histological analyses allows significant advancements in personalized antitumor therapies, emphasizing the importance of adaptive strategies in managing CNSC, especially gliomas. This work contributes significantly to biotechnology and opens new therapeutic avenues based on *PGCCs/MNGCs* dynamics. Additionally, it marked a professional advancement with diverse outputs, including publications (71 in total), technical and extension contributions (4 courses taught), events (7, including 3 international ones—Spain, NASA/USA, Houston/USA), and a technical-scientific internship (Portugal, funded by FAPES).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|-----|
| Figura 1. Rede de Interação Proteína-Proteína Principal acerca das <i>PGCCs/MNGCs</i> | 84 |
| Figura 2. Módulos (<i>Clusters</i>) da Rede de <i>PGCCs/MNGCs</i> | 85 |
| Figura 3. Rede de Interação Proteína-Proteína Principal acerca do GB..... | 86 |
| Figura 4. Módulos (<i>Clusters</i>) da Rede de Interação Proteína-Proteína Principal referente ao GB..... | 87 |
| Figura 5. Compilado Teórico-Computacional acerca das Relações <i>PGCCs/MNGCs</i> com GB..... | 114 |
| Figura 6. Fenótipos da Linhagem U87 submetida a DMSO..... | 116 |
| Figura 7. Fenótipos da Linhagem U87 submetida a TMZ..... | 117 |
| Figura 8. Imagens de microscopia utilizadas para análises morfológicas e funcionais..... | 120 |
| Figura 9. Exemplo de Segmentação de Imagem da Lâmina Digitalizada do Paciente 8754 (Schwannoma)..... | 130 |
| Figura 10. Exemplos de diferentes Subtipos Tumorais Segmentados..... | 131 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 1. Relação da curadoria manual diante dos bancos de dados e número de artigos..... | 82 |
| Tabela 2. Organização entre artigos repetidos e não repetidos e totalidade..... | 83 |
| Tabela 3. Critérios de seleção de artigos para busca de proteínas..... | 83 |
| Tabela 4. Parâmetros Topológicos da Rede de Interação Proteína-Proteína Principal..... | 84 |
| Tabela 5. Parâmetros Topológicos da Rede de Interação Proteína-Proteína Principal de GB..... | 86 |
| Tabela 6. Avaliação Funcional da Rede Principal para <i>PGCCs/MNGCs</i> | 88 |
| Tabela 7. Avaliação Funcional dos clusters/módulos para a Rede de <i>PGCCs/MNGCs</i> | 88 |
| Tabela 8. Avaliação Funcional da Rede Principal para GB..... | 103 |
| Tabela 9. Avaliação Funcional dos clusters/módulos para a Rede de GB..... | 105 |
| Tabela 10. Características Classificatórias Gerais dos Subtipos Tumoriais Analisados..... | 127 |
| Tabela 11. Média Geral de Área e Perímetro dos Subtipos Tumoriais calculadas por Média Ponderada..... | 132 |
| Tabela 12. Média de Área e Perímetro dos Subtipos Tumoriais com Desvio- | |

Padrão.....133

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 53BP1: Proteína de Ligação ao DNA associada a Quebras Duplas (do inglês *tumor protein p53 binding protein 1*)
- ABC: Transportadores de Cassete de Ligação ao ATP (do inglês *ATP-Binding Cassette*)
- AI: Astrocitoma Grau I
- AI: Astrocitoma Grau II
- AIII: Astrocitoma Grau III
- AIV/GB: GB/Astrocitoma Grau IV
- AMPK: Proteína Quinase Ativada por AMP (do inglês *AMP-activated Protein Kinase*)
- ATM: Ataxia Telangiectasia Mutada (do inglês *Ataxia Telangiectasia Mutated*)
- ATP: Trifosfato de Adenosina (do inglês *Adenosine triphosphate*)
- ATPase: Enzima Adenosina Trifosfatase (do inglês *Adenosine Triphosphatases*)
- ATR: Proteína Quinase Relacionada à Ataxia Telangiectasia e Rad3 (do inglês *Ataxia telangiectasia mutated and Rad3 Related*)
- BBB: Barreira Hematoencefálica (do inglês *Blood-Brain Barrier*)
- CD44: Cluster de variantes do gene de diferenciação 44 (do inglês *Cluster of Differentiation 44 protein*)
- CDK: Quinase Dependente de Ciclina (do inglês *Cyclin-Dependent Kinase*)
- CEP: Comitê de Ética em Pesquisa
- CNS/SNC: Sistema Nervoso Central (do inglês *Central Nervous System*)
- CSK: Citoesqueleto (do inglês *Cytoskeleton*)
- CT: Tomografia Computadorizada (do inglês *Computed Tomography*)
- DAPI: 4',6-Diamidino-2-Fenilindol (do inglês Corante Fluorescente de DNA)
- DDR: Sistema de Reparo de Danos ao DNA (do inglês *DNA Damage Response*)
- DMSO: Dimetilsulfóxido (do inglês *Dimethyl sulfoxide*)
- DNA: Ácido Desoxirribonucleico (do inglês *Deoxyribonucleic Acid*)
- DTPCs: Células Tumorais Persistentes Tolerantes a Fármacos (do inglês *Drug-Tolerant and Persistent Tumor Cells*)
- EDTA: Ácido Etilenodiaminotetraacético (do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*)
- EGFR: Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (do inglês *Epidermal Growth*

Factor Receptor)

EGFRvIII: Variante Mutada do EGFR (do inglês *Epidermal Growth Factor Receptor Variant III*)

EMT: Transição Epitelial-Mesenquimal (do inglês *Epithelial-Mesenchymal Transition*)

EP: Ependimoma Grau II

EVs: Vesículas Extracelulares (do inglês *Extracellular vesicles*)

FACS: Classificação Celular por Fluorescência (do inglês *Fluorescence-Activated Cell Sorting*)

FUCCI: Indicador Fluorescente de Ciclo Celular Baseado em Ubiquitinação (do inglês *Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator*)

G2-M: Transição da Fase G2 para M

GB: Glioblastoma/Glioblastoma Multiforme

G-CIMP: Fenótipo de Metilação da Ilha CpG no Glioma (do inglês *Glioma CpG island methylator phenotype*)

GLUT: Transportador de Glicose (do inglês *Glucose Transporter*)

GO: Ontologia de Genes (do inglês *Gene Ontology*)

GSCs: Células-Tronco Glioma (do inglês *Glioma Stem Cells*)

H&E: Hematoxilina e Eosina (técnica de coloração histológica)

HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica

HEC: Hospital Estadual Central

HIFs: Fatores Induzidos por Hipóxia (do inglês *Hypoxia-Inducible Factors*)

HSRC: Hospital Santa Rita de Cássia

HUCAM: Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes

IDH: Isocitrato Desidrogenase (do inglês *Isocitrate dehydrogenase*)

IF: Imunofluorescência

IL-6: Interleucina 6 (do inglês *Interleukin 6*)

iNOVACapixaba: Instituto de Inovação Capixaba

JAK/STAT: Vias de Sinalização Relacionadas a Transdução de Sinais Celulares (do inglês *JAK-STAT signaling pathway*)

KEGG: Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (do inglês *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*)

LC3: Cadeia Leve 3 Associada a Proteína Microtúbulo 1 (do inglês *Microtubule-associated protein 1 light chain 3*)

LCR: Líquido Cefalorraquidiano

M: Meningioma Grau I

MCODE: Algoritmo de Análise de Clusters em Redes (não traduzido formalmente, mas descrito como plug-in no software Cytoscape)

MDM2: Homólogo do minuto duplo 2 do camundongo (do inglês *Murine Double Minute 2*)

MDR: Resistência Múltipla a Drogas (do inglês *Multidrug Resistance*)

MEC: Matriz Extracelular

MEK: Quinase de Sinal Extracelular Regulada por Mitógeno (do inglês *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase*)

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

MMPs: Metaloproteinases de Matriz (do inglês *Matrix Metalloproteinases*)

MNGCs: Células Cancerígenas Multinucleadas Gigantes (do inglês *Multinucleated Giant Cancer Cells*)

MRI: Imagem por Ressonância Magnética (do inglês *Magnetic Resonance Imaging*)

MS: Mesenquimal

MT: Metástase/Invasão

mTOR: Alvo da Rapamicina em Mamíferos (do inglês *Mammalian Target of Rapamycin*)

N/C: Relação Núcleo-Citoplasma

NADPH: Coenzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (do inglês *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

NB: Neuroblastoma

NE: Neuroendócrino

NFκB: Fator Nuclear Kappa B (do inglês *Factor Nuclear Kappa B*)

NGS: Sequenciamento de Nova Geração (do inglês *Next Generation Sequencing*)

NMDARs: Receptores N-Metil-D-Aspartato (do inglês *N-methyl-D-aspartate receptor*)

OD: Densidade Óptica (do inglês *Optical Density*)

OMS: Organização Mundial da Saúde

PAMs: Macrófagos Associados a Tumores (do inglês *Tumor-Associated Macrophages*)

PBS: Solução Salina Tamponada com Fosfato (do inglês *Phosphate-Buffered Saline*)

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)

PDGF: Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (do inglês *Platelet-Derived Growth Factor*)

PGCCs: Células Cancerígenas Poliploides Gigantes (do inglês *Polyploid Giant Cancer Cells*)

PI3K/Akt/mTOR: Vias de Sinalização Relacionadas ao Metabolismo e Crescimento Celular (do inglês *PI3K/AKT/mTOR pathway*)

PI3K: Fosfatidilinositol-3-Quinase (do inglês *Phosphoinositide 3-kinase*)

PIPs: Fosfatidilinositolfosfatos (do inglês *Phosphatidylinositol-4-phosphate*)

PKC: Proteína Kinase C (do inglês *Protein Kinase C*)

PPIN: Rede de Interação Proteína-Proteína (do inglês *Protein-Protein Interaction Network*)

RAD51: Proteína 51 Sensível à Radiação (do inglês *RADiation sensitive protein 51*)

RAS: Proteína Rat Sarcoma (do inglês *Rat Sarcoma Virus*)

RB: Retinoblastoma

RGB: Modelo de Cores (do inglês *Red, Green, Blue*)

RNA: Ácido Ribonucleico (do inglês *Ribonucleic Acid*)

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês *Reactive Oxygen Species*)

RT: Transcrição Reversa (do inglês *Reverse Transcription*)

RTKs: Receptores de Tirosina Quinase (do inglês *Receptor Tyrosine Kinases*)

S: Schwannoma

SASP: Fenótipo Secretor Associado à Senescência (do inglês *Senescence-Associated Secretory Phenotype*)

SG2M: Fase do Ciclo Celular S (síntese), G2 (pré-mitose) e M (mitose)

SMADs: Família de Proteínas de Sinalização Intracelular Reguladas pelo TGF- β (do inglês *TGF- β -Regulated Intracellular Signaling Protein Family*)

STAT-3: Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 3 (do inglês *Signal transducer and activator of transcription 3*)

STRING: Banco de Dados para Análise de Redes de Interação Proteína-Proteína

TGF- β : Fator de Crescimento Transformador Beta (do inglês *Transforming Growth Factor Beta*)

TMZ: Temozolomida

TP53: Proteína Tumoral p53 (do inglês *Gene Tumor Protein p53*)

VEGF: Fator de Crescimento Endotelial Vascular (do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*)

VEGFA: Fator de Crescimento Endotelial Vascular A (do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor A*)

VEGFR2: Receptor 2 do VEGFA (do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*)

WNT: Vias de Sinalização Wnt (do inglês *Wnt signaling pathways*)

ZEB1: ZEB1 dedo de zinco E-box ligando homeobox 1 (do inglês *Zinc Finger E-box-binding Homeobox 1*)

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| 1 INTRODUÇÃO | 22 |
| 1.1 Problema de Pesquisa e Justificativa | 22 |
| 1.2 Estrutura da Dissertação | 23 |
| 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 26 |
| 2.1 Oncologia Holística | 26 |
| 2.2 Respostas ao Estresse no Câncer | 27 |
| 2.3 Câncer do Sistema Nervoso Central | 28 |
| 2.4 Análise de Imagens | 28 |
| 2.5 Histomorfometria | 29 |
| 3 OBJETIVOS | 33 |
| 3.1 Objetivo Geral | 33 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 33 |
| 4 METODOLOGIA | 34 |
| 4.1 Estudo <i>in silico</i> | 34 |
| 4.2 Estudo <i>in vitro</i> (<i>Live cell imaging</i> – Incucyte) | 35 |
| 4.3 Estudo Translacional | 36 |
| 4.4 Análise Estatística | 37 |
| 5 ARTIGO 1 | 39 |
| 6 ARTIGO 2 | 56 |
| 7 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 82 |
| 7.1 Curadoria Manual e Extração de Dados do BioGrid | 82 |
| 7.2 Rede de Interação Proteica para <i>PGCCs/MNGCs</i> e GB | 83 |
| 7.3 Análise Funcional da Rede Principal e Módulos/Clusters da referente às <i>PGCCs/MNGCs</i> | 88 |
| 7.5 Análise Funcional da Rede Principal e Módulos/Clusters acerca do GB .. | 102 |
| 7.6 Resumo da Etapa <i>in silico</i> | 113 |
| 7.7 Interpretação Funcional e Morfométrica do Rastreamento de Célula Única <i>in vitro</i> | 116 |
| 7.8 Resumo da Etapa <i>in vitro</i> | 122 |

| | |
|---|-----|
| 7.9 Estudo Translacional | 124 |
| 8 CONCLUSÕES | 136 |
| 9 DESAFIOS, LIMITAÇÕES E SUPERAÇÕES DO ESTUDO | 138 |
| 10 PERSPECTIVAS FUTURAS | 140 |
| REFERÊNCIAS | 142 |
| APÊNDICES | 163 |

1 INTRODUÇÃO

O presente trabalho aborda o desafio de compreender os mecanismos adaptativos atrelados à Variação de Ploidia do Câncer do Sistema Nervoso Central (CNSC) frente ao estresse terapêutico, com destaque para os Gliomas, incluindo Glioblastoma (GB), por meio de uma estratégia de patologia digital. O GB apresenta complexidade biológica elevada, associada a uma plasticidade celular que possibilita a formação de subpopulações resistentes, como as células poliploides/multinucleadas cancerígenas gigantes (*Polyploid/Multinucleated Giant Cancer Cells*, *PGCCs/MNGCs*) e as células tumorais persistentes tolerantes à fármacos (*Drug-Tolerant Persister Cancer Cells*, *DTPCs*). A compreensão desses mecanismos juntamente com uma estratégia metodológica computacional, compila a velocidade com a complexidade, isto porque possibilita o avanço no diagnóstico e prognóstico prévios adaptados à progressão evolutiva do tumor em um microambiente estressado. Dentro deste contexto, este trabalho procura contribuir na área de patologia oncológica digital ao investigar a relação entre estresse terapêutico, plasticidade morfológica e progressão tumoral em Gliomas, com enfoque em *PGCCs/MNGCs* como potenciais fatores prognósticos.

1.1 Problema de Pesquisa e Justificativa

O Câncer do Sistema Nervoso Central, especialmente os Gliomas, apresenta alta taxa de recorrência e resistência terapêutica. Estes problemas compõe a complexidade dinâmica inata dos tumores e resultam em impacto clínico das respostas adaptativas, que frequentemente levam à falha terapêutica. Apesar dos avanços no tratamento, questões fundamentais permanecem em aberto: 1) As células tumorais realmente morrem após o tratamento anticâncer? 2) Como os gliomas modulam adaptativamente o estresse terapêutico e superam o desbalanço caótico de sua estrutura? 3) Quais são os mecanismos subjacentes às respostas terapêuticas e à heterogeneidade tumoral nos gliomas? 4) Quais os processos adaptativos acessados pelos tumores (inicialmente em gliomas) em diferentes momentos ecológicos e evolutivos? 5) As *PGCCs/MNGCs* podem ser utilizadas como fatores prognósticos confiáveis?

Por meio de tais questionamentos, a proposta deste trabalho é funcionar como um estudo holístico piloto para a verificação da importância funcional da variação de ploidia frente ao desfecho translacional analisada de forma *in silico* e *in vitro*, com enfoque na caracterização e potencial prognóstico de subpopulações celulares específicas, como *PGCCs/MNGCs*. A hipótese testada pretendida foi: As *PGCCs/MNGCs* funcionam como potenciais fatores prognósticos em Gliomas devido à sua capacidade de modular novos desfechos clínicos complexos e agressivos.

No que tange ao escopo e justificativa, tendo em vista o enfoque quanto à formação e papel prognóstico/diagnóstico das *PGCCs/MNGCs*, a identificação de biomarcadores e a investigação de alterações biofísicas e morfológicas associadas à resistência terapêutica, a justificativa deste trabalho se dá pela aplicação translacional de metodologias *in silico* e *in vitro* com análises de imagem de lâminas patológicas com base em princípios de patologia digital para a personalização direcionada e menos temporalmente custosa quanto ao acompanhamento da evolução da agressividade de gliomas, inserindo relevância clínica (Pelo fato de Gliomas serem extremamente letais, com tratamentos limitados e alta resistência terapêutica), complexidade biológica (Pelo fato de que a plasticidade celular e formação de *PGCCs/MNGCs* representam desafios para a oncologia moderna e computacional vigente), aplicabilidade (Pela possibilidade de identificar novos biomarcadores/fatores pronósticos) e viabilidade (Pelo uso de tecnologias computacionais acessíveis capazes de serem inseridas no setor patológico adicionando velocidade ao diagnóstico e prognóstico direcionado).

1.2 Estrutura da Dissertação

Esta dissertação está organizada em 9 tópicos inter-relacionados após à Introdução, permitindo uma compreensão sequencial e articulada dos tópicos abordados.

O Tópico 1, Fundamentação Teórica, apresenta a contextualização necessária para a compreensão do tema proposto. Nela foram abordados conceitos e estudos prévios relevantes que sustentam os temas discutidos nos capítulos subsequentes.

O Tópico 2, expõe os objetivos pretendidos por essa dissertação, assim como os objetivos específicos que possam compor o objetivo principal do estudo.

O Tópico 3, expõe a metodologia aplicada para alcançar os objetivos propostos para responder a pergunta norteadora principal desta dissertação.

O Tópico 4, expõe o primeiro artigo autoral norteador para esta pesquisa, intitulado "Computational Biology Helps Understand How Polyploid Giant Cancer Cells Drive Tumor Success", o qual explora como ferramentas computacionais contribuem para a compreensão do papel de células gigantes cancerígenas poliploides no sucesso tumoral. Este artigo inclui uma seção final de considerações, onde são discutidos os resultados apresentados e sua ligação com o próximo capítulo.

O Tópico 5, expõe o segundo artigo autoral norteador para esta pesquisa, intitulado "Integrating Frontiers: A Holistic, Quantum and Evolutionary Approach to Conquering Cancer through Systems Biology and Multidisciplinary Synergy", o qual propõe uma abordagem interdisciplinar que une biologia de sistemas, evolução e física quântica no enfrentamento do câncer. A seção final deste artigo conecta os resultados obtidos à proposta geral da dissertação, consolidando as bases para as conclusões.

O Tópico 6, Resultados e Discussão, detalha os resultados alcançados por meio dos referidos métodos, técnicas e ferramentas utilizados e correlaciona com dados de diversos autores em uma discussão que visa alcançar os objetivos propostos.

O Tópico 7, Conclusões, apresenta uma síntese dos resultados alcançados, correlacionando-os aos objetivos iniciais. São discutidas as contribuições científicas, as limitações identificadas e as possíveis linhas de continuidade para pesquisas futuras.

O Tópico 8, Desafios, Limitações e Superações do Estudo, apresenta uma síntese das dificuldades e estratégias utilizadas para o desenvolvimento deste estudo.

O Tópico 9, Perspectivas futura, apresenta uma proposição de novidades pretendidas para a continuação dos estudos integrados com base em diversos autores, mas também o que se prevê para ser desenvolvido por meio deste estudo.

Por fim, os Apêndices incluem informações complementares, como o protocolo de busca e análise dos trabalhos correlatos, e outros materiais de suporte que contribuíram para a execução e validação desta dissertação.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Oncologia Holística

A complexidade paradoxal em série do câncer permeia suas respostas e adaptações contínuas frente à resistência terapêutica (Erenpreisa *et al.* 2022a). Nesse compilado de paradoxos, a morfologia nuclear e celular são considerados critérios para diferenciar um tumor maligno de um benigno, sendo uma das marcas de agressividade do tumor, principalmente por causa das células cancerígenas poliploides/multinucleadas gigantes (*Polyploid/Multinucleated Giant Cancer Cells, PGCCs/MNGCs*), que produzem uma progênie aneuploide resistente, por meio de mecanismos comuns e outros incomuns (Erenpreisa *et al.* 2022a; Liu *et al.* 2022; Sikora *et al.* 2022).

As *PGCCs/MNGCs* estão atreladas à capacidade de desdiferenciar parcial ou completamente as células somáticas para a geração de multilinhagens (Liu *et al.* 2022). Mas, em paralelo, algumas células podem entrar em dormência ou obter características de células-tronco (Fei *et al.* 2015; Mirzayans e Murray 2023; Jiao *et al.* 2024). E outro destaque se volta às similaridades do ciclo vicioso tumoral com o ciclo de vida de amebozoários, metazoários e fungos ancestrais (sistema de células unicelulares) seguindo uma rede genética evolutiva do câncer (Niculescu 2023).

Diante disto, observa-se que o câncer exhibe uma exploração adaptativa de redes reguladoras de genes ao longo da árvore filogenética, mas sempre permeando o limite da ordem e do caos, onde o destino celular é regido por uma plasticidade oscilatória entre reguladores de senescência celular, reprogramação e de estados atratores, fornecendo um caminho para operar a auto-organização, entropia, termodinâmica e quântica (Huang *et al.* 2009; Erenpreisa *et al.* 2022a). Dessa maneira, verifica-se que a poliploidia fornece uma ponte de acesso ao estado “atrator oncofetal” filogeneticamente pré-programado, características unicelulares e a desseleção de variantes inadequadas de “ciclos destrutivos” indutores de instabilidade quanto fonte de diversidade/heterogeneidade (Larsson *et al.* 2007; Larsson *et al.* 2008; Huang *et al.* 2009; Bauer *et al.* 2022; Demin *et al.* 2022; Erenpreisa *et al.* 2022a; Saini *et al.* 2022).

À vista disso, elucidar e analisar *PGCCs/MNGCs* se torna crucial para pesquisas

ômicas, holísticas, individualizadas e capazes de desenvolver e identificar biomarcadores e terapias adaptativas. E em paralelo, poder-se-á formalizar um consenso entre a comunidade científica e clínica em relação à terminologia e características dessas subpopulações, assim como, a sua importância para estudar a biologia do câncer, somando-se perspectivas citológicas, histológicas, morfo-/histomorfométricas e biologia de célula única (Nijman 2020).

2.2 Respostas ao Estresse no Câncer

As respostas ao estresse celular são conservadas evolutivamente e garantem a perpetuação da célula (Fulda *et al.* 2010). Assim, perturbações prolongadas ou severas da homeostase fora de controle culminam na indução de mecanismos adaptativos, reversíveis ou não, sendo conectados com uma rede complexa de sinais que conectam células individuais ao tecido e todo o organismo (Galluzzi *et al.* 2018). Nesse sentido, ao comparar com o câncer, observa-se que a doença destacada a não retomada de um sistema homeostático. Assim, proporciona novos caminhos associados a erros ou falhas no reparo de danos, perpetuação de defeitos herdados ou adquiridos levando a mutações, promovendo a progressão e resistência ao tratamento do câncer e à sua extinção (Fulda *et al.* 2010; Casotti *et al.* 2023).

Para além do estresse originando câncer, o desbalanço do equilíbrio também evidencia e sustenta a origem de outras aberrações mais proeminentes, como a variação de ploidia/aneuploidia (quantidade de material genético), como uma resposta aos estresses. Isto porque, a aneuploidia (número cromossomal anormal) representa não um único estado genético, mas um grande repertório de diversos estados que proporcionam a base adaptativa à sobrevivência do tumor como um sistema unicelular e multicelular seguindo estratégias adaptativas (Zhu *et al.* 2018).

Com base nessas estratégias, inovações são adquiridas quanto à capacidade de responder a estímulos e direcionar a múltiplos destinos celulares. Dessa forma, é crucial a compreensão dos mecanismos moleculares que interferem nas respostas celulares aos estresses, possibilitando novos insights sobre a base mecanicista e perspectivas para o desenvolvimento de abordagens de tratamento direcionadas,

personalizadas e evolutivas (Fulda *et al.* 2010; Zhu *et al.* 2018).

2.3 Câncer do Sistema Nervoso Central

Dentre os tumores mais incidentes, o do sistema nervoso central se localiza na décima segunda posição, representando, 11.490 novos casos estimados anualmente no Brasil (INCA, 2022). Muitos obstáculos impedem o sucesso dos cuidados oncológicos globais, como o acesso a cuidados de saúde, serviços a preços acessíveis, disponibilidade de tratamento convencional ou de novas terapias contra a resistência tumoral e avanços metastáticos (Soerjomataram & Bray 2021; Mao *et al.* 2022; Pramesh *et al.* 2022).

O câncer do sistema nervoso central (CSNC) exhibe uma conversa cruzada sobre a regulação da própria evolução do tumor (Mancusi & Monje 2023; Winkler *et al.* 2023). Isto porque, comunicações parácrinas e eletroquímicas diretas entre neurônios e células cancerígenas, bem como interações indiretas através de efeitos neurais no sistema imunológico e nas células estromais no microambiente tumoral, proporcionam um “kit de sobrevivência” crítico contra à extinção do câncer do CSNC (Mancusi & Monje 2023; Winkler *et al.* 2023).

2.4 Análise de Imagens

A morfologia traduz respostas no câncer, o que fornece um importante pilar de diagnóstico oncológico, ao se seguir critérios confiáveis e altamente elucidativos (Girdhar *et al.* 2023). Dentre inúmeras técnicas, a morfometria ou histomorfometria é uma estratégia objetiva para fornecer uma gradação citológica e histológica do tumor e informar o tipo de neoplasia suspeitada, o que fornece consequências importantes em termos de estadiamento, prognóstico e terapêutica (Giuliano & Nudds. 2013).

Ademais, permitiu conectar com novas fronteiras da área patológica, como no caso da inclusão da patologia digital (sendo a utilização de um computador para visualizar imagens histopatológicas no formato *Whole-Slide Imaging*), morfometria de próxima geração e “patômica” juntamente com a inteligência artificial (para “reconhecimento de padrões” e técnicas de “aprendizagem profunda”) proporcionando precisão, reprodutibilidade e padronização superiores em pesquisas baseadas na morfologia

microscópica (Abel *et al.* 2023; Hölscher *et al.* 2023; Moscalu *et al.* 2023). Além disso, proporciona um baixo custo e alta acessibilidade quanto uma abordagem metodológica para diversos laboratórios (Baak *et al.* 1985).

Em complemento, a morfometria ou histomorfometria acrescenta uma valorização acerca do entendimento das respostas celulares do tumor, principalmente quando são considerados os tumores sólidos (como o CSNC). Isto porque, muitas alterações são observadas no envelope nuclear e no conjunto de material genético, isso por serem mudanças clássicas associadas à instabilidade cromossômica, presença de micronúcleos, cromotripse, inclusões citoplasmáticas intranucleares, aumento da proporção entre o volume nuclear e citoplasmático e dentre outras características (Dey *et al.* 2010; Fischer 2014).

Por consequência, novidades são estruturadas frente ao rastreamento da biologia de célula única, traduzindo-se os perfis celulares da população heterogênea do tumor, estruturando melhores propostas pré-clínicas e clínicas (Errington *et al.* 2013; Hilsenbeck *et al.* 2016; Kashyap *et al.* 2022; Chen *et al.* 2023). Ademais, um caminho vem sendo desbravado com essas análises mais específicas, sendo o entendimento da complexidade de sistemas biológicos dinâmicos, como o câncer e seus mecanismos subjacentes aos comportamentos celulares básicos, como proliferação, morte, diferenciação, migração e resistência (Begnini *et al.* 2022).

2.5 Histomorfometria

À vista dos dados epidemiológicos e o importante papel das *PGCCs/MNGCs*, observam-se destaques importantes quanto às particularidades morfológicas das células do CSNC provenientes de relações mecanísticas integradas, tais como: a) relações entre progênie agressiva relacionada com autofagia funcional (Bojko *et al.* 2020); b) escape da senescência e indução de poliploidização integrando com o importante papel do estresse oxidativo (Kaur *et al.* 2015; Mosieniak *et al.* 2015); c) tetraploidia como condição permissiva à aneuploidia, tendo o microambiente tumoral como auxiliador para conquistar novos nichos (Andor *et al.* 2022); d), importância do ciclo celular lento e diversidade celular (Alhaddad *et al.* 2023); e) função do citoesqueleto frente ao aparecimento de duplicação do genoma tumoral (Mercapide

& Lorico 2014); e, e) formação de fusões celulares, junções comunicantes (composta de conexinas) e mecanismos neuronais (neurociência do câncer), estruturando-se um grande sincício funcional complexo, heterogêneo e desafiador (Heuer & Winkler 2023; Zhou *et al.* 2023a).

Dessa forma, salientam-se os aspectos morfológicos, resultantes de inúmeros mecanismos no CNSC, como um obstáculo considerável para uma abordagem convencional. Logo, os avanços na moderna tecnologia de imagem e na visão computacional fornecem uma alternativa atraente para quantificar *PGCCs/MNGCs* por análise morfométrica/histomorfométrica da morfologia da célula e do núcleo tumoral, o que evidencia novos caminhos investigativos para melhores métodos de triagem (Zhou *et al.* 2023b), identificar marcadores robustos (Saini *et al.* 2022), prever resistência à terapia e resultados de sobrevivência, fornece reprodutibilidade e quantificação (Saini *et al.* 2022), melhores definições das características prognósticas (Nabors *et al.* 2020), melhor definição de entidades/classificação da doença (Gritsch *et al.* 2022) e elucidar determinantes sociais comparados com dados morfobiológicos/morfofuncionais.

Em consonância, Charpin *et al.* (1992, 1993), Schneider e Kulesz-Martin (2004), Gedye e Navani (2022), Zhou *et al.* (2022), Kalkavan *et al.* (2023), Ghosh *et al.* (2024) e Mirzayans (2024) apresentam aspectos experimentais e teóricos relacionados à análise digital da morfometria nuclear e da ploidia do DNA em GB, contribuindo para a correlação entre características morfológicas e o comportamento tumoral e destacando a necessidade de integrar conhecimentos sobre vias de morte celular regulada, estratégias de inibição de apoptose, plasticidade fenotípica e instabilidade genômica associadas à poliploidia em cânceres para elucidar novos caminhos terapêuticos contra GB.

Ao mesmo tempo, Russack e Artymyshyn (1994), Nafe *et al.* (2005), Buhmeida (2006), Barr Fritcher *et al.* (2007), Veltri *et al.* (2005, 2012), Basavanhally (2014), Carella *et al.* (2017), Skinner e Johnson (2017), Fischer (2020), Singh & Lele (2022) e Pavone *et al.* (2024) discutem a relevância das aplicações atuais e tendências futuras da citometria de imagem e de DNA na pesquisa clínica, enfatizando a medição quantitativa da estrutura nuclear, o avanço de softwares de segmentação

histológica de código aberto e a combinação de histo-/morfometria para melhorar a análise morfológica, distinguindo tumores benignos e malignos, compreendendo mais profundamente a progressão tumoral, prevendo resultados clínicos e aprimorando a precisão diagnóstica e prognóstica, com aperfeiçoamentos na estratificação de GB.

Ademais, Hiatt e Breen (2008), Merletti et al. (2011) e Salari et al. (2023) destacam o impacto dos determinantes sociais do câncer analisados de forma transdisciplinar para fornecer uma visão global da prevalência de tumores do sistema nervoso central, sublinhando a necessidade de métodos diagnósticos e terapêuticos inovadores.

Em complemento, Buccitelli et al. (2017), Böcking et al. (2022), Ariotta et al. (2023) e Biggiogera et al. (2024) demonstram o potencial da união entre análise automatizada de imagens em H&E, citoquímica por reação de Feulgen, cariometria e estudo molecular para quantificar características morfológicas e correlacioná-las translacionalmente a dados clínicos, fornecendo insights detalhados sobre a arquitetura celular e tecidual do GB em diferentes perfis fenotípicos, além de possibilitar o desenvolvimento de novas técnicas para avaliar com maior precisão a composição e organização do DNA em células tumorais. Eles também reforçam a importância de interconectar dados de imagens com análises transcricionais, permitindo a interpretação de mudanças transcricionais causadas pela aneuploidia e a identificação de novos biomarcadores e alvos terapêuticos no contexto do GB.

Em suma, o imenso conjunto de mecanismos também se traduzem pela morfologia, assim, inúmeras aplicações são reconhecidas na comunidade acadêmica para melhorar a velocidade, a segurança e os resultados da cirurgia de tumor cerebral (Borah et al. 2023), entender padrões diferenciais de expressão gênica que parecem resultar em histomorfologia e prognóstico diferentes (Whitney et al. 2022), entender a relação morfometria nuclear e o conteúdo de DNA em relação ao tempo de progressão do tumor, potencial atuação prognóstica e o grau de pleomorfismo nuclear (Saito et al. 1994; Yoshii et al. 1995a; Yoshii et al. 1995b) e aprimorar decisões terapêuticas subsequentes junto ao tempo de sobrevivência de pacientes (Nafe et al. 2005a). Assim, o que há é uma nova fronteira frente a um estudo de

“Microscopia Morfométrica/Histomorfométrica Pan-câncer” (capaz de comparar tumores distintos pela morfologia).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Investigar, caracterizar, elucidar e explorar em ensaios pilotos as respostas ao estresse no glioma e suas relações a níveis mecanísticos sobre o desfecho clínico relacionados à formação de *PGCCs/MNGCs*.

3.2 Objetivos Específicos

- Correlacionar o espectro de variação de ploidia com parâmetros clínicos histopatológicos;
- Identificar potenciais biomarcadores ou fatores prognósticos;
- Verificar como alterações morfológicas atreladas à formação de subpopulações resistentes, como *PGCCs/MNGCs*, influenciam os desfechos evolutivos tumorais.

4 METODOLOGIA

A metodologia adotada nesta pesquisa é composta por três abordagens principais: estudo *in silico*, estudo *in vitro* e estudo translacional, complementadas por análises estatísticas detalhadas. Sob o ponto de vista da sua natureza, trata-se de uma pesquisa aplicada, dado seu foco em soluções práticas relacionadas à poliploidia nos CNSCs, em especial aos gliomas, e suas implicações terapêuticas. No que diz respeito à forma de abordagem do problema, emprega-se uma combinação de métodos quantitativos e qualitativos, assegurando uma análise abrangente e integrada dos dados. Quanto aos objetivos, caracteriza-se como pesquisa exploratória, visando identificar potenciais biomarcadores e mecanismos biológicos ainda pouco compreendidos, e descritiva, no que se refere à análise detalhada de dados obtidos nas diferentes etapas do estudo. A pesquisa segue o método hipotético-dedutivo, começando com hipóteses baseadas na literatura científica e utilizando estratégias experimentais e computacionais para testá-las e interpretá-las. Os procedimentos metodológicos detalhados para cada abordagem são apresentados nas subseções seguintes, incluindo a busca bibliográfica sistemática, análise de redes de interação proteína-proteína, rastreamento de células vivas, e avaliação histopatológica de amostras clínicas, além de análises estatísticas robustas que garantem a validade dos resultados obtidos.

4.1 Estudo *in silico*

Foi desenvolvida uma abordagem quantitativa e qualitativa pela realização de uma busca bibliográfica por meio do *PUBMED*, *EMBASE*, *SCOPUS*, *Science*, *Nature*, *Web of Science*, *Wiley Online Library* e *ScienceDirect*, visando à análise de artigos focalizados em poliploidia nos gliomas. E, por conseguinte, foram adquiridos conjuntos de genes e proteínas destacados na bibliografia encontrada, isto com o intuito de montar uma rede de interação proteína-proteína (PPIN) para a interpretação biológica e descoberta de potenciais alvos para biomarcadores ou direcionáveis ao *docking* e dinâmica molecular. No caso de todo o processo deste estudo, baseou-se no trabalho de Casotti *et al.* (2021).

A curadoria manual foi dividida em dois procedimentos secundários, sendo a busca

dos artigos em bancos de dados e análise dos dados obtidos. E a construção da PPIN foi feita após a extração das consultas de artigos com as proteínas selecionadas para a construção da PPIN por meio dos bancos de dados online do *STRING* versão 11.0 (<https://string-db.org>) através do download do aplicativo *stringApp* (versão 1.6.0; <https://apps.Cytoscape.org/apps/stringApp>) no software *Cytoscape* (versão 3.8.2; <https://www.Cytoscape.org/>), o qual possui uma variedade de plug-ins (aplicativos adicionais) relacionados à rede, úteis para a visualização, análise e integração do usuário, para recuperar as interações previstas para os alvos. As associações no *STRING* seguiram uma pontuação de confiança alta de 0,7, as fontes de interação foram baseadas em dados experimentais da curadoria, com um número de iteradores de 100 no total.

A análise da rede seguiu o procedimento matemática pelo plug-in *Network Analyzer*, para calcular os parâmetros topológicos básicos da PPIN, como a distribuição de grau, coeficiente de agrupamento e centralidades. E, com essa análise, houve uma redução de ruído nos dados ao fornecerem informações mais confiáveis sobre a rede. Ademais, ocorreu uma identificação dos módulos dessa rede pelo MCODE e uma visualização funcional da rede resultante pela utilização do enriquecimento de vias provindos do *stringApp*. E por fim, para tornar a PPIN mais específica e detalhada, foi utilizado o plug-in *cytoHubba* (versão 0.1), com o intuito de explorar nós/hubs importantes na rede por meio de alguns algoritmos topológicos, incluindo, Grau e Gargalo. Então, foi feita a seleção das dez melhores pontuações e os menores coeficientes de agrupamento (coeficiente de correlação de *Pearson* inferior a 0.5).

4.2 Estudo *in vitro* (Live cell imaging – Incucyte)

Realizou-se uma metodologia direcionada para o rastreamento de célula única (*single-cell tracking*). Para tanto, acompanharam-se células vivas utilizando o equipamento *Incucyte* (Sartorius), em parceria com o Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com os professores Guido Lenz e Eduardo Filippi-Chiela. O *Incucyte* é um microscópio alocado no interior de estufa de cultivo celular, que permite o acompanhamento em tempo real de células vivas.

Entre os modelos celulares já construídos pelo laboratório do prof. Guido a serem utilizados neste projeto, utilizaram-se as linhagens expressando a proteína 53BP1-mCherry (dano ao DNA), LC3 (autofagia) e FUCCI (ciclo celular). Estas células foram tratadas com 50 uM do quimioterápico Temozolomida por 5 dias, seguido do replaqueamento das células em meio livre de droga. A partir de uma semana do tratamento, momento a partir do qual se observa o surgimento de células gigantes multinucleadas (Andrades *et al.*, dados não publicados), foram adquiridas imagens das células a cada 12h com o objetivo de investigar o comportamento e desfecho destas células. A partir das imagens foram realizadas análises de morfometria nuclear e celular, assim como análises de intensidade e padrões de fluorescência nucleares. Quanto linhagem celular, foi utilizada a U87 de GB com um tratamento conduzido para simular o protocolo clínico.

4.3 Estudo Translacional

Foi avaliada e quantificada a variação de ploidia (espectro de ploidia) e demais respostas aos estresses terapêuticos no Câncer do Sistema Nervoso Central (principalmente em Gliomas, CSNC) utilizando lâminas de amostras parafinizadas de biópsias obtidas de pacientes numa coorte retrospectiva de pelo menos 2 anos, após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da UFES do Hospital Santa Rita de Cássia (HSRC) e do Hospital Estadual Central (HEC/iNOVACapixaba), visando obter acesso às informações de prontuários médicos e exame histopatológico, e, a partir disso, foi feita a identificação morfológica através das imagens das lâminas obtidas. Para a inclusão, foram adicionados pacientes com CSNC de ambos os sexos, sendo maiores de 18 anos, utilizando-se de amostras de biópsia de cerca de 50 participantes. Outrossim, foram incluídas somente amostras que possuíam prontuários médicos disponíveis e acessíveis para comparações e correlações sociodemográficas e clínicas.

A fim de contabilizar e definir *PGCCs/MNGCs*, foram considerados cinco campos microscópicos em cada seção de tecido que serão revisados e pontuados sob ampliação de no máx 400× e a média resumida. As *PGCCs/MNGCs* foram definidas como uma célula cancerígena cujo núcleo é pelo menos três vezes maior que o da

célula cancerígena diploide de acordo com Zhang *et al.* (2014). Ademais, buscou-se a identificação de características sociodemográficas, clínicas, dos tipos histológicos e dos tipos de tratamentos por meio dos prontuários médicos e dos dados histopatológicos. As características sociodemográficas buscadas nos prontuários foram: gênero, idade, etnia, escolaridade, procedência, histórico familiar, etilismo, tabagismo e origem do encaminhamento. As características clínicas e patológicas buscadas nos prontuários foram: diagnóstico e tratamento anteriores, base para diagnóstico serão exames mais relevantes, tipo histológico, lateralidade, ocorrência de mais de um tumor, metástases à distância e suas localizações, estadiamento clínico e tipos de tratamentos recebidos. As características histológicas em lâminas de H&E, algumas foram confirmadas por técnicas de imunohistoquímica, foram avaliadas, pelo menos: diferenciação do tumor, invasão macrovascular ou microvascular, cápsula tumoral e infiltrados inflamatórios.

Com base nisso, as lâminas obtidas de materiais parafinizados foram digitalizadas pelo equipamento de patologia digital da colaboração com a Facility CONFOCAL/CEFAP/USP. Dessa forma, utilizou-se do programa *QuPath* para contagem manual/automatizada das células e para realizar histomorfometria/morfometria, seguindo alguns parâmetros, como: área nuclear e perímetro celular, e buscando verificar número e tamanho dos núcleos e a área celular determinada por software de extração (*Thresholding*) com controle manual e outros cálculos.

4.4 Análise Estatística

A partir dos resultados alcançados, foram analisados os dados por meio de uma estatística descritiva, com o intuito de sumarizar e descrever o conjunto de dados obtidos, e inferencial, visando expandir generalizações da amostra sobre a população. Dessa maneira, foi possível sintetizar os dados de maneira direta, prezando por uma apresentação numérica, tabular e/ou gráfica com o propósito de resumir ou sumarizar as informações contidas nos dados observados. Para tanto, a análise estatística e a visualização dos dados foram realizadas usando *Google Colab* com *Python*, tendo variáveis descritivas analisadas com base em frequência e

variáveis contínuas comparadas usando o teste a depender da verificação da normalidade e homogeneidade amostral. Quanto um planejamento em comum a todas as análises, foi considerado um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

5 ARTIGO 1

Review article

Genes

Collection Feature Papers in Bioinformatics

Vol. 14, Nº 4, P. 801, 2023, doi: 10.3390/genes14040801

Computational Biology Helps Understand How Polyploid Giant Cancer Cells Drive Tumor Success

Matheus Correia Casotti, Débora Dummer Meira, Aléxia Stefani Siqueira Zetum, Bruno Cancian de Araújo, Danielle Ribeiro Campos da Silva, Eldamária de Vargas Wolfgramm dos Santos, Fernanda Mariano Garcia, Flávia de Paula, Gabriel Mendonça Santana, Luana Santos Louro, Lyvia Neves Rebello Alves, Raquel Furlani Rocon Braga, Raquel Silva dos Reis Trabach, Sara Santos Bernardes, Thomas Erik Santos Louro, Eduardo Cremonese Filippi Chiela, Guido Lenz, Elizeu Fagundes de Carvalho and Lúri Drumond Louro.

Abstract

Precision and organization govern the cell cycle, ensuring normal proliferation. However, some cells may undergo abnormal cell divisions (neosis) or variations of mitotic cycles (endopolyploidy). Consequently, the formation of polyploid giant cancer cells (*PGCCs*), critical for tumor survival, resistance, and immortalization, can occur. Newly formed cells end up accessing numerous multicellular and unicellular programs that enable metastasis, drug resistance, tumor recurrence, and self-renewal or diverse clone formation. An integrative literature review was carried out, searching articles in several sites, including: PUBMED, NCBI-PMC, and Google Academic, published in English, indexed in referenced databases and without a publication time filter, but prioritizing articles from the last 3 years, to answer the following questions: (i) “What is the current knowledge about polyploidy in tumors?”; (ii) “What are the applications of computational studies for the understanding of cancer polyploidy?”; and (iii) “How do *PGCCs* contribute to tumorigenesis?”

1. Introduction

The cell cycle is a series of events that occur to accurately replicate genetic material and cellular contents into daughter cells. This regulation is precisely monitored and controlled [1]. Nevertheless, some cells can undergo alternative cellular divisions or mitotic cycle variations, generating aneuploid (polyploid) genomes in cells with varying cell sizes [1].

Polyploidy, a cell that has three or more chromosomal sets [2], in cancer is complex, primarily because the initiation and progression of cancer involves multiple integrated processes [3]. The relationship between *PGCCs* (cell subpopulation with a chromosome content greater than $2n$) and cancer has recently reached interesting results regarding the fundamental role of these cells for tumor survival, immortalization, aggressiveness, and progression [4].

Fei et al. [3], Glassmann et al. [5], and Fei et al. [6] showed the presence of *PGCCs* in breast, colorectal, and ovarian cancer, correlating with poor survival and prognosis. These cells are considered an intermediate product of genomic instability [7].

Recent data demonstrated that *PGCCs* may form from oncogenic and therapeutic stress, generating reprogrammed cancer cells [8] and being a source of cancer stem cells (CSC) [9], influencing tumor resistance [10], and auto renewal [11]. *PGCCs* exhibit elevated aneuploidy and are connected to the tumor microenvironment evolution [12]; they have a cell cycle of their own, called “giant cell cycle” [1]. They are also able to: (i) create or repopulate macroscopic spheroids *in vitro* [13], (ii) generate tumors when inoculated in mice [14], and (iii) convert into different phenotypes, showing high plasticity [15], which has been included as a new hallmark of cancer.

Bharadwaj et al. [16], Mirzayans, Andrais, and Murray [17], Mirzayans and Murray [18,19], and Bharadwaj and Mandal [20] showed the connection between senescence and *PGCCs*, as cancer cells can escape from premature senescence, possibly leading to the formation of a multinucleated gigantic cell. Zhang et al. [21,22], Lin et al. [23], Sirois et al. [24], White-Gilbertson et al. [25], and Voelkel-Johnson [26] highlighted the metabolic and biophysical aspects of *PGCCs*, including cytoskeleton

and biochemical modifications, that sustain cell cycle dysregulation, stress responses, and dedifferentiation.

Numerous studies have begun to use high throughput approaches through multiple techniques, including next generation sequencing (NGS), multi-omics, and phylostratigraphy, among others. Additionally, this review seeks to integrate theories, show different hypotheses, emphasize the need for multidisciplinary and collaborative approaches, demonstrate possible therapeutic options, and highlight the impact of ploidy on different stages of carcinogenesis. Our goal is to discuss the following questions: (i) “What is the current knowledge about polyploidy in tumors?”; (ii) “What are the applications of computational studies for the understanding of cancer polyploidy?”; and (iii) “How do *PGCCs* contribute to tumorigenesis?”

2. Polyploidy in Cancer

Cell cycle deregulation and/or failures in mitosis can lead to polyploidy, the upregulation of genes that positively impact the cell cycle progression, and cytostatic genes downregulation [27,28] in physiological and pathological manners [29]. Polyploidy, or whole genome duplication (WGDs), results from the cell cycle prematurely ending or from cellular fusion [30], increasing genetic variation, stress tolerance, the ability to colonize different environments, and mutation burden relief. The evolutionary selective advantages of WGD offer a theoretical base for cyclic ploidy, mitotic slippage, and cancer cell fusion [31].

Polyploid cells are vulnerable during meiosis due to chromosome pairing difficulties and genomic instability [30]; this can be solved by a transient reversion of polyploidy (depolyloidization) [32], multipolar division [33], chromosomal rearrangement, and DNA divergence. A high degree of polyploidy or aneuploidy are detrimental to the cell, but can increase cellular adaptability and plasticity, fueling intratumoral heterogeneity [34,35].

3. A Brief Introduction to *PGCCs*

PGCCs have been observed for at least 180 years in diverse cancer types [36,37,38,39]. Some were observed after chemotherapy, in cells with irregular nuclei,

increased migratory potential, genetic instability, altered response to hypoxia, drug resistance, or higher mortality rates [40].

PGCCs are a special subpopulation of tumor cells containing a large cytoplasm and multiple nuclei [41], undergoing an altered giant cell cycle, creating genetic heterogeneity, and allowing cancer cells to overcome multiple micro-environment challenges [42].

3.1. *PGCC*'s Giant Cell Cycle

Stress factors such as chemotherapy, antimetabolic drugs, radiotherapy, hypoxia, or a deficient microenvironment may induce *PGCCs* formation [28] by means of a giant cell cycle (cycle linked to polyploidization and depolyploidization processes together with neosis) used for dedifferentiation of somatic cells, which can generate stem cells for tumor initiation. Such a cell cycle is divided in four phases: (i) Initiation: stressed tumor cells undergo catastrophic mitosis or cell death. Surviving cells assume a tetraploid or polyploid transient state [1,11]; (ii) Auto-renovation: tetraploid cells start endocycling to produce mononuclear or multinuclear *PGCCs*. Some multinuclear cells go through cyto-fission to create smaller polyploid cells [1,11]; (iii) Termination: *PGCCs* undergo depolyploidization (genome reduction division) and generate diploid nuclei by budding. Others form a structure that resembles a reproductive cyst [1,11]; and (iv) Stability: diploid descendent cells with altered genotypes continue to differentiate into a variety of aneuploid cell types with proliferative capacity [1,11].

Giant Cell Cycle Possible Outcomes and Fates

There is a correlation between endoreplication cell cycles and the amount of DNA replication mistakes, followed by complete dedifferentiation. In parallel, cell division stagnation reflects the degree of tumor malignancy [11]. As a result of polyploidization, cancer cells can: (i) initiate metastasis; (ii) survive "lethal" drugs; or (iii) divide asymmetrically to generate cell multilineages with higher therapy resistance [39,43]. The giant cell cycle can lead to tumor evolution, numbness, resistance, recurrence, and regeneration, as shown in Figure 1.

Figure 1 - In article online <https://doi.org/10.3390/genes14040801>

Genotoxic agents used in cancer therapy are associated with the induction of cell stress, ploidy, and cell size variation; these can lead to the generation of 3D structures similar to a blastocyst [44,45]. These blastocyst-like multicellular structures with a reprogrammed genome can generate resistant daughter-cells of different lineages that can acquire the capacity to go through embryonic latency, a reversible state of numbness, to survive environmental stress factors [44,46].

PGCCs can rejuvenate by way of amitotic division, generating cancer stem cells like blastomeres, that may transdifferentiate into different lineages, while the mother cell retains undifferentiated cancer properties [45].

3.2. *PGCCs* Functionalities: Plasticity, Metabolism and Resistance to Therapy

The diversity of *PGCCs* functions suggests polyploidy as an evolutionary source of tissue regeneration and plasticity, being explored by cancer cells to promote survival [47] and stress response [29,48], recap embryonic stages [49], exhibit adaptive exploration of multiple gene regulatory networks [48,50], and regulate biochemical and biophysical pathways [51,52].

The Warburg effect is the utilization of aerobic glycolysis for ATP synthesis, despite having abundant oxygen available. *PGCCs* probably use a Warburg effect similar to the embryo in state of pre-implantation by means of glucose repression of oxidative phosphorylation, as seen in the yeast Crabtree effect. The occurrence of polyploidy or aneuploidy in *PGCCs* ends up passing through gene losses that could alter the relative amount of enzymes favoring glycolysis, and, consequently, investing in rapid cell division [47,52].

The functionalities developed by the *PGCCs* also influence tumor resistance and recurrence; these are still big challenges for modern therapies, especially because they can produce stem cells able to repopulate the tumor microenvironment [53].

Thus, polyploid tumor cells can be used as a molecular model for better understanding fundamental evolutive paradigms [54,55]; evolution studies may help us answer questions about cancer resistance and success [56].

3.3. PGCC's Role in Tumor Evolution

Tumor evolution is a process by which tumor cells change across time, acquiring advantageous characteristics for their survival and perpetuation, surviving immune attack, drug treatments, and diverse anti-proliferative signals [57,58]. Key mechanisms and processes altered from tumor initiation to progression include proliferation, motility, metabolism, autocrine signaling, activated intracellular pathways, inflammation, plasticity, senescence, transdifferentiation, and cell cannibalism [58].

PGCCs also share features of the Mendel and McClintock models [46], showing independent segregation for different characteristics. Stressed cells respond by redefining their genomic structure to promote tumor success [46], primarily because *PGCCs* exhibit diverse gene expression, which leads to neosis [48]. The stress previously suffered directs tumor cells to certain paths, including apoptosis, necrosis, senescence, mitotic catastrophe, or a mixture of these processes [48]. However, when the tumor overcomes the death threshold through alterations in regulatory networks [59,60,61], polyploidization becomes possible in a generative and reversible process [48].

In parallel to this mechanism of ploidy regulation, numerous other processes are shared by *PGCCs*, including endoreplication (endocycle and endomitosis), cell fusion, cytokinesis failure, cell cannibalism (entosis), emperipolesis, reductive mitosis, budding, fragmentation, nucleophagy, and sporulation (asexual reproduction), leading to a quite unlimited potential for *PGCCs* to resist extinction and achieve immortalization [48,62], as shown in Figure 2.

Figure 2 - In article online <https://doi.org/10.3390/genes14040801>

Vladimir Niculescu has also highlighted the potential of “pre-existing *PGCCs*” (before response to therapies) that can turn into multinucleated genome repair structures (MGRNs) and, subsequently, originate *PGCCs* [38,63,64].

3.4. Genome Chaos

Liu [29] suggests that cell size regulation may control micro- and macroevolution, as somatic cells can follow the Waddington epigenetic landscape. *PGCCs* can overcome stress signals by rapidly adapting, living close to the genome, epigenome, and quantum chaos, altering cell fates, reprogramming, phylogenetically regressing, and senescing [48,65,66]. Therefore, that clonal selection enables better-adapted tumor cell survival, as shown in the Figure 3 (figure based on a bibliographic compilation by Erenpreisa and Cragg [51], Erenpreisa et al. [52], Heng and Heng [67], Heng and Heng [68], Heng and Heng [69], Liu et al. [70], Baramiya and Baranov [71] and Baramiya et al. [72]).

Figure 3 - In article online <https://doi.org/10.3390/genes14040801>

3.5. *PGCCs* Characterization in Diverse Cancer Types

Experimental studies with tumor cell lines suggest that targeted *PGCCs* therapies in cancer may be more efficient than conventional therapies. Even under similar stresses, *PGCCs* may exhibit tumor specific features and responses, which are shown below according to tumor type:

3.5.1. Breast and Ovarian Cancer

Lin et al. [23] showed that chemotherapy-originated *PGCCs* upregulated the expression of Zinc finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1) gene, correlating with metastases. Liu et al. [73] and Wang et al. [74], researching *PGCCs* in breast and ovarian cancer cell lines, identified a relationship between metastasis from resistant *PGCCs* offspring and higher lymph node grades, as well as an association between asymmetric divisions and tumor resistance.

3.5.2. Colorectal Cancer

Lopez-Sánchez et al. [75], Zhang et al. [21], Fei et al. [15], Fei et al. [76], Fei et al. [77], Fei et al. [78], and Fei et al. [6] highlighted that, in colorectal cancer cell lines, *PGCCs* were associated with overexpression of HIF-1 α , CK7, cathepsin B, E-

cadherin, fibronectin, Snail, Slug, Twist-1, Syncytin 1, CD9, CD47, JNK1, cyclin B1, S100A4, and downregulation of CDC25A, CDC25B, and CDC25C, affecting cell cycle regulation, vasculogenic mimicry, migration, and invasion.

3.5.3. Glioblastoma

Qu et al. [7] and Liu et al. [79], studying glioblastoma cell lines, observed a relationship between *PGCCs*' number and higher tumor grade, hypoxia, red cytoplasmic inclusions, budding vasculogenic mimicry, tumor immunosuppressive microenvironment, and more aggressive phenotypes.

3.5.4. Lung Cancer

Tagal and Roth [14] and Glassmann et al. [5] showed an association between staurosporine generated *PGCCs* and polyploid and multinucleated growth traits in lung cancer cell lines.

3.5.5. Prostate Cancer and Melanoma

White-Gilbertson et al. [25,80], working with prostate cancer and melanoma cell lines, found that *ASAH1* inhibition and cholesterol regulation are associated with *PGCCs* generation, being a bridge to tumor survival.

3.5.6. Only Ovarian Cancer

Zhang et al. [81], Lv et al. [82], Zhang et al. [83], Zhang et al. [84], Niu et al. [1], Niu, Mercado-Uribe, and Liu [49], and Liu et al. [85] revealed associations between *PGCCs* and cell cycle, motility, metabolism, vasculogenic mimetism, auto-renovation, nuclear fragmentation, and tumor aggressiveness using ovarian cancer cell lines.

3.5.7. Only Breast Cancer

Zhang, Mercado-Uribe, and Liu [13], Fei et al. [3], and Sirois et al. [24], studying breast cancer cell lines, suggested that *PGCCs* offspring can form organotypic structures *in vitro*, stromal transdifferentiation, chemoresistant cells, higher migratory capacity, and metabolic reprogramming.

Ultimately, the primary purposes of tumor polyploidization are to activate survival and

aggressiveness (metastasis).

3.6. Autophagy, Senescence and *PGCCs*

Autophagy seems to be involved in the generation of *PGCCs*, since autophagy inhibitors before chemotherapy decreases the formation of *PGCCs* [86]. This process modulates *PGCCs* colony formation by stoppage, representing paradoxical roles both beneficial and harmful to *PGCCs*.

Senescence and *PGCCs* have been related through comparative transcriptome studies, revealing the altered expression of meiotic cell cycle genes, spermatogenesis, and EMT [87,88]. Senescence induced by chemotherapy can halt tumor proliferation, but this response also causes polyploidization, leading to *PGCCs* formation [89,90].

Cellular damage triggered by genotoxic stress induces senescence which, under the influence of senescence-associated secretory phenotype (SASP) and immune response evasion, facilitates reversible polyploidy through mitotic slippage, circumventing mitotic catastrophe and terminal senescence, followed by endoreplication and damage repair; this, in turn, directs new polyploid tumor cells to generate aneuploid offspring [45,50]. These mechanisms are still little understood, but they result in more aggressive tumor profiles [91,92].

4. Reaching New Paths

Histological, physiological, and morphological *PGCCs* studies used (i) CoCl_2 and traditional cancer treatments for *PGCCs* induction [75,91]; (ii) classic tumor cell lineages [92,93]; (iii) *PGCCs* generated by budding [94,95]; and (iv) protein expression studies [96], showing that *PGCCs*' acquired features are similar to classic tumor marks, described by Hanahan and Weinberg [97], Hanahan and Weinberg [98], and Hanahan [99], contributing to needed cancer traits for utter success [93].

The complexity of *PGCCs* motivated recent computational approaches, providing new insights into essential questions about such cells. Single cell [100], multi-omics (genomics, transcriptomics, proteomics, metabolomics, electroma) [101,102], bioinformatics, NGS [103], Big Data, and Artificial Intelligence [104], together with

laboratory studies, have provided a better interpretation of polyploidy, elucidating its multiple cellular states [100], epigenetic and genetic profiles [101], spatial distributions [102], microenvironmental interactions [103], and translational advances [103,104].

5. Computational Perspectives

5.1. Bioinformatics/Computational Studies in Oncology

Modern oncology studies are using highly complex computational tools to improve data interpretation [105,106]. Furthermore, with the increase in evidence related to the role of the interaction between genes and proteins in tumor mechanisms, there was a need to integrate a new concept of medicine based on computational language to better explore all the processes involved in the emergence of cancer [107,108].

High-performance software is now used in genomics, proteomics, cell biology, physiology, pathology, therapeutics, clinical trials, and epidemiology [108]; multi-omic data processing still needs to translate *in silico* findings into *in vivo* scenarios, and is a future tool for precision medicine [107,108].

Bioinformatics also reduced the time from lab experiments to clinical oncology studies [106]. Computational biology provided a reduction in the time required to extract information due to the rapid growth of oncological data made available on online servers [106]. In this way, the increasing number of computational tools specialized in cancer has been associated with more detailed approaches to working with data [108,109]. In view of this, specialized bioinformatics in cancer are expected to play a central role in advances in translational oncology studies [106].

Novel Precision Medicine therapies, such as BRAF V600E inhibitors in patients with melanoma and PD1/PD-L1 immunotherapy for melanoma, lung, kidney, and other types of cancer [109,110], are enabling more efficient treatment with minimized side effects. In the following years, with the evolution of translational bioinformatics, advances in data sharing and integration are expected [111], improving collaborative and multidisciplinary teams [112], advances in data mining [113], expanding the ability to generate and analyze data [114], and planning therapies through better diagnosis [115] with the identification of new biomarkers and drug targets [116,117].

Artificial intelligence in oncology can refine, integrate, classify, and guide modeling prediction, classification, and screening of molecules with potential use in cancer treatment [118]. In this way, it is worth highlighting numerous other studies that express the application of computing in oncology, as shown in Table 1.

Table 1 - In article online <https://doi.org/10.3390/genes14040801>

5.2. Computational Studies about Polyploidization and PGCCs

Bioinformatics in oncology has highlighted new ways to elucidate the role of chromosomal aberrations, cell cycle errors, intratumoral heterogeneity, and tumor evolution in the face of new, more aggressive cancer phenotypes [131]. In parallel, multimodal, multi-omics, pan-cancer, and single cell analyses integrate data from diverse biological systems, clarifying tumor peculiarities, as for polyploidy [132].

Computational tools have been tested for different purposes to study cancer and polyploidy [133,134]. Among these approaches, we would like to highlight studies on nucleotide polymorphisms (SNPs), structural variants (SVs), unique somatic tumor-specific variants [135], genome annotation, mutation detection, evolutionary analysis, gene function, comparative genomics [136,137], identification of haplotypes, subgenomes, and assembly of whole genomes [137].

Among the computational approaches to tumor polyploidy, Anatskaya et al. [138] built a protein-protein interaction network (PPIs) of bivalent genes using the STRING server to investigate the regulation of polyploidy-associated gene expression, suggesting a role for polyploidy in the upregulation of oncogenes and downregulation of tumor suppressor genes. Furthermore, down-regulation of the DNA damage response (DDR) has been shown to increase damage tolerance and inhibit apoptosis. Furthermore, Czarnecka-Herok et al. [88] performed gene enrichment analysis (GSEA) in doxorubicin-induced senescent/polyploid HCT116 and MCF-7 cell lines. In that study, an enrichment analysis revealed changes in genes involved in controlling meiosis and mitosis. Interestingly, enrichment of spermatogenesis genes was also observed, supporting the premise that genetic alterations in tumors may be associated with germline expression of normally silenced genes, a characteristic that

may be related to tumor malignancy.

Additionally, Yang et al. [139] used GEO2R software, genetic ontology (GO), and the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) to analyze databases for integrated annotation, visualization, and discovery (DAVID) of differentially expressed genes in cervical cancer cells using Affymetrix Human Genome arrays. In addition, they used the STRING software to build protein-protein interaction (PPI) and to analyze differentially expressed genes involved in cancer prognosis, with the help of UNLCCAN and OncoPrint browsers. In total, 57 differentially expressed genes were recognized, especially those enriched in the mitotic cell cycle G1/S transition, participating in cytokine-cytokine receptor interaction, including WD Repeat and HMG-Box DNA Binding Protein 1 (WDHD1), a gene involved in cancer promotion and polyploidy induction.

Moreover, using the Gene Expression Omnibus (GEO) database, Yan et al. [140] analyzed different gene expression profiles (GSE54238 and GSE84004) in the development of hepatocellular carcinoma from data taken from GPL16955 and GPL22109. STRING and Cytoscape software were used to visualize the integrated regulatory networks and raw data were analyzed using the multi-array averaging algorithm in the R Affy package. The PPI network they constructed highlighted five main core genes with the highest degree of connectivity, including AURKA. This gene showed a role in regulating the mitosis G2/M transition and its overexpression is associated with polyploidy and genomic instability.

In addition, Wang et al. [141] investigated the variation of GSE38241, GSE69223, GSE46602, and GSE104749 in the development of prostate cancer by using the GPL570 Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array and GPL4133 Agilent-014850 Whole Human Genome microarray 4 × 44 K G4112F platforms. For this purpose, GEO software was used. Furthermore, a PPI network was also built using STRING and MCODE and the enrichment of the GO function was conducted with the DAVID software. The study revealed 20 genes related to mitosis and cell division and the process of carcinogenesis, including cyclin B1 (CCNB1). Elevated levels of cyclin B1 have been associated with polyploid cell uptake and shown to be a potential marker for diagnosing prostate cancer.

Another comparative study using bioinformatics for transcriptome analysis of polyploid versus diploid cells from normal mammalian tissues highlighted a potential downregulation of circadian clock genes by c-Myc (a cell cycle regulator), whereas polyploidization correlated with deletion of bivalent genes responsible for circadian rhythm regulation [142].

Structural variants (SVs) are crucial to understanding cancer polyploidy. Kosugi et al. [143] evaluated the performance of 69 SV detection algorithms using whole exome sequencing (WES) datasets, using the GRIDSS, Lumpy, SVseq2, SoftSV, Manta, and Wham algorithms to improve variant detection accuracy, focusing on SV size. This means that careful selection of algorithms for each type and size range of SVs is crucial for accurate SV detection. Therefore, it results in the most accurate information possible regarding the correlation between tumor structural alterations and polyploidization.

In addition to such basic research applications, computing linked to tumor polyploidy also highlights new paths for clinical studies and strengthened by the advancement of high-throughput technology integration. Among the main computational approaches, machine learning algorithms stand out [144], showing promise for the evolution of translational research in oncology and initiating a revolution in tumor mechanistic knowledge [145].

In a search on polyploidy clinical trials around the world at the website <https://clinicaltrials.gov> (accessed on 15 February 2023), only two studies were found for the terms “cancer” and “polyploidy”. The distribution of clinical trials around the globe demonstrated a study recruiting patients (USA) and another already completed (Germany), confirming that research on *PGCCs* needs to be further developed worldwide.

Although there are still obstacles to the implementation of computational *PGCC* analyses in clinical practice, some tools demonstrate new trends towards faster and more personalized diagnoses and treatments [146]. In addition, an expansion of *PGCCs* computational models will provide valuable data for the understanding of this complex phenotype and its translational relevance in cancer [147].

Multiple analyses, including multi-omics, comparative phylostratigraphy,

mathematical modeling, and others, will provide a better understanding of cell subtype and state. Table 2 demonstrates the impact of computation in the area of tumor polyploidy.

Table 2 - In article online <https://doi.org/10.3390/genes14040801>

The computational era has provided simulation tools to better understand cell-to-cell interactions in normal and altered cell cycles, relying on specific and detailed cell cycle models, with the aim of understanding the dynamics of tumor formation and the potential outcomes associated with polyploidy [161]. Such innovations and improvements in oncology are only possible through the integration and multidisciplinary of research groups.

As highlighted in this review, advances in computing permeate artificial intelligence approaches, machine learning algorithms [162], personalized targeting [163], and several other approaches. Broad access to low cost computational tools will expand specialized computational models in the study of cancer and *PGCCs* [162,163].

5.3. Future Directions

Applications of systems biology, computational biology, and bioinformatics, as shown by the studies in Table 1 and Table 2, allowed the analysis of high-throughput samples through artificial intelligence, machine learning, and other techniques [162,163], resulting in data about the identification of genetic signatures [164], new biomarkers [163,165], multiscale modeling [164,165], and visualization and interpretation of cellular data [164].

Research with artificial intelligence will embody the personalization of prevention, diagnosis, and therapy [162,166]. New biotechnological approaches will provide better cancer treatment, especially in cases of resistance, numbness, metastasis, and recurrence correlated to the polyploidization process. Molecular computers inside tumor cells acting as sensors, digital pathology, personalized biopsies, analysis of microscopic images and exams, synthesis of biological structures, and pharmacological bioassays will increase the computational area as required to solve

demands in these complex studies [161,162,167].

In addition, machine learning will provide new answers for studies in oncology and tumor polyploidy (especially for the understanding of *PGCCs*), and will further extend its sophisticated approaches with studies in microrobotics for cell manipulation [168,169], ploidy inference based on co-sequencing of DNA and RNA in individual nuclei [169], multi-omics [170,171], NGS [170], single-cell [171], and other approaches capable of bringing new paths to the understanding of polyploidization in cancer (as indicates Figure 4).

Figure 4 - In article online <https://doi.org/10.3390/genes14040801>

Computational tools provide ideal support for understanding self-organization in face of cellular chaos, linked to the complex genomic functioning of the polyploid cells [172,173]. Single-cell RNA sequencing approaches will increasingly add new light to polyploidy, as shown in studies on hypertranscription [164,172,174]. In the long term, an increasingly prominent role for bioinformatics in elucidating polyploidy in tumors is expected. To achieve this goal, scientists from different fields are expected to come together to understand, tame, and fight cancer [172,173].

6. Conclusions

Polyploidization in tumors runs through multiple mechanisms phylogenetically shared between unicellular and multicellular organisms, resulting in evolutionary advantages for the tumor, thus reverberating an intrinsic complexity that is highly difficult to access through isolated studies. Thus, the need for integrated and multidisciplinary approaches capable of elucidating polyploidy in tumors becomes clear. Computational biology, bioinformatics, NGS, single-cell analysis, multi-omics studies, and systems biology reveal a growing and promising potential in the understanding of polyploidization as well as its innovative potentials to create personalized, comprehensive, and multifactorial therapies in cancer treatment.

Reference - In article online <https://doi.org/10.3390/genes14040801>

CONSIDERAÇÕES - Artigo 1

Este artigo salienta que:

1 O ciclo celular destaca-se como essencial para a replicação genética e divisão celular, mas disfunções nesse processo podem levar à formação de *PGCCs*, que surgem em resposta ao estresse oncogênico, terapêutico ou do microambiente tumoral. Essas células desempenham papéis cruciais no câncer, promovendo resistência a drogas e radiação, renovação celular, recidiva tumoral e a geração de células-tronco cancerígenas (CSC), caracterizando-se pela alta plasticidade fenotípica e genômica, além de um ciclo celular alterado que as capacita a regenerar tumores in vivo.

2 O ciclo das células gigantes abrange quatro fases: iniciação, quando mitoses anormais ou morte celular catastrófica geram células tetraploides; auto-renovação, com formação de *PGCCs* mono ou multinucleadas; terminação, onde ocorre a depoliploidização que cria células diploides geneticamente alteradas; e estabilidade, com proliferação de descendentes resistentes. Essas características contribuem para a metástase, heterogeneidade tumoral, alterações metabólicas, como o efeito Warburg, e plasticidade epigenética e genômica. As *PGCCs* também se destacam por sua capacidade de adaptação ao estresse genotóxico, hipóxia e terapias convencionais, formando estruturas tridimensionais que lhes permitem sobreviver em estados de latência embrionária.

3 A poliploidia confere vantagens evolutivas ao tumor, como maior variabilidade genética e adaptação ambiental, mediadas por mecanismos como endoreplicação, fusão celular, falha de citocinese, entose e nucleofagia. E observações clínicas associam *PGCCs* a piores prognósticos em cânceres de mama, cólon, ovário e pulmão, resistência terapêutica elevada e formação de mimetismo vasculogênico. Terapias direcionadas a *PGCCs*, incluindo inibidores de autofagia antes da quimioterapia, apresentam potencial para superar limitações das abordagens convencionais. Além disso, há ligação entre *PGCCs* e senescência induzida por estresse genotóxico, promovendo células tumorais mais agressivas, com formação frequentemente impulsionada por slippage mitótico e endoreplicação. Estudos

induzem *PGCCs* usando CoCl_2 , quimioterápicos e linhas celulares tumorais, revelando proteínas específicas e semelhanças com marcas tumorais descritas por Hanahan e Weinberg.

4 Ferramentas computacionais avançadas, como integração de dados multi-ômicos, sequenciamento de próxima geração e inteligência artificial, possibilitam análise detalhada de estados celulares, interações microambientais e perfis genéticos. Genes como *WDHD1*, *AURKA* e *CCNB1*, associados à poliploidização e instabilidade genômica, emergem como marcadores diagnósticos potenciais. Algoritmos como GRIDSS e Manta detectam variantes estruturais (SVs) com precisão, enquanto modelagem matemática e análises de célula única revelam subtipos celulares. Essas abordagens suportam a medicina de precisão, permitindo terapias personalizadas e descobertas de novos biomarcadores, enquanto avanços em robótica e bioinformática aprimoram diagnósticos e tratamentos.

Em suma, com base nos conteúdos apresentados neste artigo e aqui salientados em tópicos de 1 ao 4, observa-se que este artigo contém uma articulação com a proposta de pesquisa desenvolvida ao longo dessa dissertação. Isto porque, um entendimento inicial acerca das *PGCCs* somando-se com destaques aplicados quanto ao uso da bioinformática para sua análise, são bem desenvolvidos ao longo dessa dissertação tanto na etapa computacional inicial com redes de interação proteína-proteína, quanto na estratégia de análise de morfometria/análise de imagens e até uma proposta piloto de patologia digital com lâminas de gliomas. Dessa forma, o que há em concordância são as perspectivas ao serem atingidos os objetivos iniciais desta proposta de pesquisa, sendo reduzir o tempo para o diagnóstico dos gliomas, personalizar quanto ao tratamento ao acompanhar a evolução do tumor e seu prognóstico e identificar uma subpopulação tumoral e sua influência em múltiplos alvos na massa tumorigênica e de que maneira, poderia se superar as limitações das terapêuticas convencionais.

6 ARTIGO 2

Review article

Frontiers in Oncology

Sec. Molecular and Cellular Oncology

Research Topic: Quantum Biology

Volume 14 - 2024, doi: 10.3389/fonc.2024.1419599

Integrating frontiers: a holistic, quantum and evolutionary approach to conquering cancer through systems biology and multidisciplinary synergy

Matheus Correia Casottia, Débora Dummer Meira, Aléxia Stefani Siqueira Zetum, Camilly Victória Campanharo, Danielle Ribeiro Campos da Silva, Giulia Maria Giacinti, Iris Moreira da Silva, João Augusto Diniz Moura, Karen Ruth Michio Barbosa, Lorena Souza Castro Altoé, Lorena Souza Rittberg Mauricio, Luíza Santa Brígida de Barros Góes, Lyvia Neves Rebello Alves, Sarah Sophia Guedes Linhares, Vinícius do Prado Ventorim, Yasmin Moreto Guaitolini, Eldamária de Vargas Wolfgramm dos Santos, Flavia Imbroisi Valle Errera, Sonia Groisman, Elizeu Fagundes de Carvalho, Flavia de Paula, Marcelo Victor Pires de Sousa, Pierre Basílio Almeida Fechine and Iúri Drumond Louro.

Cancer therapy is facing increasingly significant challenges, marked by a wide range of techniques and research efforts centered around somatic mutations, precision oncology, and the vast amount of big data. Despite this abundance of information, the quest to cure cancer often seems more elusive, with the “war on cancer” yet to deliver a definitive victory. A particularly pressing issue is the development of tumor treatment resistance, highlighting the urgent need for innovative approaches. Evolutionary, Quantum Biology and System Biology offer a promising framework for advancing experimental cancer research. By integrating theoretical studies, translational methods, and flexible multidisciplinary clinical research, there’s potential to enhance current treatment strategies and improve outcomes for cancer patients. Establishing stronger links between evolutionary, quantum, entropy and chaos

principles and oncology could lead to more effective treatments that leverage an understanding of the tumor's evolutionary dynamics, paving the way for novel methods to control and mitigate cancer. Achieving these objectives necessitates a commitment to multidisciplinary and interprofessional collaboration at the heart of both research and clinical endeavors in oncology. This entails dismantling silos between disciplines, encouraging open communication and data sharing, and integrating diverse viewpoints and expertise from the outset of research projects. Being receptive to new scientific discoveries and responsive to how patients react to treatments is also crucial. Such strategies are key to keeping the field of oncology at the forefront of effective cancer management, ensuring patients receive the most personalized and effective care. Ultimately, this approach aims to push the boundaries of cancer understanding, treating it as a manageable chronic condition, aiming to extend life expectancy and enhance patient quality of life.

1 Introduction

Cancer occurs when cells stop working for the collective and become selfish. These changes transform the cells, giving them competitive advantages. Cancer manifestations are similar to the biological processes observed in unicellular organisms. Oncogenes versions are present in viruses, unicellular organisms, and invertebrates (1, 2). Nowell (3) made comparisons between the selective forces that influence cancer cells in the human body with those affecting individuals within populations in nature. Their increasing genetic instability contributes to elevated genetic diversity within the cancer cell population and is likely to amplify phenotypic diversity (4).

The basis for the somatic mutation theory (SMT) hypothesis originates in 1914, when Theodor Boveri postulated that a combination of chromosomal and mutagenic defects could result in cancer. Thus, somatic mutation was structured as a causal event for the onset of cancer. Consequently, SMT was extrapolated to all tumors and formalized a 100-year history, with an inability to show appreciable clinical benefits for all types of tumors (2). This is because the reductionism regarding the unique importance of genes and the inflexibility towards new developments in the field of

oncology “fabricated” a research area with incorrect interpretations of data, as it stood out as the most parsimonious explanation. As a result, new scientific approaches will be required to integrate, explain, and direct effective treatments against cancer (2).

2 Brief interpretation of cancer

Proceeding with such aforementioned facts, it is noted that cancer life cycle follows the life cycle of common ancestors such as amoebozoans, metazoans, and fungi (AMF), which are governed by the Evolutionary Biology of Cancer Cells (ECCB) Theory. This is because genes, genetic modules, and gene regulatory networks of pre-metazoic cellular systems may have been preserved in the ancestral genome of metazoans and humans. Furthermore, genomic integrity can be restored through homotypic cells and nuclear fusion, resulting in the formation of high-degree polyploids known as multinucleated genome repair syncytia, or by hyperpolyploidization (5–7).

Going deeper genetically, cumulative somatic mutations over the evolution of a cancer cell shape its genome, and a portion of this trajectory can be reconstructed through the analysis of whole genome sequencing data (8–10). Moreover, the nearly universal presence of cancer indicates the roots of its evolutionary history. For example, the existence of tumors in dinosaurs has been recorded on several occasions (11). According to Weinberg (12), ancestral forms of oncogenes were already manifesting among primitive metazoans, which constitute the common ancestral lineage of both chordates and arthropods. Other more recent genetic research conducted on freshwater Hydras suggests that the MYC oncogene, specific to humans, has an evolutionary origin that can be traced back at least 600 million years ago (13).

Nevertheless, the continuous complex adaptation of cancer is regulated by nonlinear feedback systems between genetic instabilities, environmental signals, cellular protein flows, and gene regulatory networks (14, 15). Tumor genomes are subject to slow microevolutionary and punctual macroevolutionary changes, according to the 2nd law of thermodynamics by Boltzmann, Darwin’s selection principle, and entropy

causing mutations that lead to increased genetic variation, promoting the development of cancer and its phylogenetic evolution (14, 15).

Despite so many advances, cancer still stands out as a set of challenging diseases, but why? Why, even with the establishment of the “national war on cancer” by President Nixon, has a cure not been achieved? How does precision oncology address these issues? Is it a grand illusion? Does research based on large datasets provide solid scientific foundations or simply a “straw set”? Numerous other questions arise throughout the long journey of oncology. Multidisciplinary, translational, and holistic approaches are crucial for elucidating and effectively implementing adaptive therapeutic strategies in oncology (16–18).

In addition to restructuring the approach to cancer, new understandings of how to tame or control cancer need to be incorporated, avoiding reliance on ineffective “death strategies” that induce aggressive tumor adaptations. A deep understanding of evolutionary, holistic, and translational parameters, along with chemical and physical principles, is expected to usher a new era of more personalized, single-cell-based oncology capable of encompassing new adaptive therapies for the improvement of patient survival and quality of life (19).

Despite technological advances and research, the difficulty in winning the battle against cancer goes through various spheres. The mysticism surrounding the mechanisms that promote the emergence of tumors, the heterogeneity of tumors, the lack of standardization to responses to drugs and treatments, and issues inherent to tumor progression are some of the key points. Cancer cells are capable of accessing stages of evolutionary progression that corroborate their unstable character and physiological plasticity (20). Such configurations explain why cancer is today one of the most complex and challenging diseases, a product of both evolutionary biology, genetics, epigenetics variability and quantum dysfunctions.

3 Brief interpretation of cancer therapy

Cancer demands new therapeutic paths that are more integrated, multidisciplinary, and translational, cultivating an intuition for systems oncology and connected with other challenging areas such as regenerative biology, biotechnology, bioinformatics,

systems biology, among others, as reviewed by Alves et al. (21), Casotti et al. (22), Casotti et al. (23) and Meira et al. (24). Thus, by tracing the evolutionary history of cancer, the influences of cellular biological variations, such as aneuploidy and polyploidy, will be understood. Structures like syncytia and cell fusion phenomena reveal the complexity of cellular interactions that lead to malignant transformation.

Moreover, the “dive” into the genomic and epigenomic chaos illustrates how it contributes to oncogenesis. New hypothesis and creative insights are demanded, such as incorporation of the chaos theory and quantum principles to understand the nonlinear dynamics of cancer, and to propose non-conventional treatments and researches. Translational and adaptive research, single-cell analysis technologies, systems biology, comparative oncology, quantum biology, and chaos theory will provide unprecedented elucidation about cancer evolution.

The fight against cancer faces significant hurdles, including the challenge of overcoming treatment-induced resistance and the absence of a definitive cure. The integration of evolutionary and systems biology into oncological research holds promise for developing adaptive, effective treatments by leveraging comprehensive data and multidisciplinary approaches, potentially offering new strategies to control and mitigate cancer. The current era in cancer research is a pivotal moment, poised for transformative advancements through technological and interdisciplinary efforts. Achieving this vision requires breaking down disciplinary barriers, embracing flexibility in scientific innovation, and fostering open communication to enhance patient care and quality of life, setting a course towards managing cancer more effectively and sustainably. By undertaking such a comprehensive and innovative exploration of the intersections between multiple complex areas, the intent is to answer the following guiding question: How do the mathematical, chemical, physical, and biological characteristics and peculiarities of cancer highlight the need for a translational, holistic, single-cell, adaptive, and evolutionary approach? As a result, it will be possible to highlight the inherent challenge in studying cancer through crosstalk of theories, experimental analyses, and heterogeneous data, to innovate through pioneering in diagnosis, monitoring, and treatment, and to reach numerous promises and challenges in the search for more effective and personalized therapies.

3.1 Evolutionary biology and cancer

The great cellular anarchy within the microcosm of a multicellular organism that provides tumor origin has its roots extending through the vast domain of life (25–31). Thus, embarking on the journey through the phylogenetic history of cancer, interpreting the evolution of cells traces an interpretation of cancer to its most primitive origins (31). Protists, fungi, invertebrates, and vertebrates, each evolutionary group added layers of complexity that paradoxically facilitated cancer emergence. In multicellular organisms, the evolution of specialized cell types under strict genetic and epigenetic control became a strategy to harmonize cell proliferation and differentiation, a delicate balance often subverted in cancer (25–31).

Tumorigenic evolutionary process in miniature, where cells within a tumor compete, evolve, and adapt, integrates with a diversity of cell types, and there is a prominent contribution of asymmetric cell division to phenotypic heterogeneity (32). Such processes are modulated by continuous interaction with the tumor microenvironment, highlighting the co-evolution of tumor cells and their niche (33).

Genomic studies support the idea that the cancer genome evolved hundreds of millions of years ago, long before the emergence of multicellular organisms, as emphasized by biology (ECCB) (34, 35). Thus, within an eco-evolutionary dynamic, there is an overlap between genes and pathways related to metazoans, fungi, and amoebas in cancer, highlighting regulatory capabilities for both the establishment and reversal of cellular fate and tissue integrity in the tumor mass (36).

Among current comparisons supporting these relationships, the social selection observed in slime molds, organisms that transition between uni- and multicellularity, stands out. They represent the importance of spatial and pre-adaptive aspects as promoters of evolution under selection in the social context, reinforcing multicellular collective behavior, similar to tumors (37). In summary, fungi, with their dynamic and plastic genomes responding to environmental stress, present increased rates and numbers of adaptive routes arising from aneuploidy, resembling cancer cells chaos. This makes fungi a good model for combating adaptation in tumors through “evolutionary traps” (38).

Additionally, shared genomic instability between fungi and tumors reveals special pathways for the formation of multinucleated cells (polyploidization), syncytia, fusion of mononuclear cells, and cell-in-cell structures, as dominant survival strategies supporting biodiversity in invertebrates and protists (39). This likely plays an analogous role in cancer cells. Building on these claims, cancer expresses a cellular system capable of switching between multicellular and unicellular subsystems with “cellular regression” involving unbalanced energetic sets (40).

Regarding this polyploidization, cancer progresses as a “runaway locomotive” reflecting genomic instability promoting cellular diversity and acquisition of new capabilities, such as drug resistance and metastatic potential (41–43). Thus, there is a dynamic, probabilistic, and unpredictable nature that pervades cellular resilience and adaptation to the energetic turbulence underlying cellular dynamics in the tumor, serving as a promising source for new innovative therapeutic approaches (44–46).

3.1.1 Process resulting from evolution

Throughout the “tree of life,” cancer can be interpreted as a cheat against a complex cooperative multicellular system, as evidenced by cancer hallmarks, demonstrating selfish characteristics of proliferation, perpetuation, and survival against extinction, similar to various unicellular and multicellular organisms (19, 47). In this cancer evolution process, cells proliferate through various cycles, ultimately hitting a limit that leads to senescence or cell death, but also can lead to polyploidization—where cells gain extra sets of chromosomes. This polyploidization connects to various mechanisms that promote cell diversity and can bypass cellular aging limits. It serves as a gateway to genetic chaos but also to self-organization and survival strategies, reflecting ancient cellular traits. This complex process underscores cancer’s adaptability and the need for personalized, adaptive therapeutic strategies to effectively manage and control cancer progression, for further clarification on the relationship between evolution, cellular variability, and cancer, Figure 1 is highlighted.

Figure 1 - In article online <https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1419599>

3.2 Systems biology, quantum, chaos and cancer

The dynamic complexity of cancer underscores the demand for principles from systems biology and chaos theory, making it crucial to consider the tumor system as a whole, including its dynamic interactions with the host (51). From this perspective, understanding cellular signaling networks and metabolic pathways in their entirety becomes a strategy to identify critical points in regulation that can be targeted for therapeutic interventions (52, 53). Moreover, by incorporating the understanding of tumor responses to cell stresses, such as polyploidy and syncytium, the layer of cellular plasticity and adaptability is added according to the principles of Mendelian or non-Mendelian, as McClintock's inheritance (54–56).

In line with the various relationships existing in a tumorigenic mass, the application of quantum physics to biology and medicine can reveal underlying mechanisms of these diseases, challenging existing paradigms, proposing new approaches for treatment and diagnosis, while also elucidating fundamental biological processes (57, 58). Among directly applicable examples, it's worth highlighting: i) the butterfly effect (the idea that small variations in biological systems can lead to large effects) by emphasizing the difficulty of predicting cancer, requiring a deeper understanding of nonlinear and chaotic dynamics (59); and ii) synchronicity and coherence as critical phenomena for maintaining homeostasis and normal cell functioning, which are lost as cellular and molecular self-organization occurs in the tumor (60, 61).

3.2.1 Walking through complexity

Based on these initial highlights, it is emphasized that a cancer's complexity and chaos act together in a system of stability and instability, with multiple stages that can be mathematically described by the chaos theory and visualized in fractal geometry (62). In other words, it is a set of diseases characterized by unpredictability and complexity. Tumor evolution is immersed in an environment outside thermodynamic equilibrium, essential for inducing self-organized complexity cancer as the source new structures, survival strategies, tumor microenvironment adaptation, genomic reorganization, global stability/local instability, and activation of a pathological biological clock (16, 19, 20, 48–50, 63).

System chaos can cause a “creative disorder,” by a two-phase evolution of connecting contributions of karyotypes and genes: chaos induced by stress (providing macroevolutionary genomic shuffling) and adaptation (16, 19, 48). Moreover, the quantum adaptive evolution (= quantum states, i.e., qubits) highlights tumor evolution as a co-dependent microenvironment selection. Cancer cells have an environmental dominance that provides selective adaptation of epigenetic landscapes in favor of survival phenotypes (49). Simultaneously, changes in epigenetic traits impact on epigenome chaos needed for inter- and intratumoral heterogeneity, involving disordered hyper- and hypomethylation in various DNA segments (50).

Tumor is as a system far beyond the SMT, presenting shared evolution among multiple unicellular and multicellular organisms, showing adaptive genetic regulatory networks on the brink of order and chaos. Cell fate can be modulated by oscillations between cellular senescence and reprogramming self-organization, related to unicellularity, an existing phylogenetic feature, and negative selection of variants unsuitable for survival (48).

A key matter about evolutionary cancer concepts is how to provide more effective treatments based on the cancer’s evolutionary progression, allowing tumor control and modulation. Evolutionary comparative oncology supports studies of tumor cheating, risk stratification and clinical management, helping cancer prevention research programs based on detection and suppression (47). Additionally, translate into better outcomes and positive treatment responses (64).

Owing to the multifactorial nature of oncogenesis, attacking all possible molecular agents simultaneously is currently, and impractical due to a lack of solid investigative foundations (16). Therefore, holistic studies with better experimental designs, fewer misleading preclinical trials, and vague interpretations are needed (65), along with new approaches based on analytical systems to decipher epigenome, genome and quantum chaos (50), understanding of “evolutionary traps” by comparative oncology (38), and the inclusion of adaptive therapy for clinical protocols. This therapy is a promising therapeutic strategy, considering the evolution by a temporal and spatial microenvironment variability, as well as disturbances induced by therapy, providing a

stable tumor burden with more chemosensitive cells (64). For such development, we need to translate between basic and clinical research, incorporating multidisciplinary teams, interorganizational collaborative models, sustainable market competition, and formalizing more interinstitutional partnerships (66).

3.2.2 News due to holistic initiatives

As a result of numerous prominent studies on integrated areas aimed at elucidating new paths at the forefront of knowledge being explored in oncology, the increasingly complex functioning of cancer genome, controlled at different levels (1- DNA base sequence with inherited information, 2- Epigenetic pathways with protein interactions and feedback cycles, and 3- Genome architecture and organization, activating or suppressing interactions), is also influenced by environmental stress, which is immersed in coordinated biological, chemical, and physical changes, based on self-organized complexity (67, 68). Such changes in cellular activities and cell fate are associated with phase transitions of a cooperative “control architecture” based on networks and a “nucleotype” under coarse control, as with polyploidy (67, 68).

Despite intense complexity, cancer cells undergo causal effects and feedback that link the dynamics of heterogeneous and evolving tumors with changes in metabolic, inflammatory, nutrient competition, and immune response, giving rise to the adaptive complexity of cancer (69). Thus, a possible modulation by the immune system can restore immunosurveillance and avoid immune editing and escape (69). Other modulations may be related to the diversity of large-scale cross-genomic data sets, which, when combined with new evolutionary approaches, allows predicting the temporal order of somatic events that arise during tumorigenesis (70). In addition, laws and physical principles and the “field effect” that define the behavior of matter add foundations regarding tumor heterogeneity, drug resistance, and the ecological behavior of multiple cells with reproductive fitness and degrees of sensitivity to drugs, along with new therapeutic delivery strategies, from mechanics to evolution and from chemistry to nanotechnology (70). Furthermore, quantum physics displays principles that can act in the clinical area (70, 71).

Just as more robust modulations exist, there are subtle controls immersed in a tangle

of evolutionary insights about the macro and microheterogeneity acting on the evolutionary plasticity of cancer (72). Recent technologies for single-cell sequencing and tracking provide an expansion of angles in more effective therapeutic intervention, allowing the delineation of spatial structures of subclonal architectures, detecting, tracking, and treating clinically dominant subclones (subjected to drugs, doses, and variable time under changes in the cell cycle and cell fate) in a live cell model, quantifying the generation of de novo mutations, building genotype-phenotype maps, and mapping dynamic fitness landscapes (72–74).

3.3 Translational and adaptive research in oncology

Translational research in oncology represents a critical bridge between scientific discoveries of basic research and clinical applications because increasingly molecular tools are added to sophisticate clinical aspects. Translational studies have been improving preclinical models applicable to therapeutic development, thereby advancing both diagnosis and therapy through molecular characterization of human tumors and continuous adaptation of therapeutic approaches to tumor characteristics evolution (75, 76). Thus, new paradigms and initiatives emerge.

The comparative oncology area regains significant attention in the oncology field, especially with innovative trends of One Health and the search for new models that can either replace classic model organisms or complement the mechanistic elucidation of cancer. Comparative oncology offers insights into why some species vary in their susceptibility to cancer and the mechanisms responsible for the diversity of cancer defenses (77). Additionally, clinical trials in veterinary cancer patients provide an opportunity to evaluate new therapeutics in a setting that recapitulates many of the key features of human tumors, improving cost-effectiveness and protocol efficiency for drug discovery, as well as incorporating new One Health perspectives into comparative and translational medicine (78, 79).

In addition to advances in comparative oncology, significant breakthroughs are added by single-cell biology studies, as it becomes possible to perform specific mapping of each tumor cell, highlighting intratumoral heterogeneity. Applications illustrate the power of this new area, such as the construction of single-cell atlases that unveil the

evolution of cell types across Metazoa, allowing the identification of unique cellular states and conserved evolutionary traits, providing valuable insights into the cellular mechanisms underlying cancer (80). Single-cell tracking through microscopy or sequencing also elucidates real-time cellular dynamics, such as single-cell transcriptomics detailing dynamic mechanisms of cell fate decisions, crucial for identifying cancer precursor cells and therapeutic targets (81).

3.3.1 Brief positive outcomes

Personalized therapeutic approaches as well as adaptive therapy based on real-time observation and response to disease progression stand out as a personalized, evolutionary, and dynamic approach to cancer treatment. This therapy incorporates an evolutionary and ecological model that allows continuous treatment adjustments based on patient response, aiming to apply a stable tumor burden, allowing the survival of chemosensitive cells and suppressing the proliferation of chemoresistant subpopulations, enhancing therapeutic efficacy and minimizing toxicity (64). In summary, the conceptual advancement of adaptive therapy has been adding new methodologies regarding multimodal approaches and also the discovery of new non-invasive imaging biomarkers that can be evaluated with PET/CT (Positron Emission Tomography and Computed Tomography Scans) or MRI (Magnetic Resonance Imaging) images and advanced single-cell tracking microscopy (82, 83).

Finally, experimental and clinical research synergistically connected to mathematical modeling and computational simulations promoting the integration of components and variables faithful to the reality of carcinogenesis, projection, and validation of therapeutic protocols, and translation according to adaptive methodologies, are joined by a multidisciplinary scientific approach integrated with dynamic programming and biophysical studies in the identification of quantum mechanical processes, supplementing innovations to enhance the ability to “educate” or control or “tame” the tumor (84–86). Multidisciplinary research emphasizes controlling cancer by understanding its adaptability to environmental changes and the risks of aggressive treatments, which may inadvertently promote resistant cancer forms. This approach advocates for a blend of comparative, translational, and holistic oncology, along with

single-cell biology, to effectively tackle the complexity of cancer evolution and treatment resistance, stressing the need for adaptable and nuanced therapeutic strategies and, for further clarification on the relationship between translational, adaptive research and cancer, along with multidisciplinary principles, a summary figure of main terms and concepts guiding such discussion were addressed, see Figure 2. Significant progress in cancer biology research necessitates a more inventive and intelligent approach, one that harnesses the power of single-cell biology along with a systems or holistic view of biology. Moreover, staying adaptable to ongoing innovations is crucial for maintaining equilibrium in this challenging field, serving as a foundational pillar for comparative and translational oncology.

Figure 2 - In article online <https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1419599>

3.4 Perspective

This article highlights the broad spectrum of opportunities in oncology that comes from merging genetics insights, bioinformatics, quantum biology, evolutionary biology, systems biology, single-cell biology, translational research, and additional relevant fields. These areas, when combined with teamwork across professions and the embrace of cutting-edge technologies, show great promise in advancing the ways we diagnose, comprehend, and treat cancer. A comprehensive and interdisciplinary strategy, emphasizing energetic interventions, molecular coherence, dynamics of cell migration, among other techniques, is crucial for addressing the complexity of cancer. Such an approach paves the way for more efficient and tailored treatments, underscoring the critical role of innovative practices in modern medicine.

The intersection between quantum biology and modern medicine, as discussed by Restian (87) and Waring (88), reinforces the idea that cancer is a complex system that requires an integrative approach for its understanding and treatment. Carcinogenesis is addressed from multiple perspectives — from genetics and epigenetics to genomic instability and tumor heterogeneity — by Schneider & Kulesz-Martin (89), Sigston & Williams (90), and Uthamacumaran & Zenil (15), pointing to the need for mathematical models and simulations to capture the complexity of

cancer.

Parallely, other innovations are highlighted by Thiong'o & Rutka (91) who discuss the potential of digital twin technology in customizing the treatment of pediatric cancers, while Faramarzpour et al. (92) and Hameroff (93) explore how the principles of quantum mechanics can revolutionize the understanding and therapeutic approach to cancer. Quantum theory, with its implications in quantum entanglement and coherence, offers new perspectives for intracellular communication and the development of less invasive and more effective therapies.

In complement to what was stated by Faramarzpour et al. (92) and Hameroff (93), Jerman et al. (94), and Kaluthanthri et al. (95) add that the importance of molecular dynamics coherence and quantum biology as organizing principles behind the coordination of biological processes can structure the new systemic vision of cancer development, as mechanisms associated with an active role in mediating the flow of energy and information in molecular systems.

Furthermore, Hollar (96) discusses the competition of ecological resonances in the quantum metabolic model of cancer, positioning the tumor as an ecological problem of quantum information, emphasizing the possibility of managing it through quantum information bit quantum (qubit) phase transitions and principles of thermodynamic hysteresis. However, there is also a critical issue being a unique paradigm regarding this complex physiopathological condition, being the ability of biostructures to amplify weak electromagnetic triggers, which provides a basis for transposing cellular destinies that can perpetuate cancer as a disorder (97).

By applying such quantum theoretical approaches, new dynamic models become accessible for evaluating more integrated stages of carcinogenesis, such as cell migration relations, paving advances on nanofabrication and image analysis, detailing cellular motility, and conceptualizing the emergent behavior of cells (98). In consonance, new models also leverage challenging visions like ecological resilience on cancer, which is based on the analysis of interactions between cancerous and normal cells. This suggests a therapeutic approach to the tumor as guiding the system to the attraction basin of a "healing" state, derived from resilience analysis for personalized oncological treatments (99).

As we proceed through modeling and structuring of potential laboratory studies based on initial computational results, chaos theory highlights a new theoretical perspective to explore the complex and often unpredictable dynamics of cancer, being capable of pointing towards possible research directions in radiotherapy, for example (100). But also, when connecting with quantum mechanics and new hypothesis, better descriptions regarding how cells can become cancerous through an increase in entropy, open doors to explore the understanding of tumor evolution and its biological, chemical, physical, and mathematical peculiarities, which are additionally referred to in Table 1.

Table 1 - In article online <https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1419599>

Thus, despite so many novelties, the importance of human and molecular genetics viewed from a multidisciplinary perspective is also observed, according to Ferreira et al. (124), highlighting the relevance of epigenetics, genetic testing, and genetic counseling in the prevention, early diagnosis, and treatment of various tumors. But also, according to Casotti et al. (125–128), a union with bioinformatics as an essential tool in oncogenetics achieves deeper and more accurate analyses in complex cancer cases, through the application of software and platforms as well as methodologies of systems biology and single-cell biology (125–128). Chaos theory, highlighting unpredictability and patterns like the Lorenz attractor, along with quantum theory's focus on atomic and subatomic behavior, contribute to understanding cancer's complexity. These theories illustrate how cancer evolves from order to chaos through continuous molecular, structural, and cellular changes, driven by entropy and time. Additionally, evolutionary and genetic mechanisms act as a “mechanistic bridge”, facilitating the understanding of cancer's progression, genomic instability, cell diversity, and the systemic nature of tumor growth, thus, there is a deep connection between evolutionary and genetic bases along with understandings at atomic levels provided by chaos theory, quantum, and entropy, as outlined in Figure 3.

Figure 3 - In article online <https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1419599>

Amidst such highlights, new initiatives based on single-cell biology, holistics, quantum and evolution become valuable areas for a more detailed elucidation with prominent clinical application through more personalized methodologies and based on adaptive therapy emphasizing the real ability to modulate or control or tame cancer. Therefore, concepts about stress and chaos need to merge with translational approaches across multiple areas of knowledge such as medicine, pharmacy, biology, physics, chemistry, and others, with a common goal, scientific diversity can translate into new effective achievements in oncological treatment and tumor biology, as outlined in Figure 4 which emphasizes the concepts presented throughout this article and probable methodological directions for laboratory studies.

Figure 4 - In article online <https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1419599>

3.4.1 Current technologies

The new technologies and techniques being incorporated into the study of cancer biology stem from increasing interaction between systems biology, evolutionary biology, quantum biology, and single-cell biology. This allows for a more comprehensive understanding of cancer, from identifying new cellular subtypes to understanding mechanisms of drug resistance. In this regard, numerous researchers are investing valuable efforts in increasingly collaborative and integrated research areas.

In parallel, the reconstruction of tumor trajectories using imaging has been complemented by detailed single-cell profiling with multi-omic characterizations, deep phenotyping, and real-time monitoring of evolution and treatment response. This allows for adjustments in therapies according to changes detected in the tumor microenvironment and cell populations (longitudinal, multiscale, and translational monitoring). Furthermore, the use of sustainable bioproducts for developing new, less toxic, and more effective therapies is also being explored.

3.4.1.1 Modelling, imaging, computing, and systems biology

Studies by Rockne et al. (129) highlighted the importance of mathematical oncology, with mathematical models for personalizing cancer treatments. These models enable the creation of individualized screening strategies, therapeutic response predictions, and adaptive treatment plans. Additionally, mathematical models can incorporate various imaging techniques and tumor measurements. Thus, tumor trajectories can be reconstructed during therapy through the integration of multiple measurement modalities, providing precise determination of tumor size changes during treatment and evaluating the response or progression of the disease. This is crucial for implementing therapeutic strategies based on systems biology and evolutionary biology (130).

Systems biology, in combination with modeling, also advocates for the introduction of new software platforms for the management, integration, and analysis of oncological data, such as the Digital Slide Archive (DSA), which encompasses large collections of histological images, integrating them with clinical and genomic metadata. Consequently, digitized histological slides provide high-resolution images that capture cytological and microenvironmental details of tumor tissue, facilitating the visualization and quantitative analysis of these images (131). Given the advancements in imaging, new frontiers in image quantification become accessible to the evolutionary and ecological scope of cancer, emphasizing tumor heterogeneity and the evolutionary dynamics of malignant cells. This is achieved through quantitative image analysis with new machine learning and artificial intelligence techniques, enabling the extraction of mineable data that can be correlated with molecular and cellular properties of tumors. Therefore, a theoretical framework is offered to predict emerging phenotypes, aiding in the development of evolution-based therapies (132).

In line with image quantification, computational efforts have advanced cancer research by including computational biology and artificial intelligence (AI) technology. This is justified as omics and molecular advances have presented unprecedented opportunities, but also require new approaches to capture, organize, and analyze large-scale heterogeneous data. Thus, the combination of experimental and computational methods has embraced comprehensive, integrated, and translational

understandings in elucidating tumor biology, leading to more accurate diagnoses and more effective therapies (133). In view of this, AI has been enhancing FDA-approved medical devices capable of extracting relevant information from vast medical data sets, facilitating more precise diagnoses and personalized treatments, and in the process of new drug discovery, through the precision of models and integration of complex data (134).

3.4.1.2 Multi-omics and single-cell

The evolution of understanding about tumor biology has significantly benefited from advances in sequencing and data analysis technologies, especially in the context of intratumoral heterogeneity and cancer evolution dynamics. Several studies contribute to forming a detailed and integrated view of this complexity, combining single-cell approaches with advanced computational strategies and integration of multi-omic data.

Aparicio et al. (135) expanded the analysis of tumor evolution by utilizing single-cell genomic sequencing. They combined mathematical and computational methods to analyze topological data, creating simplified skeletal graphs representing high-dimensional data geometry. This approach revealed the complexity and variation among cancerous and healthy cells, offering a granular view of cellular heterogeneity in tumors, crucial for understanding cancer progression and adaptation at the cellular level.

Complementing this view, Stransky et al. (136) highlighted the integration of “omic” information into dynamic models using both “bottom-up” and “top-down” strategies. The “bottom-up” strategy derives experimental information about the structure and relationships between biological system components, while the “top-down” approach applies theoretical knowledge to model system mechanisms and dynamics. The combination of these strategies allowed for the creation of multi-scale models covering mechanistic details and a broad view of biology, essential for understanding the complexity of cancer systems.

Nam et al. (137) emphasized the importance of integrating genetic and non-genetic determinants in cancer evolution using emerging single-cell multi-omics technologies.

These technologies captured and integrated multiple data modalities, analyzing cellular states, epigenetic profiles, spatial distributions, and interactions with the tumor microenvironment. This detailed analysis revealed intratumoral diversity as a crucial factor in progression, relapse, and treatment resistance.

To address the integration of these complex data, Adossa et al. (138) added computational strategies for integrating single-cell multi-omic data. They categorized integration approaches as early, intermediate, and late. Intermediate integration, for example, used joint dimensionality reduction and statistical modeling, allowing integrated analysis of different omic layers. This provided a deeper understanding of cellular heterogeneity in tumors and helped identify cell differentiation trajectories.

Delving into the potential of single-cell RNA sequencing to explore tumor heterogeneity at spatial levels, Ahmed et al. (139) discussed the benefits associated with techniques like Drop-Seq and SCRB-Seq, which allowed profiling of the transcriptome of individual cells, revealing the complexity of cell composition in tumors. Advances in spatial sequencing, such as MERFISH and FISSEQ, map gene expression to the physical location of cancerous tissues, providing insights into the spatial organization of tumor cells.

Furthermore, Casado-Vela et al. (140) discuss the importance of integrating omics approaches with advances in mass spectrometry and other high-precision technologies, which have allowed identification and quantification of biomolecules on a large scale, providing fundamental data for cancer research. Simultaneously, regarding advances in single-cell expression profiling, Gonzalez Castro et al. (141) highlighted the valuable benefits from single-cell genomics and transcriptomics techniques, revealing intratumoral heterogeneity (ITH), identifying cell subpopulations influencing cancer progression and drug resistance. These advanced methods have enabled the analysis of multiple tumor aspects, including genome, transcriptome, epigenome, and proteome, providing deep insights into tumor evolution, interactions with the tumor microenvironment, and therapeutic response.

3.4.1.3 Innovations

Beyond the aforementioned advancements, new breakthroughs are being made in

the interplay between engineering, holistic approaches, laboratory practice, and cancer. Weltin et al. (142) introduced an innovative multiparametric microphysiometric system to dynamically monitor the metabolism of human cancer cells. This system integrates chemical sensors and biosensors on a glass microchip, enabling precise measurements of pH, oxygen, glucose, and lactate in cell cultures. The use of such microfluidics provides detailed control and continuous analysis of cellular metabolism, offering valuable insights into the response of cancer cells to different treatments and the evolution of their metabolism.

Concurrently, Lovitt et al. (143) highlighted the importance of three-dimensional (3D) cell culture techniques in cancer drug discovery. They argue that 3D cell cultures are more representative of the in vivo tumor microenvironment compared to two-dimensional (2D) cultures, allowing for a more realistic investigation of mechanical processes and drug resistance. The adoption of 3D models in drug discovery programs is becoming more common, with methods including non-adherent cell cultures (anchorage-independent) and 3D structures that adhere to a substrate (anchorage-dependent), essential for better understanding the mechanisms of drug action and their efficacy.

The issue of drug resistance in cancer treatment is addressed by Craig et al. (144), who highlight how medical engineering, including nanotechnology and computational modeling, is being used to tackle this challenge. Nanotechnology has revolutionized drug delivery, allowing for the selective destruction of tumor cells and overcoming failures in immunotherapies. Bioengineered tumor models create physiologically relevant environments to predict clinical refractoriness and test drug combinations, personalizing treatment for each patient.

Furthermore, Gao et al. (145) emphasize the crucial role of holistic approaches in optimizing biotechnological processes and improving the efficiency of extracting and transforming biological materials into high-value products. In the oncological context, these technologies are applied to develop new biomarkers and therapeutic agents from renewable sources, contributing to more sustainable and personalized treatments.

The integration of systems biology, evolutionary biology, quantum biology, and

single-cell biology is creating new frontiers in cancer research. The technologies and techniques described by the authors provide a robust foundation for tackling the complexity of cancer, offering hope for the development of more effective and personalized therapies. The combination of these disciplines allows for a deeper and more detailed understanding of tumor complexity, enabling the development of innovative and personalized therapeutic strategies. The ability to monitor and respond to changes in the tumor at the cellular and molecular levels promises to significantly improve outcomes for cancer patients, marking a new era in precision medicine. In summary, the convergence of these technologies and techniques in the various aforementioned fields foresees new interdisciplinary, collaborative, and integrated pathways.

3.4.2 Challenges and limitations

The integration of different fields in cancer research faces numerous challenges and limitations, such as understanding genomic heterogeneity and the continuous evolution of tumors, the complexity of polyploidy in organisms, and the dynamics of chromosomal rearrangements in cancer immortality, among other highlights. Thus, these highlights demand multidisciplinary approaches and advanced analytical methods for a more comprehensive understanding of cancer biology, essential for developing more effective and personalized therapeutic strategies. Studies indicate the need for an integrated approach that considers evolutionary complexity, tumor heterogeneity, and the temporal order of biological events in cancer development. To overcome these challenges, a combination of basic research, the development of new technologies, and careful clinical application is necessary to translate advances in cancer biology into better patient outcomes. This is well represented by the works of Anand et al. (146), Blischak et al. (147), Duesberg & McCormack (148), Enriquez-Navas et al. (149), Gallaher et al. (150), and Gourmet et al. (151).

This is because researchers like Anand et al. (146), focusing on the genomic heterogeneity and continuous evolution of malignant brain tumors, such as glioblastomas, have highlighted the importance of multi-omics profiles to improve personalized therapeutic strategies. Blischak et al. (147) addressed the complexity of

polyploidy in organisms, discussing the influence of the environment on the selection of ploidy levels in fungi and phylogenetically shared in tumors. Duesberg & McCormack (148) proposed a chromosomal theory of immortality in cancers, suggesting that clonal and flexible chromosomal rearrangements generate cancer immortality, and developing techniques targeted at these rearrangements is immensely useful but very challenging.

In parallel, Enriquez-Navas et al. (149), Gallaher et al. (150), and Gourmet et al. (151) highlight the obstacles faced when trying to incorporate evolutionary and systems approaches into cancer therapy. Enriquez-Navas et al. argue that cancers develop resistance immediately after the application of any therapy, suggesting the need for adaptive strategies. Gallaher et al. emphasize the importance of precise measurement of tumor burden over time for effective therapeutic decisions. Gourmet et al. identify a temporal order of cancer hallmarks, suggesting that genomic instability is the first hallmark and immune evasion the last, highlighting the complexity of translating bioinformatics discoveries into clinical practice.

Supplementing the above, the different aspects of cancer biology represent a challenge for creating targeted clinical interventions. Thus, the integration of external data with phylogenetic trees provides a valuable source of information, but complex due to the diversity of formats and external data, presenting barriers to visualization given the complexity of multidimensional information. Moreover, high-quality data sets and technical challenges for temporal analysis and understanding chaotic systems add to existing obstacles.

However, despite the present difficulties, numerous researchers have achieved prominent accomplishments, such as Hardie et al. (152) discussing genome size variation and measurement technique limitations; Huang et al. (153) with solutions to the complexity of regulatory networks in tumorigenesis; Jiao et al. (43) with hypotheses on the role of dormant cancer cells, especially *PGCCs*; Kirsch-Volders et al. (154) exploring the role of tetraploidy in cancer development and the challenges in understanding the relationship between tetraploidization and carcinogenesis; Li et al. (155) advancing in technical challenges and eliminating artifacts brought by single-cell sequencing technologies; Lidke et al. (156), Jana et al. (157), and Mirzayans

(158) emphasizing the importance of the tumor microenvironment in modulating dysfunctional cellular processes that drive malignant transformation and treatment resistance, highlighting the need for more sophisticated therapeutic approaches.

Beyond highlights associated with deeply biological issues, challenges and limitations are present in connecting biology with profound mathematical, computational, and physical content. This is due to the negative preconception among biologists towards the involvement of calculations. However, works like Pell et al. (159) highlight the potential use of computational areas by digital pathology technologies to improve tumor evaluation and treatment response; attractor landscape analyses, as proposed by Shin and Cho (160), and the educational strategies suggested by Škarková et al. (161), aimed at re-educating cancer cells, face significant challenges in practical implementation from experimental perspectives, but also regarding mathematical modeling, as explicitly stated by West et al. (84) in exploring adaptive therapy through mathematical modeling and verifying the need for rigorous clinical validation. Furthermore, Uthamacumaran & Zenil (15) and Uthamacumaran (162) highlight the importance of understanding the physics that permeates the dynamic systems of cancer, emphasizing the need for detailed temporal data and causal inference methods, exacerbating statistical challenges. Adding to the physical aspect, understanding the biophysical properties of cancer cells and the tumor microenvironment can offer new insights into identifying effective therapeutic targets and improving treatment evaluation and follow-up, as highlighted by Xuan et al. (163), but at the same time accompanied by conceptual and technical challenges. In new technological pathways, Uthamacumaran (46) proposes the potential of combining single-cell technologies and computational models to provide deeper hypotheses and ideas about cellular cybernetics and the prediction of cellular fates in precision oncology. However, these advances depend on greater collaboration between disciplines, the development of new technologies, and the adaptation of concepts from complex systems and cellular cybernetics to understand and treat cancer more effectively.

In this aspect, although significant advances have been made, the effective integration of various disciplines in oncology requires a collaborative approach,

overcoming technical, computational, and conceptual challenges. Thus, the union of efforts can transform cancer into a manageable chronic disease, prolonging patient survival and improving their quality of life. Therefore, more studies and collaborations are needed to overcome the challenges and limits and translate these promises into tangible clinical benefits, as compiled in Figure 5 below.

Figure 5 - In article online <https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1419599>

4 Conclusion

This article aimed to explore the complex intersection of evolutionary biology, single-cell biology, systems biology, comparative oncology, translational research, quantum biology, and chaos theory in cancer research, while also paving new avenues for enhanced flexibility in the increasingly multidisciplinary, cooperative, and open field of oncology research. It emphasized the critical need for integrating knowledge from biology, physics, chemistry, informatics, and engineering, highlighting the potential for significant advancements that could transform personalized and adaptive cancer therapies. This integration is poised to forge new healthcare models aligning with One Health and sustainable development principles, design adaptable clinical trials with real-time monitoring, discover novel compounds and biomarkers via single-cell analysis, consider bioeconomic factors, minimize treatment side effects, and improve patient quality of life. Single-cell biology has sparked a revolution in grasping the diversity of cancer, enabling the creation of more precise and personalized treatments. Adaptive and translational research has further sped up the translation of scientific breakthroughs to clinical applications, swiftly adapting to the unique requirements of each patient and the dynamic nature of cancer. The merger of systems biology with quantum physics is opening up innovative ways to understand cancer's intricacies, though the application of these insights to develop concrete treatments remains in the nascent stages.

References - In article online <https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1419599>

CONSIDERAÇÕES - Artigo 2

Este artigo salienta que:

1 Os desafios no tratamento do câncer continuam centrados na resistência a tratamentos e na ausência de cura definitiva, refletindo a complexidade e heterogeneidade dos tumores que impedem respostas padronizadas aos medicamentos.

2 A Teoria da Mutação Somática demonstrou limitações, exigindo novos paradigmas que integrem conceitos evolutivos, onde o câncer, por processos darwinianos e princípios de entropia, adota estratégias ancestrais como poliploidia e fusão celular, similares a organismos primitivos.

3 A plasticidade e adaptação tumoral permitem alternância entre características unicelulares e multicelulares, intensificadas pela instabilidade genômica e epigenética, que promovem heterogeneidade intratumoral, resistência e progressão.

4 Abordagens interdisciplinares que integram biologia evolutiva, física quântica e teoria do caos mostram-se essenciais para compreender a dinâmica tumoral, ao mesmo tempo em que terapias inovadoras exploram "armadilhas evolutivas" e sinergias disciplinares. A história evolutiva do câncer remonta a organismos ancestrais e fósseis de dinossauros, indicando origens genéticas de mais de 600 milhões de anos, com processos colaborativos e competitivos refletindo interações microambientais.

5 A integração de biologia de sistemas, dados multiômicos e computação avançada é essencial para terapias personalizadas, enquanto modelos matemáticos e inteligência artificial promovem estratégias adaptativas e previsões terapêuticas. Em conjunto, a biologia quântica introduz novos conceitos como sincronicidade e estados de coerência para compreender dinâmicas celulares complexas, e tecnologias emergentes, como sequenciamento de célula única e espectrometria de massas, mapeiam a heterogeneidade tumoral e identificam alvos terapêuticos. Modelagem matemática e biologia computacional permitem personalização de tratamentos e análise da evolução dinâmica do câncer, apesar de desafios como integração de dados e validação experimental.

6 Iniciativas sustentáveis priorizam bioprodutos menos tóxicos, qualidade de vida e o

controle do tumor como condição crônica. A medicina de precisão, impulsionada por avanços tecnológicos e estratégias adaptativas, visa transformar o manejo do câncer em abordagens mais eficazes, sustentáveis e centradas no paciente, enquanto esforços multidisciplinares continuam enfrentando a complexidade intrínseca e a imprevisibilidade dos sistemas caóticos que caracterizam a oncologia moderna.

Em suma, com base nos conteúdos apresentados neste artigo e aqui salientados em tópicos de 1 ao 6, observa-se que esta pesquisa de mestrado provém de uma articulação proeminente com o intuito de buscar atingir o problema de pesquisa referente ao estudo da complexidade dos gliomas e suas respostas adaptativas, focalizando em GB. Assim, o que há de perspectivas aplicáveis aos Gliomas são as abordagens interdisciplinares, como biologia evolutiva, física quântica e teoria do caos, que permitem entender a dinâmica tumoral de uma forma mais holística. Apesar de tais disciplinas desafiadoras, esta dissertação inicia tal caminhada por meio da união de resultados *in silico*, *in vitro* e translacionais perante a tendência holística e demandando uma extrapolação teórica complexa para entender as interações presentes nos gliomas. Com isso, esse artigo suplementa a proposta dessa dissertação, principalmente na capacidade de entender o câncer de forma conectada e multidisciplinar.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta pesquisa piloto inicial acerca das potenciais relações entre as adaptações de respostas celulares aos estresses em CNSCs pela indução de variação de ploidia. Em consequência, apresentou-se uma solução inovadora preliminar para o problema identificado, sendo organizada de forma a maximizar a clareza e a relevância dos resultados obtidos. Em consonância, salientou-se as limitações e aprimoramentos necessários em cada etapa integrada do estudo. Isto porque, diferentemente de outras pesquisas, aqui encontram-se as associações entre estudo *in silico*, *in vitro* e translacional como camadas de uma história evolutiva tumoral aplicada a um conjunto de tumores agressivos e heterogêneos. Dessa maneira, neste visou-se a natureza específica da solução proposta. Para tanto, somente informações principais e em sinergia entre todas as associações supracitadas foram apresentadas para garantia de uma fluidez nas elucidações pretendidas. Nesse sentido, as subdivisões desse tópico seguiram uma relação dos resultados obtidos juntamente com a discussão em sequência e representando cada fase dos estudos desenvolvidos.

7.1 Curadoria Manual e Extração de Dados do BioGrid

Obteve-se um total de 171 artigos, assim como evidencia a tabela 1, dos quais foram utilizados um total de 43 artigos, frente a seleção de artigos únicos, não repetidos e que foram submetidos a diversos critérios bem organizados e planejados previamente, como são evidenciados na tabela 2 e 3. E por conseguinte, para a montagem da rede de interação proteína-proteína, foram selecionadas as proteínas e todas as suas isoformas, incluindo também os genes que são responsáveis pela sua origem. Utilizando-se do *Uniprot*, sendo incluídos os dados das proteínas revisadas (*Swiss-Prot*).

Tabela 1: Relação da curadoria manual diante dos bancos de dados e número de artigos

| Banco de Dados | Quantidade de Artigos |
|----------------|-----------------------|
| PUBMED | 33 |
| EMBASE | 36 |
| SCOPUS | 36 |
| <i>Science</i> | 0 |

| | |
|-----------------------------|-----|
| <i>Nature</i> | 19 |
| <i>Web of Science</i> | 36 |
| <i>Wiley Online Library</i> | 5 |
| <i>ScienceDirect</i> | 6 |
| Total | 171 |

Tabela 2: Organização entre artigos repetidos e não repetidos e totalidade

| Organização dos artigos sobre <i>PGCCs/MNGCs</i> | Quantidade |
|---|-------------------|
| <i>Artigos únicos que se repetem (A)</i> | 39 |
| <i>Quantidade de artigos replicados (B)</i> | (+) 79 |
| Artigos repetidos (A + B) | 118 |
| Artigos não repetidos | 53 |
| Artigos totais | 171 |

Tabela 3: Critérios de seleção de artigos para busca de proteínas

| Critérios | Descrição dos Critérios |
|------------------|--|
| Inclusão | <ul style="list-style-type: none"> - Possuir no título as palavras e suas correlatas com possíveis modificações pontuais: <i>polyploid giant cancer cells</i> e/ou <i>giant polyploid cancer cells</i>. - Artigos de revisão e experimentais que trabalham em câncer - Artigos de revisão e experimentais que trabalham em humanos - Artigos com texto com acesso completo |
| Exclusão | <ul style="list-style-type: none"> - Artigos que não possuam nos títulos as palavras citadas no critério de inclusão - Artigos de revisão e experimentais que não trabalham em câncer - Artigos de revisão e experimentais que não trabalham em humanos - Artigos com texto sem acesso completo |

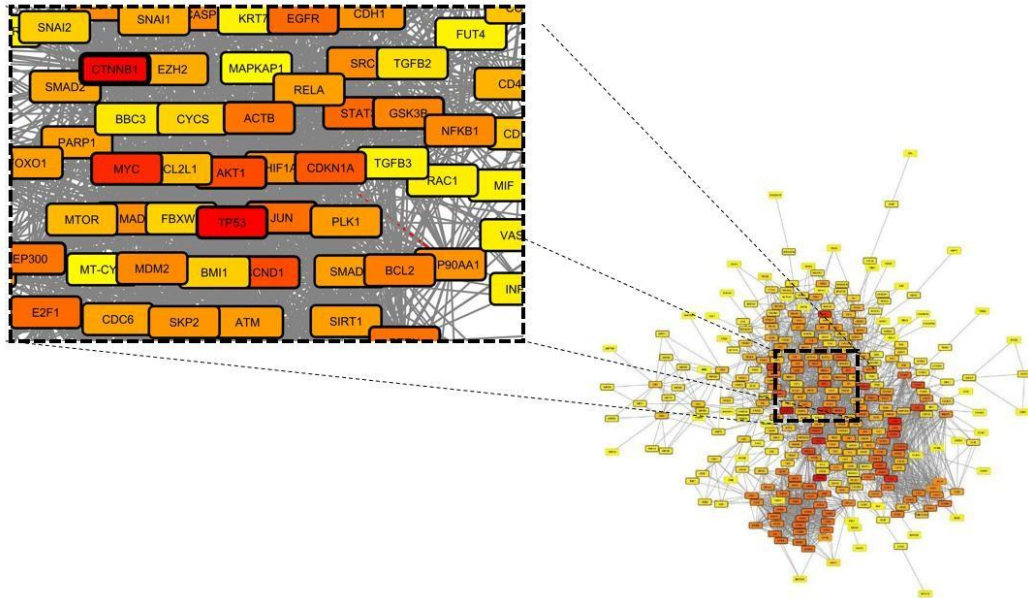
Em paralelo, com a utilização do banco de dados BioGRID, versão 4.4, extraiu-se um compilado de 198 proteínas, agrupadas segundo o Projeto GB feito a partir da pesquisa de 7.163 publicações. Assim, visou-se comparar os dados funcionais representativos para as *PGCCs/MNGCs* com os resultados particulares para GB.

7.2 Rede de Interação Proteica para *PGCCs/MNGCs* e GB

Para a Rede de *PGCCs/MNGCs* foram identificadas e pesquisadas no site do STRING um total de 383 proteínas, assim, foram verificadas tais proteínas a uma alta confiança (0,7) adicionando um total de 100 interatores. Assim, obteve-se uma

rede com 483 nós e 6472 arestas (vide figura 1). Em consonância, em uma avaliação topológica pela utilização do *NetworkAnalyzer*, alcançou-se os dados em destaque na tabela 4.

Figura 1: Rede de Interação Proteína-Proteína Principal acerca das *PGCCs/MNGCs*



Legenda: Espessura da borda do nó representa a centralidade de intermediação em cor preta - RGB (0,0,0). A variação de cor do nó de amarelo - RGB (255,255,0) - para vermelho - RGB (255,0,0) - representa a ordem crescente do valor do grau.

Tabela 4: Parâmetros Topológicos da Rede de Interação Proteína-Proteína Principal

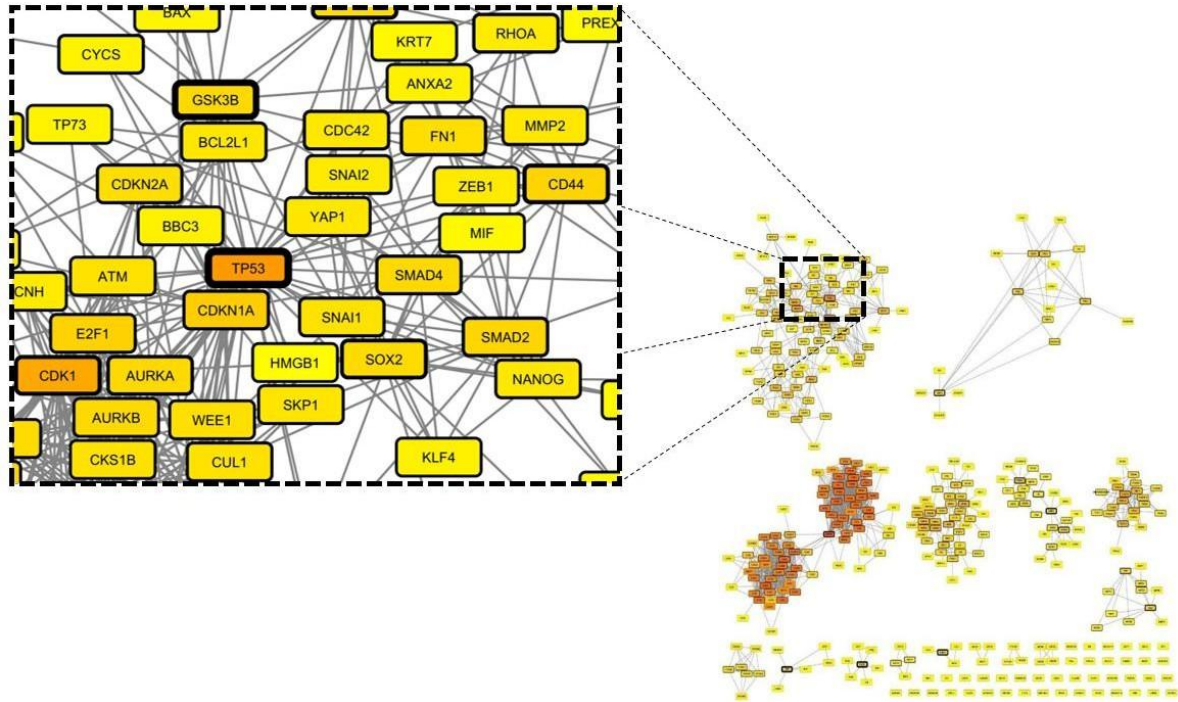
| Termos | Descrição Estatística |
|---------------------------------------|-----------------------|
| Grau | $\mu = 13$ |
| Diâmetro da Rede | 9 |
| Comprimento do Caminho Característico | 2,574 |
| Coefficiente de Agrupamento | 0,507 |
| Heterogeneidade da Rede | 0,830 |
| Centralidade de Intermediação | $\mu = 6,80916E+11$ |

μ - Valor médio calculado pela média aritmética dos valores diferentes de zero.

Quanto aos clusters/módulo foi aplicado o algoritmo do MCODE com os parâmetros *default* somado com *fluff*, visando alcançar um entendimento modular e complexo das múltiplas ações de algumas proteínas. Foram obtidos 15 módulos, que foram

formatados conforme os parâmetros da rede principal quanto aos dados de grau e centralidade de intermediação (vide figura 2).

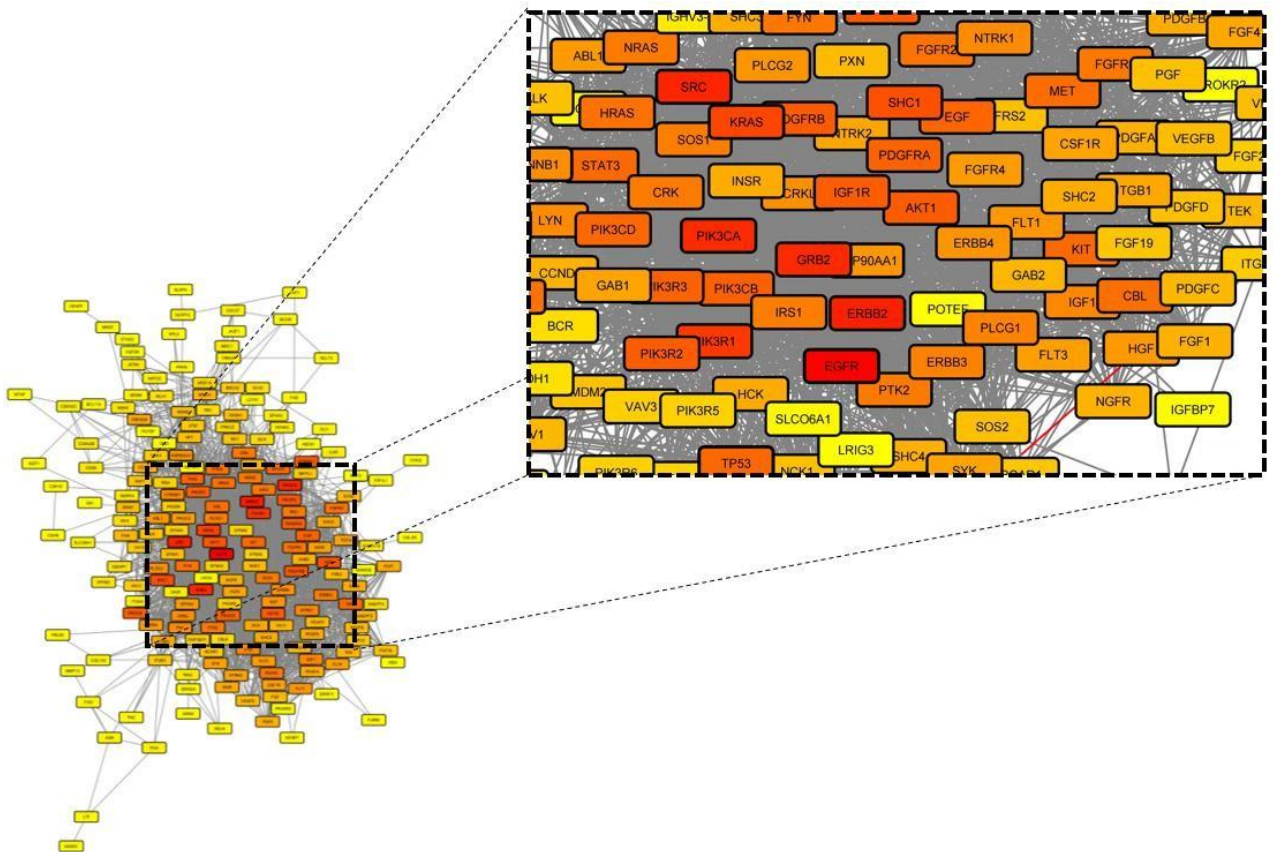
Figura 2: Módulos (*Clusters*) da Rede de *PGCCs/MNGCs*



Legenda: Módulos organizados de agrupamentos de maior quantidade de proteínas em direção à menor quantidade. Espessura da borda do nó representa a centralidade de intermediação em cor preta - RGB (0,0,0). A variação de cor do nó de amarelo - RGB (255,255,0) - para vermelho - RGB (255,0,0) - representa a ordem crescente do valor do grau.

Quanto à rede do GB, seguiram-se os mesmos parâmetros da Rede de *PGCCs/MNGCs*. Por meio disso, obteve-se uma rede principal com 298 nós e 2596 arestas (vide figura 3). E quanto análise topológica destacam-se os resultados na tabela 5.

Figura 3: Rede de Interação Proteína-Proteína Principal acerca do GB



Legenda: Espessura da borda do nó representa a centralidade de intermediação em cor preta - RGB (0,0,0). A variação de cor do nó de amarelo - RGB (255,255,0) - para vermelho - RGB (255,0,0) - representa a ordem crescente do valor do grau.

Tabela 5: Parâmetros Topológicos da Rede de Interação Proteína-Proteína Principal de GB

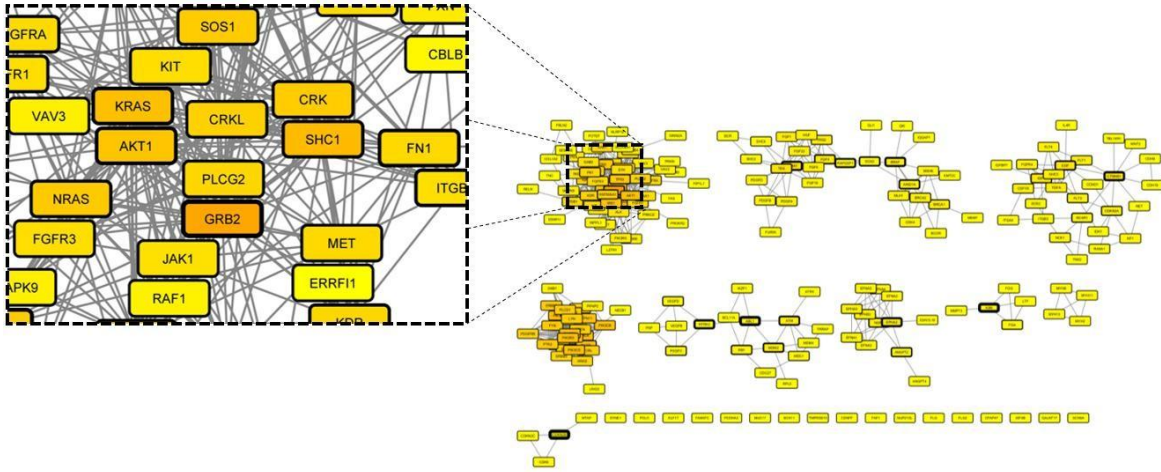
| Termos | Descrição Estatística |
|---------------------------------------|-----------------------|
| Grau | $\mu = 17$ |
| Diâmetro da Rede | 7 |
| Comprimento do Caminho Característico | 2,335 |
| Coefficiente de Agrupamento | 0,484 |
| Heterogeneidade da Rede | 0,863 |
| Centralidade de Intermediação | $\mu = 9,88781E+11$ |

μ - Valor médio calculado pela média aritmética dos valores diferentes de zero.

Quanto aos clusters/módulos, foram identificados na Rede de GB assim como feito para a Rede de *PGCCs/MNGCs*, assim, foi possível observar 11 clusters/módulos

(vide figura 4).

Figura 4: Módulos (*Clusters*) da Rede de Interação Proteína-Proteína Principal referente ao GB



Legenda: Módulos organizados de agrupamentos de maior quantidade de proteínas em direção à menor quantidade. Espessura da borda do nó representa a centralidade de intermediação em cor preta - RGB (0,0,0). A variação de cor do nó de amarelo - RGB (255,255,0) - para vermelho - RGB (255,0,0) - representa a ordem crescente do valor do grau.

Em suma, segundo comparativo para com outros autores, obteve-se uma análise topológica muito representativa de redes naturais biológicas, comportando uma boa distribuição de grau livre de escala (lei de potência) perpassando uma boa parcela dos graus abaixo de um valor médio de grau, considerado pela média aritmética de todos os graus, significando a presença da maioria dos nós não sendo *hubs*. Em acréscimo, a rede apresentou um pequeno comprimento médio do caminho mais curto, significando a presença de poucas conexões de longa distância, a qual se destacou a presença da propriedade de “mundo pequeno”. Outrossim, notou-se uma boa distribuição desassortativa, ou seja, nós com muitas conexões demonstraram uma tendência a interações com nós com poucas conexões, além de se destacar uma boa organização modular. Além disso, demonstrou-se um valor de heterogeneidade da rede factível com redes biológicas naturais e também um bom coeficiente de agrupamento representando uma coesão e uma íntima relação entre as proteínas (Watts; Strogatz, 1998; Ravasz *et al.*, 2002; Maslov; Sneppen, 2005; Dong; Horvath, 2007; Doncheva *et al.*, 2012; Yadav; Shukla; Singh, 2022).

7.3 Análise Funcional da Rede Principal e Módulos/Clusters da referente às *PGCCs/MNGCs*

Ao prosseguir com a análise funcional através do enriquecimento de vias, obteve-se informações correlacionáveis com aspectos moleculares, evolutivos, celulares e biofísicos. Sendo que, para isto, o conjunto de proteínas sementes (inseridas no estudo após curadoria manual) foi associado ao conjunto de referência baseado no genoma, correlacionando-se a ontologia genética (processo biológico, componente celular e função molecular), vias de *KEGG* e vias do *Reactome*, como destacado na tabela 6 e 7. Dessa forma, são expostas as interlocuções obtidas dos dados funcionais, por meio de quatro subtópicos de integração: Integração I: Sinalização Celular; Integração II: Controle do ciclo celular; Integração III: Auto-organização Celular; e Integração IV: Metabolismo Lipídico.

Tabela 6: Avaliação Funcional da Rede Principal para *PGCCs/MNGCs*

| Categoria | Descrição | FDR |
|-------------------------|---|------------|
| GO Processo Biológico | Regulação da atividade catalítica (GO:0050790) | 1.32E-76 |
| GO Componente Celular | Citosol (GO:0005829) | 1.19E-37 |
| GO Função Molecular | Ligação de trifosfato de ribonucleosídeo de purina (GO:0035639) | 4.36E-44 |
| Vias do <i>KEGG</i> | Vias/Caminhos no câncer (hsa05200) | 5.81E-79 |
| Vias do <i>Reactome</i> | Transdução de sinal (HSA-162582) | 1.69E-90 |

Tabela 7: Avaliação Funcional dos clusters/módulos para a Rede de *PGCCs/MNGCs*

| Módulos | Categorias | Descrição | FDR |
|----------------|-----------------------|---|------------|
| Módulo 1 | GO Processo Biológico | Regulação do ciclo celular (GO:0051726) | 2.82E-50 |
| | GO Componente Celular | Complexo holoenzimático de proteína quinase dependente de ciclina (GO:0000307) | 5.26E-51 |
| | GO Função Molecular | Atividade reguladora da proteína serina/treonina quinase dependente de ciclina (GO:0016538) | 1.37E-41 |
| | Vias de <i>KEGG</i> | Ciclo celular (hsa04110) | 2.18E-52 |

| | | | |
|----------|-------------------------|--|----------|
| | Vias de <i>Reactome</i> | Doença (HSA-1643685) | 3.02E-46 |
| Módulo 2 | GO Processo Biológico | Regulação da transdução de sinal (GO:0009966) | 2.46E-60 |
| | GO Componente Celular | Nucleoplasma (GO:0005654) | 2.81E-24 |
| | GO Função Molecular | Regulação da função molecular (GO:0065009) | 1.04E-38 |
| | Vias de <i>KEGG</i> | Vias no câncer (hsa05200) | 2.31E-52 |
| | Vias de <i>Reactome</i> | Doenças de transdução de sinal por receptores de fator de crescimento e segundos mensageiros (HSA- 5663202) | 1.9E-49 |
| Módulo 3 | GO Processo Biológico | Regulação da transdução de sinal (GO:0009966) Regulação positiva do processo metabólico celular (GO:0031325) | 1.03E-43 |
| | GO Componente Celular | Complexo contendo proteínas (GO:0032991) | 9.17E-23 |
| | GO Função Molecular | Ligação proteica (GO:0005515) Ligação enzimática (GO:0019899) | 8.69E-25 |
| | Vias de <i>KEGG</i> | Shigelose (hsa05131) | 1.21E-42 |
| | Vias de <i>Reactome</i> | Transdução de sinal (HSA-162582) | 4.33E-38 |
| Módulo 4 | GO Processo Biológico | Organização do citoesqueleto de microtúbulos (GO:0000226) | 4.05E-27 |
| | GO Componente Celular | Microtúbulos (GO:0005874) | 1.32E-29 |
| | GO Função Molecular | Constituinte estrutural do citoesqueleto (GO:0005200) | 1.63E-31 |
| | Vias de <i>KEGG</i> | Junção Gap (hsa04540) | 6.74E-31 |
| | Vias de <i>Reactome</i> | Tráfego dependente de microtúbulos de conexons de Golgi para a membrana plasmática (HSA-190840) | 4.35E-39 |
| Módulo 5 | GO Processo Biológico | Processo biossintético de ácidos graxos (GO:0006633) | 4.7E-12 |
| | GO Componente Celular | Complexo de proteína quinase ativado por nucleotídeos (GO:0031588) | 1.22E-15 |
| | GO Função Molecular | Atividade de proteína quinase ativada por AMP (GO:0004679) | 1.45E-15 |
| | Vias de <i>KEGG</i> | Ritmo circadiano (hsa04710) | 1.59E-17 |
| | Vias de <i>Reactome</i> | Regulação dependente de energia de mTOR por LKB1-AMPK (HSA- 380972) Ativação de AMPK downstream de NMDARs (HSA-9619483) | 5.36E-17 |

| | | | |
|-----------|-------------------------|---|----------|
| Módulo 6 | GO Processo Biológico | Via de sinalização de Wnt canônico (GO:0060070) | 1.57E-32 |
| | GO Componente Celular | Membrana da vesícula endocítica (GO:0030666) | 7.82E-8 |
| | GO Função Molecular | Ligação a Frizzled (GO:0005109) | 3.78E-31 |
| | Vias de <i>KEGG</i> | Carcinoma de células basais (hsa05217) | 4.41E-36 |
| | Vias de <i>Reactome</i> | Biogênese e tráfico de ligantes WNT (HSA-3238698) | 4.19E-30 |
| Módulo 7 | GO Processo Biológico | Regulação da transdução de sinal (GO:0009966) Regulação do processo de modificação de proteínas (GO:0031399) | 6.57E-25 |
| | GO Componente Celular | Junção celular (GO:0030054) | 8.13E-10 |
| | GO Função Molecular | Ligação de proteína quinase (GO:0019901) | 4.1E-12 |
| | Vias de <i>KEGG</i> | Proteoglicanos no câncer (hsa05205) | 5.13E-19 |
| | Vias de <i>Reactome</i> | Doenças de transdução de sinal por receptores de fator de crescimento e segundos mensageiros (HSA-5663202) | 1.53E-16 |
| Módulo 8 | GO Processo Biológico | Morfogênese celular envolvida na diferenciação (GO:0000904) Via de sinalização do receptor do fator de crescimento endotelial vascular (GO:0048010) | 1.57E-12 |
| | GO Componente Celular | Junções de ancoramento (GO:0070161) | 1.08E-6 |
| | GO Função Molecular | Ligação de integrina (GO:0005178) | 6.02E-5 |
| | Vias de <i>KEGG</i> | Adesão Focal (hsa04510) | 6.33E-18 |
| | Vias de <i>Reactome</i> | Via VEGFA-VEGFR2 (HSA-4420097) | 4.69E-12 |
| Módulo 9 | GO Processo Biológico | Regulação negativa do transporte de colesterol (GO:0032375) | 2.8E-5 |
| | GO Componente Celular | Complexo transportador de cassete de ligação de ATP (ABC) (GO:0043190) | 5.84E-11 |
| | GO Função Molecular | Atividade do transportador transmembranar acoplado a ATPase (GO:0042626) | 2.44E-6 |
| | Vias de <i>KEGG</i> | Transportadores ABC (hsa02010) | 1.17E-8 |
| | Vias de <i>Reactome</i> | Transporte mediado por proteínas da família ABC (HSA-382556) | 1.7E-6 |
| Módulo 10 | GO Processo Biológico | Meiose I (GO:0007127) | 1.51E-5 |

| | | | |
|-----------|-------------------------|--|---------|
| | GO Componente Celular | Complexo Sinaptonêmico (GO:0000795) | 4.14E-8 |
| | GO Função Molecular | - | - |
| | Vias de <i>KEGG</i> | - | - |
| | Vias de <i>Reactome</i> | Sinapse Meiótica (HSA-1221632) | 2.26E-7 |
| Módulo 11 | GO Processo Biológico | Processo catabólico de ácidos graxos de cadeia muito longa (GO:0042760) | 5.76E-7 |
| | GO Componente Celular | Membrana peroxissomal (GO:0005778) | 5.4E-5 |
| | GO Função Molecular | Atividade do transportador transmembranar acoplado a ATPase (GO:0042626) | 4.6E-4 |
| | Vias de <i>KEGG</i> | Transportadores ABC (hsa02010) | 4.65E-6 |
| | Vias de <i>Reactome</i> | Transportadores ABC na homeostase lipídica (HSA-1369062) Importação de proteína de membrana peroxissomal de classe I (HSA- 9603798) | 2.31E-6 |
| Módulo 12 | GO Processo Biológico | Regulação positiva da montagem do autofagossomo (GO:2000786) | 2.94E-6 |
| | GO Componente Celular | Autofagossomo (GO:0005776) | 2.0E-4 |
| | GO Função Molecular | Atividade de 1-fosfatidilinositol-5- fosfato 4-quinase (GO:0016309) | 5.18E-8 |
| | Vias de <i>KEGG</i> | Metabolismo do inositol fosfato (hsa00562) | 1.89E-5 |
| | Vias de <i>Reactome</i> | Síntese de PIPs no núcleo (HSA- 8847453) | 6.09E-8 |
| Módulo 13 | GO Processo Biológico | Sinalização mediada por fosfatidilinositol (GO:0048015) | 3.46E-7 |
| | GO Componente Celular | - | - |
| | GO Função Molecular | Atividade de 1-fosfatidilinositol 4- quinase (GO:0004430) | 0.0053 |
| | Vias de <i>KEGG</i> | Sistema de sinalização de fosfatidilinositol (hsa04070) | 7.16E-6 |
| | Vias de <i>Reactome</i> | Metabolismo de PI (HSA-1483255) | 2.87E-5 |
| Módulo | GO Processo Biológico | Comprometimento do destino celular envolvido na formação da camada germinativa primária (GO:0060795) | 1.8E-4 |
| | GO Componente Celular | - | - |

| | | | |
|-----------|-------------------------|---|---------|
| 14 | GO Função Molecular | - | - |
| | Vias de <i>KEGG</i> | - | - |
| | Vias de <i>Reactome</i> | Regulação transcricional de células- tronco pluripotentes (HSA- 452723) | 2.03E-5 |
| Módulo 15 | GO Processo Biológico | Reparo de quebra de dupla fita (GO:0006302) | 1.01E-5 |
| | GO Componente Celular | - | - |
| | GO Função Molecular | - | - |
| | Vias de <i>KEGG</i> | Recombinação homóloga (hsa03440) | 0.0215 |
| | Vias de <i>Reactome</i> | Ponto de verificação/chechagem de danos ao DNA - G2/M (HSA- 69473) | 1.58E-8 |

Integração I: Sinalização Celular

A sinalização celular fornece uma informação em comum nas *PGCCs/MNGCs*, assim como evidenciado pela rede principal e os módulos 2, 3 e 7, isto porque este grande sistema de transdução de sinal, perpassa por uma sinalização adaptativa (após a ativação de um receptor, inicia-se um circuito de retroalimentação que desliga, degrada ou remove o receptor da superfície celular), integrada (há a unificação da resposta regulatória), específica e amplificada, que possibilitam uma comunicação de maneira parácrina, autócrina, endócrina e por contato direto. Dessa maneira, diversos complexos trabalham em conjunto para interpretar as informações externas e traduzirem a alguma modificação metabólica interna (Alberts *et al.* 2006; Alberts *et al.*, 2010; Weinberg, 2016; De Robertis & Hib, 2017; Nelson *et al.*, 2019).

Ao considerar essa correlação com as *PGCCs/MNGCs*, White-Gilbertson *et al.* (2020,2022), salientam o papel enzimático sobre a capacidade de influenciar o metabolismo interno de células poliploides por uma atuação nuclear relacionada à sinalização de maneira a influenciar a quimio- e radiosensibilização. Ademais, translocações de receptores à membrana plasmática também são frequentes para induzir o aumento de expressão gênica atrelada à sobrevivência, assim como para deslocar informações celulares de maneira parácrina ao redor do nicho tumoral

(Weinberg, 2016; Amend *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2018; Bharadwaj; Mandal, 2020). Não obstante, receptores e ligações diversas acabam se correlacionando com vantagens metabólicas e regulatórias que sustentam uma sobrevivência, acesso a características fenotípicas unicelulares, proliferação, alterações organizacionais, comunicação célula-célula e interconversões de destinos celulares diferentes capazes de prover um estado transitório às *PGCCs/MNGCs* que podem se adaptarem aos estresses recebidos do meio externo, como a resposta a fármacos (Alberts *et al.* 2006; Alberts *et al.*, 2010; Weinberg, 2016; De Robertis; Hib, 2017; Nelson *et al.*, 2019; Erenpreisa *et al.*, 2022b).

Dessa forma, Lin *et al.* (2021), destacam que *PGCCs/MNGCs* são capazes de atingir a sinalização de vias que resultam em resposta frente a xenobióticos e indução de hiperpoliploidização, resultando em uma fonte de *stemness* e heterogeneidade tumoral e, segundo Shankaranarayanan *et al.* (2016), possibilita uma resistência a múltiplas drogas (MDR). Todavia, segundo Salem *et al.* (2020), essa sinalização nas *PGCCs/MNGCs* não se traduz em uma adaptação de células degenerativas, mas, provavelmente, como células-tronco cancerosas semelhantes a blastômeros, podendo funcionar na desdiferenciação (reprogramação) das células somáticas maduras em células iniciadoras de câncer.

Para além, a recepção de sinais na superfície amplia mais as informações supracitadas segundo Shankaranarayanan *et al.* (2016), Salem *et al.* (2020) e Lin *et al.* (2021). Isto porque, em células tumorais não poliploides, há uma interação receptor-ligante auxiliada por proteoglicanos que amplifica a progressão tumoral, o potencial metastático por sinalizações autócrinas, promove uma formação de inúmeros complexos de sinalização atuantes sobre a regulação final do citoesqueleto, da adesão e migração celular e da morfogênese e diferenciação (Mythreye & Blobel, 2009; O'Connell *et al.*, 2009; Lim, Multhaupt & Couchman, 2015).

Integração II: Controle do ciclo celular

Nas *PGCCs/MNGCs* há um desbalanço no ciclo celular, assim como salienta a conexão dos módulos 1, 10 e 15, o qual acaba se encontrando no limiar da mitose e da apoptose (Yu, Zhang & Wang, 2019; Tagal & Roth, 2021). Ao passo que, também

há regressões evolutivas para com estratégias que visam a formar muitos descendentes em divisões assimétricas, como por formação de cistos pós-poliploidização (Niculescu, 2022). Admeais, ao realizar tais processos de despoliploidização passa a exibir mediadores comuns tanto para mitose quanto para a meiose e à auto-renovação, com a possibilidade de propagação mitótica (Mirzayans; Andrais; Murray, 2018).

Para além, as divisões assimétricas são perpassadas por processos regulatórios que atuam na compartimentalização de proteínas reguladoras do ciclo celular (Zhang; Wang; Zhang, 2014), e ao mesmo tempo a instabilidade genômica presente nesse ciclo celular peculiar das *PGCCs/MNGCs*, fornece, paradoxalmente, a base para a replicação e distribuição equilibrada do material genético para as células filhas por meio da superexpressão de genes que levam à hiperativação de vários complexos de ciclinas e possibilita uma interrupção dos pontos de verificação do ciclo celular (Fei *et al.*, 2019).

Em um outro extremo de interferência no ciclo celular benéfico para às *PGCCs/MNGCs*, há o papel dos oncovírus, sendo capazes de atuar sobre a montagem do fuso, anulação do *checkpoint* pós-mitótico, re-replicação, hipóxia, duplicação do centrossoma, inativação de supressores tumorais, ativação de *Myc* (*Proto-Oncogene C-Myc*) e outros. E isto pode potencializar a ocorrência de ciclo celular abortivo ou, alternativamente, endoreplicação, importante para a formação das *PGCCs* (Herbein & Nehme, 2020; Nehme *et al.*, 2021).

Além do exposto, essa sinalização de mediadores clássicos da meiose nas *PGCCs*, também evidenciam uma função necessária para com a formação de suas células filhas. Isto porque, mecanismos meióticos e relacionados aos telômeros podem desempenhar um papel em um tipo de divisão assimétrica, denominada, neose. Isto porque, essas células poliploides não perdem a capacidade de proliferar e nem esperam a morte, iniciando uma divisão assimétrica (neose) que possibilita um processo de repovoamento do tumor (Song *et al.*, 2021).

Em paralelo, esta poliploidia também sustenta a imortalidade do tumor por variação genética recombinativa e protege de mutações letais recessivas com a seleção dos clones mais aptos através de uma mitose singular e com uma atividade robusta do

complexo sinaptonêmico (Salmina *et al.*, 2019a). E ao mesmo tempo, conexões também são destacadas do complexo sinaptonêmico sobre associações entre *PGCCs/MNGCs* e embriogênese, apoiando a teoria embrionária de tumores (Salmina *et al.*, 2020).

Entretanto, em um outro extremo, linhagens tumorais mutantes em *TP53* (*tumor protein p53*), após dano ao DNA, forneceram uma elucidação quanto a capacidade de realizarem uma prófase meiótica poliploide modificada, atrelada a uma duplicação de centrômeros. E em meio a tal característica peculiar, na realização do reparo, há um arranjo com uma ausência do aglomerado de telômeros e complexos sinaptonêmicos, as marcas da meiose convencional (Salmina *et al.*, 2019b).

O ponto de verificação G2/M (*checkpoint* G2/M) atrelado ao reparo do DNA, salienta a conquista evolutiva das *PGCCs/MNGCs* frente a morte celular. Sendo que, os pontos de checagem, como solução de demandas de correções no DNA, são ultrapassados (Lopez-Sánchez *et al.* 2014; Ceccaldi *et al.* 2016), perdendo a segurança pelo reparo do DNA, modulação das transições do ciclo celular e a estabilidade ou atividade de outras proteínas (Dibitto *et al.* 2016; Dibitto *et al.* 2022).

Diante de tais considerações sobre o ponto de verificação, as *PGCCs/MNGCs* demonstram uma evolução peculiar ao utilizar estratégias diversas, como endoreplicação, deslizamento mitótico, falha na citocinese, fusão celular ou canibalismo celular (Was *et al.*, 2021), que podem até influenciar o ponto de verificação, como no caso da catástrofe mitótica, ao desacoplar o ponto de verificação/*checkpoint* G2/M referente ao dano no DNA e entrar na poliploidia com quebras de fita dupla de DNA não reparadas (Erenpreisa; Cragg, 2013).

Como resultado primário, há uma relação das *PGCCs/MNGCs* com a senescência celular. Isto devido ao fato de que os danos persistentes ao DNA também são associados à senescência celular (Bojko *et al.*, 2020). Sendo que células poliploides destacam um aumento da quantidade de marcadores de senescência (Bojko *et al.*, 2020). E as *PGCCs/MNGCs* também demonstram uma capacidade de tornar reversível o processo de senescência celular, como um destino da célula terminal, sendo por meio de uma indução provocada pelos danos no DNA acometido pelos

tratamentos genotóxicos atuais (Erenpreisa; Cragg, 2013).

E com a superação dos insultos genotóxicos há uma relação entre poliploidia reversível, indução de um fenótipo semelhante a células-tronco e o surgimento do potencial de autorrenovação nas células sobreviventes que resultam da despoliploidização. Logo, a senescência pode, paradoxalmente, ser realmente necessária para rejuvenescer as células cancerosas após tratamentos genotóxicos (Erenpreisa; Cragg, 2013).

Integração III: Auto-organização Celular

Uma outra característica das *PGCCs/MNGCs* é a sua capacidade de adaptação frente à auto-organização, um ponto evidenciado pelos módulos 4, 6, 8 e 14, isto porque tal subpopulação é comparada quanto a um estado transitório, capaz de alcançar destinos celulares diferentes por meio de mudanças citoesqueléticas e metabólicas robustas em um curto período de tempo. Para tanto, as conexões no citoesqueleto proporcionada pelos microtúbulos se mostram primordiais. Em consonância, o acesso a receptores e vias de sinalização particulares, sustentam tais mudanças morfológicas e de destinos celulares diferentes.

À vista da questão citoesquelética, as *PGCCs/MNGCs* destacam um potencial intenso em realizar rearranjos cromossômicos por: (i) divisões multipolares; (ii) divisões bipolares ilícitas na presença de ligações impróprias de microtúbulos-cinetócoro; (iii) Recombinações e mosaicismos e outros (Vitale *et al.*, 2011). Em paralelo, há a possibilidade de autofusão espontânea de células cancerosas está correlacionada com a presença de uma ponte persistente de microtúbulos conectando as células, que resulta em *PGCCs/MNGCs* híbridas agressivas (Zhang *et al.*, 2021). Em conformidade com a questão do citoesqueleto, os microtúbulos presentes e estáveis beneficiam as *PGCCs/MNGCs*, mas o oposto também é verdadeiro, isto representado pela presença de estamina que proporciona um maior potencial invasivo para estas células (Lv *et al.*, 2014).

Ademais, um citoesqueleto complexo também proporciona um fenótipo biofísico distinto, com aumento da densidade de filamentos intermediários de actina e vimentina polimerizados, rigidez nuclear e citoesquelética, aumento da força de

tração e persistência migratória. Tantas singularidades que fornecem uma organização diferencial que serve para suportar seu aumento de tamanho e impulsionar a persistência migratória (Xuan; Ghosh; Dawson, 2022).

Outrossim, há uma conexão com a capacidade de morfogênese das *PGCCs*, que podem se diferenciar em todas as três camadas germinativas *in vitro*. Para isto, a formação de *PGCCs/MNGCs* podem ser por meio de fusão celular por ação mediada da *sincitina-1*, também comum ao seu padrão de desenvolvimento semelhante a blastômeros embrionários (Li *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021). Para além, tais células são capazes de formarem estruturas organotípicas de câncer *in vitro* por meio de diversas estratégias, como brotamento ou fragmentação. Assim, exibem propriedades células-tronco cancerosas que podem gerar células cancerosas epiteliais e multilinhagens de células estromais (Zhang *et al.* 2013; Niu, Mercado-Uribe; Liu, 2017).

Conjuntamente, a fusão celular apresentada, é normal e essencial para a formação de órgãos e na diferenciação, reparação e regeneração de tecidos. Porém, as *PGCCs/MNGCs* conseguiram ir além, sendo capazes de realizar fusão com células normais em seu entorno, possibilitando vários fenótipos celulares mais agressivos. Isto porque, em células somática, a fusão celular permite a reprogramação nuclear rápida e modificações epigenéticas para formar células híbridas com novas propriedades genéticas e fenotípicas a uma taxa superior àquela alcançada por mutações aleatórias (Shabo *et al.*, 2020). Como resultado, há um desenvolvimento da capacidade de migração celular correlacionada com a sinalização mediada por integrinas, via a transdução de sinal, bem observada na formação de vasos sanguíneos em tecidos normais e tumorais através do processo de neoangiogênese ou neovascularização, isto por causa da presença do *VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor A)* (Alberts *et al.* 2006; Alberts *et al.*, 2010; Weinberg, 2016; De Robertis; Hib, 2017; Nelson *et al.*, 2019).

Não obstante, há uma relação da morfogênese com a angiogênese sobre a formação e desenvolvimento das *PGCCs/MNGCs*, isto porque tais células são capazes de gerar eritrócitos, assim como são capazes de formar estruturas de mimetismo vascular, criando sua própria microcirculação apesar do crescimento

latente dos vasos. Logo, há uma relação robusta entre angiogênese e *PGCCs/MNGCs*. Sendo capaz de expor uma plasticidade do tumor através da indução de vias moleculares envolvidas na embriogênese e morfogênese precoce (Alameddine; Hamieh; Shamseddine, 2014).

Em complemento, dados experimentais explicitam as relações entre *PGCCs/MNGCs* com suas células filhas recém-brotadas e o processo de brotamento tumoral na sinalização de *Wnt* e na transição epitelial-mesenquimal (EMT), sendo que os mecanismos moleculares do brotamento tumoral envolvidos com a expressão de proteínas em *Wnt* e EMT, resultam em uma alta taxa de recorrência, metástase linfonodal, quimiorresistência e pior prognóstico em câncer colorretal (Zhang *et al.*, 2016). Ademais, a via de sinalização *Wnt* juntamente com EMT também podem regular a formação de mimetismo vascular. E com isso, a identificação de *PGCCs/MNGCs* e eritrócitos derivados de tumor destaca uma possível conexão com *Wnt*, EMT e mimetismo vascular para conquista de características mais agressivas do tumor (Zhang *et al.*, 2015).

Outrossim, fortes evidências destacam que a presença de *PGCCs/MNGCs* no câncer de ovário seroso de alto grau, relaciona-se com altos níveis de expressão de WNT7A (*Wnt Family Member 7A*) e WNT7B (*Wnt Family Member 7B*). Sendo que a deleção e a superexpressão de WNT7A afetam a proliferação de células tumorais em cultura e a progressão tumoral *in vivo*. Além disso, dados experimentais evidenciaram a relação entre *Wnt* e um feedback positivo para com à quimiorresistência do tumor, invasividade e imunossupressão (Richards, Candelaria & Lanz, 2021).

Integração IV: Metabolismo Lipídico

A análise funcional acerca dos módulos 5, 9, 11, 12 e 13, proporcionaram dados extremamente consonantes acerca da sinalização e biossíntese lipídica e seu papel primordial para as *PGCCs/MNGCs*, destacando: a manutenção da homeostase de glicose e lipídeos, pela presença de vias metabólicas que interconectam MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), mTOR (*Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase*), fatores de transcrição, ABC (*ATP-binding cassette*), organelas

citoplasmáticas, colesterol e ácidos graxos. Saliendo as influências do metabolismo sobre o crescimento e diferenciação celular (Alberts *et al.*, 2006; Alberts *et al.* 2010; Lemmon & Schlessinger 2010; Nelson, 2011; Leite *et al.* 2012; Weinberg 2016; De Robertis & Hib 2017; Nelson *et al.* 2019).

Sinalização

Em meio à mistura de sinalizações e mecanismos em que se integram as *PGCCs/MNGCs*, há um microambiente tumoral perpassado pela superexpressão de proteínas reguladoras do ciclo celular (Fei *et al.* 2019), de tal forma que a homeostase pós-mitótica agressiva das *PGCCs/MNGCs*, também envolve vias como a via de EGFR/RAS/MAPK (*Epidermal growth factor receptor* - EGFR; *proto-oncogene Ras* - RAS) que interliga poliploidização e homeostase tecidual acompanhando o entendimento da progressão do tumor por meio das *PGCCs/MNGCs* (Shu, Row & Deng 2018).

Além disso, a via de sinalização p38MAPK-ERK-JNK (*extracellular signal-regulated kinases* - ERK; *c-Jun N-terminal kinases* - JNK) atua na regulação do ciclo celular em *PGCCs/MNGCs* e suas células-filhas envolvendo-se na progressão do ciclo celular e formação de tais fenótipos poliploides (Liu *et al.* 2020). Em paralelo, MAPK e mTOR podem ter uma diminuição da expressão correlacionada com melhores respostas futuras sobre os mecanismos subjacentes da formação de *PGCCs/MNGCs* e sua relação com as células-tronco cancerígenas (CSCs) (Zhang *et al.*, 2013).

Mitocôndrias

Células poliploides podem apresentar a capacidade de influenciar sobre a formação de megamitocôndrias dependentes da carboxilação redutora. Logo, há uma comunicação cruzada com os papéis de colesterol como ponto de partida para diversos hormônios esteroides gerados por uma ação de enzimas fixadoras de CO₂ (*carbon dioxide*) retendo mais CO₂. Assim, as alterações lipídicas relacionadas, são acopladas a uma mudança metabólica crítica para as *PGCCs/MNGCs* (Fleming, 2021).

Estágios mais avançados da carcinogênese, evidencia uma mudança metabólica da respiração celular para a glicólise com redução da atividade catabólica do ciclo de krebs (efeito Warburg), atenuando a efetividade da produção de ATP. Mesmo em tais situação com acúmulo de precursores intermediários, as *PGCCs/MNGCs* podem fazer uso de vias metabólicas alternativas como um caminho abarcando o citrato sendo oxidado em dióxido de carbono e oxaloacetato para a produção de ATP nas mitocôndrias e um outro caminho, ou outra via acerca da exportação preferencial de citrato para o citosol, formando acetil coenzima A (*acetil-CoA*) e o oxaloacetato. Por meio disso, acetil-CoA é usado para a síntese de ácidos graxos e colesterol, enquanto o oxaloacetato é um precursor de aminoácidos (Kratochvílová *et al.*, 2017).

Transportadores ABC

Perante às mudanças metabólicas com os ácidos graxos, a família ABC e o colesterol, exibem relações proeminentes com as *PGCCs/MNGCs*, as quais podem liberar perfis de secretoma exclusivos que incluem citocinas, fatores de crescimento e vesículas extracelulares (EVs). As EVs apresentam membranas ricas em colesterol e proteínas da família ABC que permite que os exossomos sirvam como veículos estáveis durante a comunicação intercelular e evitem a degradação enzimática de proteínas sensíveis e do conteúdo de RNA (Lee, Mejia Peña & Dawson, 2022).

Em complemento, apoiando-se na questão da MDR, tal processo, também compartilha uma correlação com a fusão de células tumorais, umas das fontes promotoras de poliploidização. Neste sentido, diversos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da MDR extrínseca, como perda do alvo da droga, supressão da apoptose, aumento dos mecanismos de reparo do DNA, diminuição da captação da droga e aumento do efluxo são devidos à superexpressão dos transportadores ABC. Para tanto, há uma mediação induzida por fusão celular que auxilia na combinação de genes para a expressão e/ou superexpressão de várias proteínas responsáveis pela resistência a drogas, uma das marcas da quimiorresistência associada com às *PGCCs/MNGCs* (Fernandes *et al.*, 2019; Dudás *et al.*, 2020).

Em paralelo ao processo de fusão celular supracitado, células híbridas podem aprimorar a resistência hiperregulação de transportadores ABC (Bastida-Ruiz, Van

Hoesen & Cohen, 2016). Em somatório, as células gigantes também suprem uma alta demanda de ATP adequado para a remoção eficiente de drogas através dos transportadores ABC, por meio de grande número de mitocôndrias com alto potencial de membrana e uma alta capacidade de sintetizar mitocôndrias. E esse acréscimo de mitocôndrias, também se associa com a presença de fatores de transcrição nucleares comuns para a regulação mitocondrial e do metabolismo lipídico (Sirois *et al.*, 2019; Weng *et al.*, 2020).

Autofagia

Outra correlação entre tumores e o aspecto metabólico dos lipídeos se encontram as respostas para mitigar vários tipos de estresses celular por meio da autofagia. Este processo envolve MAPK, via PI3K/mTOR (*Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase* - PI3K) e a via apoptótica. Mecanicamente, a autofagia utiliza-se da via da ubiquitina-proteassoma para formar autofagossomos e depende do complexo PI3K I para iniciar seu processo. Isto porque, a atividade deste complexo, produz o PIP3 (*Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*), crucial para o alongamento e selamento da membrana autofagomática (Alberts *et al.*, 2006; Alberts *et al.*, 2010; Weinberg, 2016; De Robertis; Hib, 2017; Nelson *et al.*, 2019).

Ao correlacionar autofagia e *PGCCs/MNGCs*, tal mecanismo se destaca como um “calcanhar de Aquiles”. Isto devido ao fato de que, acaba sendo induzida durante a senescência e pode fornecer uma função vital durante a senescência, como a reciclagem de constituintes celulares danificados. Além disso, uma regulação adequada da autofagia é importante para a produção de uma progênie viável, sendo essencial para o ressurgimento do câncer (Bowers *et al.*, 2022). Isto porque, a autofagia fornece um mecanismo de resgate celular sob condições adversas, manutenção de um estado dormente, mas também ativa a via MAPK-mTOR, fonte para potenciais novas terapias (You *et al.*, 2022).

Resistência à fármacos

A manutenção heterogênea de fosfoinosítídeos pelo metabolismo de fosfatidilinositol (PI) alterado em tumores, associam-se com a biogênese de vesículas de transporte,

que regulam uma ampla gama de proteínas que funcionam na superfície celular, servindo como precursoras de segundos mensageiros e auxiliando na definição da membrana como um alvo para vesículas secretoras, o que poderia ser um mecanismo compartilhado com as *PGCCs/MNGCs* (Alberts *et al.*, 2006; Alberts *et al.*, 2010; Weinberg, 2016; De Robertis; Hib, 2017; Nelson *et al.*, 2019).

Os mecanismos associados ao PI, também são críticos para a resistência a drogas, devido a resistência terapêutica pela reativação da via MAPK e das vias antiapoptóticas, como a via PI3K/Akt (Meierjohann 2022) e para a citocinese, onde a esfingomielina (SM) junto com a localização de PIP2 (*phosphatidylinositol 4,5- bisphosphate*) atuam sobre o sulco de clivagem durante a citocinese (Abe *et al.*, 2012). Em complemento, quando a esfingomielina sintase conjuga ceramida com fosfatidilcolina, ela produz esfingomielina e diacilglicerol nuclear (DAG), que estimulam a translocação nuclear de PKC (*protein kinase C*) para conduzir a expressão e proliferação de genes relacionados à senescência (Voelkel-Johnson, 2022).

O crosstalk com a senescência, também está presente com as *PGCCs/MNGCs*, isto pelo fato de que células gigantes senescentes libera vários fatores SASP (fenótipo secretor associado ao estado senescente) que modulam as propriedades das células vizinhas. E SASP tem uma relação com várias vias que incluem sinalização de mTOR, MAPK, autofagia e PI3K (Bharadwaj; Mandal, 2020). Por meio disso, novos destinos podem ser alcançados pelas células gigantes sobre até mesmo na atividade de metaloproteinases, algumas críticas para a formação de redes do tipo vasculogênicas (Li *et al.*, 2016). Assim, verifica-se a interlocução com as *PGCCs/MNGCs*, sendo similar a um estado intermediário metaestável para interconversão de células dormente que irão retomar sua atividade por deslizamento mitótico ou endoreplicação ou outro mecanismo (Sikora *et al.* 2022; Kirsch-Volders, Mišík & Gerlache 2024; Mirzayans 2024).

7.5 Análise Funcional da Rede Principal e Módulos/Clusters acerca do GB

Com as análises de rede proteica para os dados acerca do GB, o que se obteve de resultados (como salienta a tabela 8 e 9), fornece uma história da evolução do GB

de maneira sutil e altamente sinalizada, isto pelo fato de permear a resiliência por meio do crosstalk de múltiplas vias de transdução de sinal, visando uma aptidão à resposta rápida com a inserção de desbalanços, que variam da ordem ao caos, capazes de por meio de ciclos celulares destrutivos e/ou instáveis promoverem diversidade/heterogeneidade e múltiplos fenótipos direcionáveis à invasão, angiogênese, imunomodulação e dentre outros processos salientados por inúmeros autores.

Tabela 8: Avaliação Funcional da Rede Principal para GB

| Categoria | Descrição | FDR |
|-------------------------|--|------------|
| GO Processo Biológico | Via de sinalização da proteína tirosina quinase do receptor transmembrana (GO:0007169) | 1.14E-75 |
| GO Componente Celular | Periferia celular (GO:0071944) | 6.22E-34 |
| GO Função Molecular | Atividade da proteína tirosina quinase (GO:0004713) | 2.08E-32 |
| Vias do <i>KEGG</i> | Via de sinalização PI3K-Akt (hsa04151) | 1.22E-67 |
| Vias do <i>Reactome</i> | Doenças da transdução de sinal por receptores de fatores de crescimento e segundos mensageiros (HSA-5663202) | 9.8E-44 |

Na análise da rede principal, a história da iniciação e progressão do GB evidencia o protagonismo da sinalização celular quanto fonte de adaptação e aptidão do tumor para piores prognósticos. Isto porque, os enriquecimentos para proteína tirosina quinase, via PI3K-Akt, transdução de sinal e fatores de crescimento, abordam uma causalidade combinada de uma arquitetura de vias e processos. As lesões que se agrupam nessa combinação reúnem sobre 3 vias principais (*Receptor tyrosine kinase* - RTK/PI3K, p53 e *retinoblastoma protein* - RB). Ademais, o GB também configura-se como uma doença bioquímica e metabólica com anomalias em (a) IDH, ligando o metabolismo à regulação transcricional, e (b) glicólise e lipogênese (Cloughesy; Cavenee & Mischel 2014; Torrisi *et al.* 2022).

A mutação das isocitrato desidrogenases (IDHs) desencadeia o fenótipo de

metilação da ilha CpG do glioma (G-CIMP), induzindo alterações epigenéticas. Os GBs com IDH do tipo selvagem são mais agressivos e protegidos de danos oxidativos e de espécies reativas de oxigênio (*Reactive oxygen species* - ROS) pela produção de NADPH citosólico e mitocondrial, ao contrário dos GBs mutados, que geralmente são associados a um melhor prognóstico. O sistema de reparo de danos ao DNA (DDR) é particularmente ativo tanto para reparo de quebra de fita simples quanto de fita dupla, com células-tronco de GB (GSCs) retendo ativação constitutiva de componentes do DDR, como ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) e ATR (*ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*), sendo membros da família de proteínas quinases semelhantes a PIKKs (*Phosphatidylinositol-3 kinase-related kinases*), DNA-PKcs (*DNA-dependent protein kinase*) e vias de ponto de verificação do ciclo celular (Cloughesy; Cavenee & Mischel 2014; Fung *et al.* 2019; Torrisi *et al.* 2022).

A sinalização de ROS se interconecta com a inflamação, regulação aberrante dos receptores de tirosina quinase, integridade genômica e autofagia no GB, tendo a produção de IL-6 (*Interleukin-6*) como indutora de STAT-3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*) em GSCs, inibindo ROS intracelulares e mitocondriais e promovendo proliferação e progressão do ciclo celular. Ademais, superexpressão e/ou hiperativação de cascatas de proteína quinase ativadas por mitógeno, atuam sobre EGFR e sua versão mutada (EGFRvIII). Isto possibilita a ativação de efetores a jusante que promovem a formação de Ras-GTP ativo o qual se liga a alvos efetores a jusante como B-Raf (*proto-oncogene B-Raf*), que fosforila MEK1 (*Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1*) e MEK2 (*Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 2*), ativando fatores de transcrição/regulação transcricional com atuação na sobrevivência, proliferação e invasão celular do GB (Teodorczyk & Martin-Villalba 2010; Torrisi *et al.* 2022).

Em paralelo, a via PI3K/Akt (*protein kinase B*)/mTOR também se destaca como uma das vias mais comumente desreguladas em GB. Tendo PI3K ativando Akt por fosforilação, e o mTOR como alvo a jusante do Akt. Nesse caso, a transdução de sinal desregulada induz a ativação de NFκB (*Nuclear Factor Kappa B*), mTORC2 e MDM2 (*Mouse double minute 2 homolog*), inibindo apoptose e regulando negativamente p53. Ao mesmo tempo, A relação entre p53 e MDM2 permeia o

controle da integridade genômica, ativando genes de ponto de verificação do ciclo celular, mediando a parada do ciclo celular (e entrada em senescência) e/ou indução de apoptose. Todavia, esta relação apresenta-se frequentemente mutada, resultando em hiperproliferação, ausência de resposta apoptótica e padrão invasivo, promovendo a progressão do câncer em resposta a danos no DNA, genotoxicidade, ativação de oncogenes e sinais de crescimento aberrantes (Li *et al.* 2016; Tuncel & Kalkan 2018; Torrisi *et al.* 2022).

Nesse conjunto, a adaptabilidade de GB se soma com um estresse hipóxico relacionado à glicólise e lipogênese, isto justificado pela reprogramação metabólica em GB a qual aumenta a produção de lactato, que aumentam a taxa de acidificação e expressão de enzimas específicas associadas ao estresse oxidativo e a fosforilação oxidativa reduzida, induzindo a produção de ROS, assim como a ativação de HIFs (*Hypoxia-inducible factors*) com características interconectadas com a autofagia. Ao mesmo tempo a autofagia é estimulada como resposta ao estresse somando-se à evasão da apoptose e resistência a danos ao DNA (Teodorczyk & Martin-Villalba 2010; Fung *et al.* 2019; Torrisi *et al.* 2022).

Tabela 9: Avaliação Funcional dos clusters/módulos para a Rede de GB

| Módulos | Categorias | Descrição | FDR |
|----------|-----------------------|--|----------|
| Módulo 1 | GO Processo Biológico | Via de sinalização da proteína tirosina quinase do receptor transmembrana (GO:0007169) | 5.67E-24 |
| | GO Componente Celular | Periferia celular (GO:0071944) | 2.54E-15 |
| | GO Função Molecular | Atividade da proteína tirosina quinase do receptor transmembrana (GO:0004714) | 6.02E-13 |
| | Vias de KEGG | Via de sinalização PI3K-Akt (hsa04151) | 4.18E-31 |
| | Vias de Reactome | Sinalização por receptor de tirosina quinases (HSA-9006934) | 1.97E-30 |
| Módulo 2 | GO Processo Biológico | Via de sinalização da proteína tirosina quinase do receptor transmembrana (GO:0007169) | 2.07E-16 |
| | GO Componente | Complexo de reparo de DNA (GO:1990391) | 0.0017 |

| | | | |
|----------|-------------------------|--|----------|
| | Celular | | |
| | GO Função Molecular | Ligação ao receptor do fator de crescimento (GO:0070851) | 3.96E-9 |
| | Vias de <i>KEGG</i> | Melanoma (hsa05218) | 9.75E-17 |
| | Vias de <i>Reactome</i> | Cascata RAF/MAP quinase (HSA-5673001) | 4.25E-13 |
| Módulo 3 | GO Processo Biológico | Via de sinalização da proteína tirosina quinase do receptor transmembrana (GO:0007169) | 1.11E-15 |
| | GO Componente Celular | Complexo receptor (GO:0043235) | 9.42E-6 |
| | GO Função Molecular | Atividade da proteína tirosina quinase do receptor transmembrana (GO:0004714) | 2.56E-6 |
| | Vias de <i>KEGG</i> | Via de sinalização Ras (hsa04014) | 5.9E-14 |
| | Vias de <i>Reactome</i> | Sinalização por receptor de tirosina quinases (HSA-9006934) | 2.14E-10 |
| Módulo 4 | GO Processo Biológico | Via de sinalização da proteína tirosina quinase do receptor transmembrana (GO:0007169) | 2.77E-25 |
| | GO Componente Celular | Complexo fosfatidilinositol 3-quinase, classe IA (GO:0005943) | 1.19E-13 |
| | GO Função Molecular | Atividade da proteína tirosina quinase (GO:0004713) | 2.14E-11 |
| | Vias de <i>KEGG</i> | Resistência ao inibidor de tirosina quinase EGFR (hsa01521) | 1.49E-28 |
| | Vias de <i>Reactome</i> | Doenças de transdução de sinal por receptores de fatores de crescimento e segundos mensageiros (HSA-5663202) | 5.11E-26 |
| Módulo 5 | GO Processo Biológico | Transdução de sinal em resposta a danos no DNA (GO:0042770) | 2.19E-5 |
| | GO Componente Celular | Lúmen da organela intracelular (GO:0070013) | 0.0011 |
| | GO Função Molecular | Ligação ao receptor do fator de crescimento endotelial vascular (GO:0005172) | 0.0015 |
| | Vias de <i>KEGG</i> | Via de sinalização Ras (hsa04014) | 9.05E-6 |
| | Vias de <i>Reactome</i> | Ciclo Celular (HSA-1640170) | 6.89E-5 |
| Módulo 6 | GO Processo Biológico | Via de sinalização do receptor de efrina (GO:0048013) | 3.02E-14 |

| | | | |
|----------|-------------------------|--|----------|
| | GO Componente Celular | Componente ancorado da membrana (GO:0031225) | 8.26E-5 |
| | GO Função Molecular | Atividade do receptor transmembrana-efrina (GO:0005005) | 4.13E-9 |
| | Vias de <i>KEGG</i> | Via de sinalização Rap1 (hsa04015) | 1.07E-13 |
| | Vias de <i>Reactome</i> | Repulsão de células mediada por EPH-efrina (HSA-3928665) | 4.4E-15 |
| Módulo 7 | GO Processo Biológico | Regulação negativa da resposta a estímulos externos (GO:0032102) | 0.0118 |
| | GO Componente Celular | Lúmen de grânulos alfa de plaquetas (GO:0031093) | 7.3E-4 |
| | GO Função Molecular | - | - |
| | Vias de <i>KEGG</i> | Cascatas de complemento e coagulação (hsa04610) | 2.6E-4 |
| | Vias de <i>Reactome</i> | Formação de coágulo de fibrina (cascata de coagulação) (HSA- 140877) | 2.0E-4 |
| Módulo 8 | GO Processo Biológico | Contração muscular (GO:0006936) | 3.0E-4 |
| | GO Componente Celular | Complexo de miosina muscular (GO:0005859) | 1.26E-9 |
| | GO Função Molecular | Atividade motora de microfilamentos (GO:0000146) | 7.96E-8 |
| | Vias de <i>KEGG</i> | - | - |
| | Vias de <i>Reactome</i> | - | - |
| Módulo 9 | GO Processo Biológico | - | - |
| | GO Componente Celular | - | - |
| | GO Função Molecular | Atividade inibidora de proteína serina/treonina quinase dependente de ciclina (GO:0004861) | 0.0139 |
| | Vias de <i>KEGG</i> | Ciclo celular (hsa04110) | 3.2E-4 |
| | Vias de <i>Reactome</i> | Senescência Induzida por Oncogene (HSA-2559585) | 5.11E-5 |

Integração I: Sinalização para aptidão de GB

Assim como supracitado acerca da rede principal, as relações funcionais apresentadas pelos módulos/clusters 1, 2, 3 e 4, evidenciam novamente a

importância da resposta do GB à sinalização intrínseca e extrínseca ao estresse. Isto porque, a desregulação de várias vias de sinalização molecular, juntamente com a existência da barreira hematoencefálica (BHE), formaliza o desafio dos tumores agressivos de GB, acessando facilmente à recorrência do tumor após a terapia (Balça-Silva *et al.*, 2019; Fabro, Lamfers & Leenstra, 2022). Dentre as sinalizações, a amplificação e mutação do *EGFR* ou sua forma mutante constitutivamente ativa, representam anormalidades genéticas características do GB. O *EGFR* sinaliza através de vias como Ras-Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt/mTOR e JAK (*Janus Kinase 2*)/STAT (Taylor, Furnari & Cavenee, 2012).

A via efetora Ras-Raf/MEK/ERK ativa Raf, que fosforila MEK, que por sua vez ativa ERK. ERK translocado para o núcleo ativa fatores de transcrição como STAT1/3 e c-Myc, induzindo progressão celular para as fases G1 e S do ciclo celular. Ademais, ERK fosforila proteínas que regulam o citoesqueleto e as metaloproteinases da matriz (MMPs), envolvidas na invasão celular (Rosenberg *et al.* 2015; Tuncel & Kalkan 2018). Com a presença de Ras, torna-se possível a ativação de PI3K, o qual fosforila PIP2, gerando PIP3. A formação de PIP3 resulta na translocação de Akt/PKB para a membrana celular, onde é fosforilado pela PDK1 (*pyruvate dehydrogenase kinase 1*). A via de sinalização Akt ativa mTOR, GSK-3 β (*glycogen synthase kinase-3 beta*), MDM2 e NF- κ B. Em conjunto, sinais de RTK/Ras/PI3K-Akt/mTOR regulam o metabolismo da glicose, aumentando GLUT (*Glucose transporter*) e a hexoquinase, ativando a glicólise aeróbica (Li *et al.* 2016; Khabibov *et al.*, 2022; Torrisi *et al.* 2022).

Integração II: Versatilidade para Responder aos Estresses

Após às interpretações dos estressores com uma transdução de sinal integrada no GB, conforme os resultados salientados pelos módulos/clusters 2, 5 e 9, a flexibilidade do GB por apresentar uma paisagem epigenética e genética altamente plástica e com conversões bidirecionais, beneficia tal tumor pela possibilidade de intercambiar atratores capazes de moldar o reparo ao DNA por meio de rearranjos, modificações evidenciadas pela rede principal e também como uma estratégia evolutivamente conservada se pode reacender o impacto e importância das

PGCCs/MNGCs assim como apresentado no tópico 5.4.2 (Prager *et al.* 2020; Alhaddad, Osipov & Leonov 2022; Yabo, Niclou & Golebiewska 2022).

O sistema de reparo do DNA atinge diretamente a adaptação e resistência do GB. Isto porque, variações como EGFRvIII, destaca o envolvimento do sistema de reparo de quebras de dupla fita (DSBs) no DNA (Mukherjee *et al.* 2009). Ademais, a ativação da via PI3K-AKT, salientadas na integração I tanto dos tópicos 4.5.2 quanto 4.5.3, está relacionada à instabilidade genômica e deficiência do reparo mediada por RAD51, além de deficiências no checkpoint do ciclo celular (Alexander *et al.*, 2012).

A resistência ao tratamento está fortemente ligada aos mecanismos de reparo do DNA, assim como a promoção de diversidade celular (heterogeneidade intratumoral), como pela geração de *PGCCs/MNGCs* (Alhaddad; Osipov; Leonov 2022), isto por incluir modificações adaptativas atreladas ao reparo por recombinação homóloga (HR) e/ou junção de extremidades não homólogas (NHEJ). Assim, no GB, uma grande parcela é deficiente no checkpoint G1 do ciclo celular e dependem mais do checkpoint G2. Assim, a inibição do checkpoint G2 pode forçar as células a entrarem em mitose prematuramente ou catástrofe mitótica ou deslizamento mitótico ou endoreplicação, podendo levar à morte celular ou apoptose ou renovação de novas células tumorais mais agressivas (Alexander *et al.*, 2012; Mirzayans & Murray 2023; Mirzayans 2024).

No caso do tratamento quimioterápico convencional para GB, a temozolomida (TMZ), uma droga alquilante do DNA, é usada para induzir senescência através da lesão específica O6-metilguanina (O6MeG), que leva à parada do ciclo celular em G2-M e requer a ativação do complexo MRN e da via ATR/CHK1 (Aasland *et al.*, 2019). A senescência induzida pela TMZ é dependente de p53 e da indução sustentada de p21, mas também envolve a degradação de CDC25c e a repressão de proteínas de reparo de incompatibilidades (MMR) e HR como RAD51 (Erasimus *et al.* 2016; Aasland *et al.*, 2019).

Entretanto, apesar dos efeitos positivos da TMZ, há evidências crescentes da atuação de NF- κ B para a senescência induzida pela temozolomida ao passo de induzir fatores antiapoptóticos, suprimindo a via apoptótica e/ou induzindo SASP. Concomitante, pode ocorrer repressão transcricional, mediada pela ruptura do

complexo E2F1/DP1, e redução da capacidade de MMR, o que poderia aumentar a agressividade dessas células uma vez que elas reiniciam a replicação (Squatrito & Holland 2011). Assim, poder-se-á alcançar mudanças proeminentes envolvendo a poliploidização com a senescência como uma etapa intermediária com uma tetraploidia como um estado metaestável para o ressurgimento agressivo de GB (Sikora *et al* 2022; Kirsch-Volders, Mišík & Gerlache 2024).

Integração III: “Canais de Comunicação” pela Vascularização

No momento em que a diversidade celular se formaliza quanto uma marca de aptidão do GB, a comunicação, primariamente, fornecida por “canais vasculares” se torna a fonte para moldar os caminhos para à invasão. Neste sentido, os dados enriquecidos para os módulos 6 e 7 salientam a importância da vascularização que envolve angiogênese, vasculogênese, cooptação vascular, mimetismo vascular e transdiferenciação de células endoteliais de GB. Tais tumores apresentam respostas contra a terapia anti-VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) promovendo características adicionais ao tumor, como a invasão tumoral, reprogramação metabólica e aumento da regulação do transportador de glicose 3, vascularização sustentada e a imunomodulação interconectada à indução de quimiotaxia com outros tipos celulares (Teodorczyk & Martin-Villalba 2010; Torrisi *et al.* 2022).

Dentre a diversidade celular, vale salientar a atuação das plaquetas sanguíneas que são participantes ativos no microambiente tumoral, liberando uma variedade de fatores de crescimento angiogênicos, como VEGF, o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e a angiopoietina. Ademais, as plaquetas protegem as células de GB de ataques imunológicos e auxiliam no crescimento rápido e invasivo (Sabrkhany *et al.* 2011; Obermann *et al.* 2021).

Em complemento, nesse extenso e peculiar sistema vascular do GB, outros atores se tornam de destaque, como os receptores Eph e suas ligantes, as efrinas, que se somam às inovações na neoangiogênese do tumor, isto pela modulação da adesão célula-célula e célula-matriz, processos vitais para a migração celular e a formação de novos vasos sanguíneos. Além disso, a sinalização Eph/efrina regula não apenas a adesão celular, mas também a permeabilidade vascular e a

remodelação do citoesqueleto, possibilitando organizações tubulares das células endoteliais (Singh *et al.* 2012; Pasquale 2024). Mas também, as vesículas extracelulares (EVs) na patologia vascular do GB, adicionam a mediação da comunicação entre células tumorais e células do microambiente, facilitando a remodelação vascular e contribuindo para a formação de uma rede vascular anômala e disfuncional (Spinelli *et al.* 2021).

Integração IV: “Kit de Sobrevivência” pronto para Invadir

Outro “personagem” que permeou o processo evolutivo do GB ao longo das integrações como “coadjuvante”, mas agora será o protagonista, é o citoesqueleto (CSK). O CSK sempre atuou quanto a forma celular, crescimento ancorado-dependente, distribuição de proteínas da superfície celular e localização de organelas, como mitocôndrias e polirribossomos. Entretanto, o “kit de sobrevivência” do GB se formalizou pelas modificações quanto à transdução de sinal e dinamicidade genômica, epigenômica e metabolômica. Dessa forma, a motilidade e invasividade se tornam alvos alcançáveis assim como evidenciado pelo módulo/cluster 8. Para tanto, entre as principais proteínas que compõem os filamentos do CSK, destacam-se a actina nos microfilamentos, a tubulina nos microtúbulos e o grupo heterogêneo de proteínas dos filamentos intermediários associados a diferentes tipos celulares, o que pode influenciar a adesão celular, a propagação e a locomoção (Gunning, O’Neill & Hardeman 2008).

A invasividade do GB acaba sendo impulsionada pela produção de proteases e fatores de transcrição que iniciam a transição epitélio-mesênquima (EMT), regulados por TGF- β , EGF, PDGF e FGF2. Em condições hipóxicas, HIFs regulam ZEB1, suprimindo a E-caderina e aumentando a motilidade celular (Cloughesy; Cavenee & Mischel 2014; Torrisi *et al.* 2022). Essa invasão envolve remodelação do citoesqueleto, degradação da matriz extracelular (MEC), motilidade sob controle de vias de sinalização como SRC, TWIST1 e receptores de quimiocina, remodelação metabólica e produção de lactato (que aumentam a taxa de acidificação e estresse oxidativo e reduz a fosforilação oxidativa produzindo ROS e resposta pró-inflamatória na microglia, removendo uma polarização semelhante a M2 e

estabilizando HIF) e imunomodulação (Tuncel & Kalkan 2018).

Para além, a rigidez da matriz extracelular (MEC) está associada a mutações IDH1 em tumores primários, sendo que em GB se identificou uma maior rigidez da MEC e sinalização mecânica aumentada, indicada por níveis elevados de quinase de adesão focal fosforilada (pFAK) e cadeia leve de miosina fosforilada (pMLC2), contribuindo para a agressividade do glioma (Miroshnikova *et al.* 2016).

Nessa mistura de respostas bioquímicas, as tropomiosinas, que são dímeros enrolados em hélice formadores de polímeros contínuos ao longo dos filamentos de actina e regulam a interação actina-miosina, desempenham um papel essencial quando apresentando expressão alterada dos dímeros de alto peso molecular em GB, isto por atuar na estrutura das fibras de estresse, sendo associada à capacidade invasiva e metastática (Gunning, O'Neill & Hardeman 2008).

Em complemento, a cofilina, uma proteína de ligação à actina que atua na regulação da dinâmica do citoesqueleto de actina, apresenta uma superexpressão em GB aumentando a taxa de movimento e invasão celular em até 4,5 vezes (Lv *et al.* 2022). Mas também, atua na regulação da permeabilidade da barreira sangue- tumor, aumentando tal permeabilidade por meio da ativação da via de sinalização RhoA/ROCK e PI3K (Lv *et al.* 2022).

Além das tropomiosinas e cofilina, desregulação da expressão de subunidades de actina afetam a migração celular, assim como representável pela α keletal-actin 1 (ACTC1) que demonstra uma expressão elevada em GB sendo um provável indicador de prognóstico e invasão, por estar correlacionada a menor sobrevida e recorrência à distância mais frequente (Suresh & Diaz 2021).

Outrossim, durante EMT, a via Notch e a sinalização TWIST1 são induzidas, associando-se à reorganização e motilidade do citoesqueleto pela regulação positiva da ciclina G2. A migração de células GB em direção aos vasos sanguíneos é associada à regulação positiva de SDF-1 e ativação de CXCR4, que também está envolvido em mecanismos imunossupressores e na estimulação do GB induzida pela microglia via PD1. SDF-1 secretado por GSCs promove quimioatração e ativação de células progenitoras endoteliais, apoiando a sobrevivência e proliferação endotelial (Aseervatham 2020).

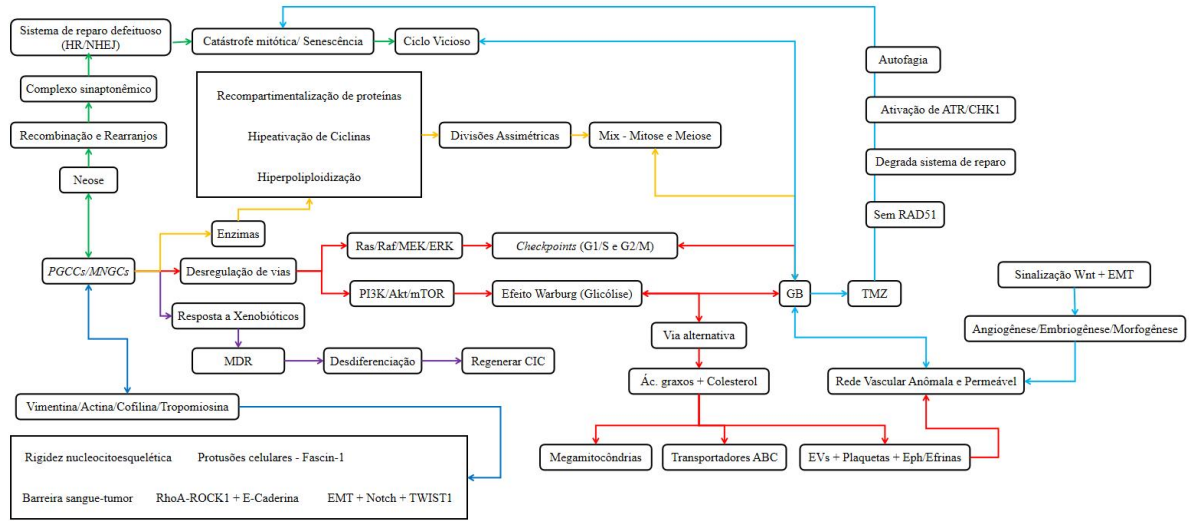
A desorganização da estrutura de actina durante a última etapa da divisão celular, conhecida como citocinese, pode levar à multinucleação e formação de poliploidia em células pós-mitóticas, que influenciam também sobre EMT (Gibieža & Petrikaitė 2021). Assim, após a aquisição de EMT, uma nova fase se torna acessível, a metástase. Para a metástase ser eficiente, componentes do citoesqueleto como actina, miosina e filamentos intermediários, e suas proteínas associadas devem coordenar-se de forma ordenada, levando à formação de protrusões celulares como lamelipódios, filopódios e invadopódios (Tafazzoli-Shadpour, Mohammadi & Torkashvand 2020).

A formação dessas protrusões está atrelada a proteína Fascin-1, as quais as células de GB apresentam uma associação funcional cada vez mais reconhecida como um marcador prognóstico da doença em estado metastático, isto por contribuir para a reprogramação metabólica, resistência à quimioterapia, atividade de stemness, eventos do microambiente tumoral e metástases linfonodais (Tafazzoli-Shadpour, Mohammadi & Torkashvand 2020; Li *et al.* 2022). Com isso, essas células metastáticas migram até encontrar locais estruturalmente adequados para formação de colônias, com o sucesso da metástase sendo influenciado por fatores bioquímicos e biomecânicos, como sinais de quimiocinas, flexibilidade celular, interações com células imunes e forças de cisalhamento do fluxo sanguíneo (Tafazzoli-Shadpour, Mohammadi & Torkashvand 2020).

7.6 Resumo da Etapa *in silico*

Com base nas informações apresentadas ao longo do texto, o conteúdo teórico, sugere que as *PGCCs/MNGCs* no GB devem exibir uma capacidade única de adaptação e resistência, atribuída a alterações nas vias de sinalização celular e ao controle dinâmico do ciclo celular, que permitem gerar variabilidade genética e resistência a múltiplas drogas, tornando-as células-chave no desenvolvimento e agressividade do GB. A poliploidização dessas células promove a geração de células iniciadoras de câncer, com características de células-tronco, que se reprogramam em resposta a alterações do ciclo celular e interagem com o microambiente tumoral, assim como esquematizado na Figura 5.

Figura 5: Compilado Teórico-Computacional acerca das Relações *PGCCs/MNGCs* com GB



Legenda: As vias Ras-Raf/MEK/ERK e PI3K/Akt/mTOR, frequentemente ativadas pelo EGFR mutante, promovem a sobrevivência celular e a invasão tumoral, enquanto a barreira hematoencefálica dificulta o tratamento e facilita a recidiva tumoral. A plasticidade epigenética das *PGCCs/MNGCs* permite adaptação rápida a estresses genotóxicos, como indução de senescência e posterior reversão para estados mais agressivos, facilitando a propagação e renovação do tumor. Esse processo é potencializado pela instabilidade genômica e pela superexpressão de oncogenes como o c-Myc, que contribuem para a resistência a terapias convencionais, como a quimioterapia com TMZ, que ativa vias de sobrevivência e favorece a persistência tumoral. Além disso, a alteração do metabolismo lipídico e a produção de energia através da glicólise aeróbica reforçam a agressividade do GB, com a capacidade das *PGCCs/MNGCs* de realizar rearranjos cromossômicos complexos, como divisões multipolares e formação de mosaicismos, o que contribui para a heterogeneidade e plasticidade do tumor. Essas células são fundamentais na progressão do GB devido à sua habilidade de realizar divisões assimétricas, o que aumenta a variabilidade genômica e a agressividade tumoral, além de conferir resistência às terapias convencionais. A ativação das vias Ras-Raf/MEK/ERK e PI3K/Akt/mTOR sustenta a alta demanda energética das células tumorais, essencial para sua proliferação e sobrevivência. A adaptação metabólica das *PGCCs/MNGCs*, com o uso da glicólise e vias alternativas para a síntese de ácidos graxos, é crucial para suportar a demanda energética dos transportadores ABC, que são fundamentais para a resistência a fármacos e a sobrevivência das células tumorais do GB (*Linhas em Verde, Roxo, Vermelho e Amarelo*). Além disso, a autofagia, induzida durante a senescência, é essencial para a sobrevivência das *PGCCs/MNGCs* em condições de estresse, permitindo a reciclagem celular e a manutenção de um estado dormente que pode ser reativado para promover a progressão tumoral. O citoesqueleto, regulado por proteínas como tropomiosinas e cofilina, influencia a motilidade e invasividade do GB, facilitando a invasão e disseminação metastática do tumor, com a reorganização citoesquelética associada à EMT. As

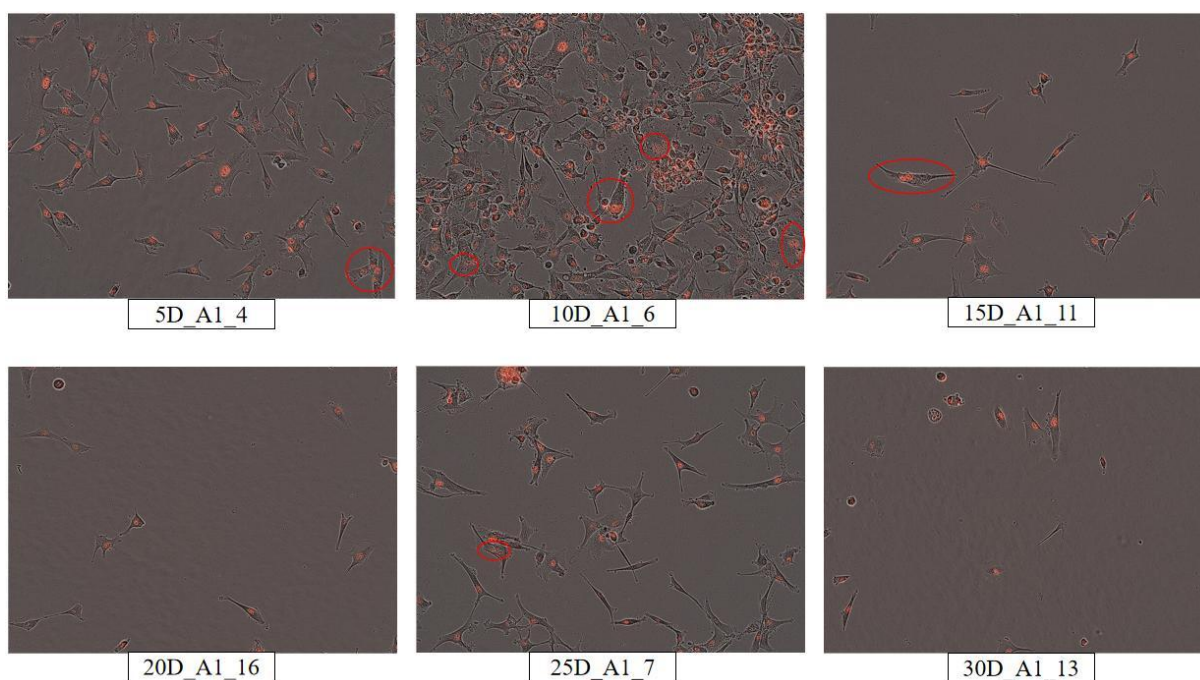
PGCCs/MNGCs desempenham um papel central na angiogênese e no mimetismo vascular, essenciais para a sobrevivência tumoral em ambientes hipóxicos, e a comunicação entre células tumorais e o microambiente, por meio de canais vasculares e EVs, reforça a complexidade da rede vascular e a resistência terapêutica do GB. Além disso, as anomalias metabólicas, como mutações em IDH, conectam o metabolismo à regulação transcricional, gerando o G-CIMP, que divide os GBs em dois subtipos: os com IDH selvagem, mais agressivos e resistentes a danos oxidativos, e os com IDH mutado, com um prognóstico geralmente melhor. O DDR é particularmente ativo nas GSCs, que mantêm a ativação constitutiva de proteínas como ATM e ATR, influenciando os pontos de verificação do ciclo celular. A sinalização mediada por ROS se entrelaça com inflamação, regulação aberrante de receptores de tirosina quinase, integridade genômica e autofagia, promovendo a proliferação e progressão do ciclo celular, além de inibir ROS. A superexpressão de proteínas reguladoras, como o EGFR e sua variante mutada EGFRvIII, ativa Ras-GTP e seus alvos, como B-Raf, que fosforilam MEK1/2, influenciando a sobrevivência, proliferação e invasão celular. O estresse hipóxico, causado pela reprogramação metabólica, eleva a produção de lactato, acidificando o ambiente e estimulando a expressão de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo, além de facilitar a autofagia e promover a resistência a danos ao DNA e à apoptose (*Linhas em Vermelho, Amarelo e Azul Claro*). O CSK desempenha papel central na adaptação e agressividade do GB, influenciando a motilidade e invasividade do tumor, sendo regulado por proteases e fatores de transcrição que induzem a EMT, como TGF- β , EGF, PDGF e FGF2, com os HIFs regulando ZEB1, suprimindo a E-caderina e aumentando a motilidade celular. A disfunção do CSK em GB envolve proteínas como tropomiosinas e cofilina, que afetam a invasividade e motilidade celular, sendo a cofilina particularmente importante na taxa de movimento e invasão celular, além de regular a permeabilidade da barreira sangue-tumor. Subunidades de actina, como ACTC1, também desempenham papel crucial na invasão tumoral e no prognóstico negativo. Durante a EMT, a via Notch e a sinalização TWIST1 são ativadas, promovendo a reorganização do CSK e facilitando a migração das células GB em direção aos vasos sanguíneos. A desorganização do CSK durante a citocinese pode levar à formação de células poliploides, influenciando a EMT e promovendo a metástase. A fascin-1, proteína associada ao CSK, também desempenha papel crítico na metástase do GB, contribuindo para a reprogramação metabólica e resistência à quimioterapia (*Linhas em Azul Escuro*).

7.7 Interpretação Funcional e Morfométrica do Rastreamento de Célula Única *in vitro*

Interpretação Funcional

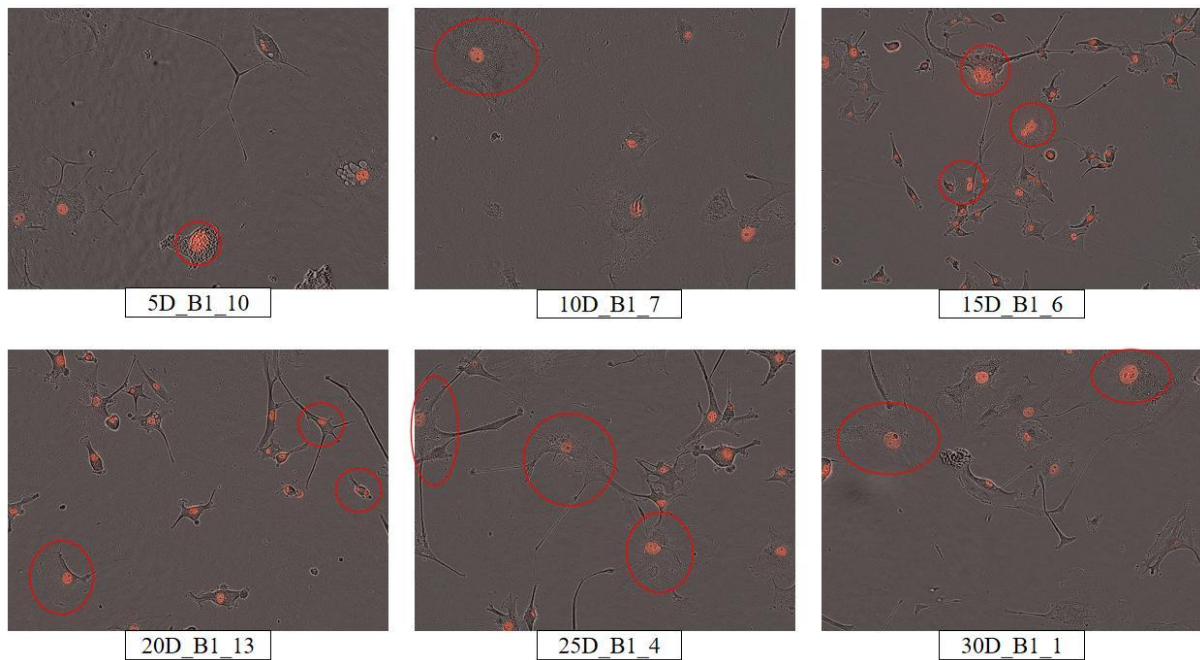
As PGCCs/MNGCs representam subpopulações de células tumorais extremamente relevantes para a evolução do tumor e adaptação ao estresse terapêutico, assim como supracitado ao longo do embasamento teórico e a análise funcional da rede. Mas também, em complemento, buscou-se caracterizar em detalhes morfométricos tal subpopulação singular e momentânea do GB. Para tanto, a metodologia de rastreamento de célula única *in vitro* foi aplicada, obtendo-se registros fotográficos de 8 campos da placa de cultura, o que foi possível identificar fenótipos com multinucleações (MN) e/ou micronucleações (MI) e/ou núcleos gigantes (GN) com uma porcentagem para células de controle (CCs) de 12,6% e 13,4% para células tratadas com TMZ (TTCs) em relação ao número total de células, como destacado nas figuras 6 e 7.

Figura 6: Fenótipos da Linhagem U87 submetida a DMSO



Legenda: Placa A1 com destaques dos campos 4, 6, 7, 11, 13 e 16 representados por XD_A1_Y, sendo X o dia do registro e Y o campo avaliado. Ademais, em círculo vermelho (RGB - 255,0,0) se encontram prováveis células MN, MI e GN.

Figura 7: Fenótipos da Linhagem U87 submetida a TMZ



Legenda: A. Placa B1 com destaques dos campos 1, 4, 6, 7, 10, 11, 13 e 16 representados por XD_BY, sendo X o dia do registro e Y o campo avaliado. Ademais, em círculo vermelho (RGB - 255,0,0) se encontram prováveis células MN, MI e GN.

De acordo com as informações apresentadas acerca das *PGCCs/MNGCs* no tópico 5.4.2 e com a história biológica fornecida diante da evolução do GB no tópico 5.4.3, diversos mecanismos descritos sustentam-se por um acompanhamento de um grupo de células U87 tratadas com DMSO e outras com TMZ. Os resultados concordam com achados de Giangaspero *et al.* (1987), que demonstrou a uma distribuição de DNA anormal em GG, a qual evidenciou que as populações com valores de ploidia da população principal não se desviam grosseiramente de células normais, mas existem heteroclones viáveis anormais ciclando ativamente na população examinada assim como é rastreado pelas figuras 5 e 6 com destaque dos ciclos de células pré-estresse e pós-estresse permeadas por *PGCCs/MNGCs/Senescentes Pré-PGCCs* (com MN e/ou MI e/ou GN).

Ademais, segundo Liu (2018), podem ser observados em dados histopatológicos e de culturas celulares a presença de *PGCCs/MNGCs* que possuem aumento em número com o grau de malignidade em pacientes com glioma, câncer de mama e câncer de ovário. Com base neste autor, tal presença de multinucleações parece ser

comum em uma fase denominado por ele como auto-renovação na qual células diploides estão morrendo (5º dia nas figuras 5 e 6) e as células sobreviventes que passaram para a tetraploidia (4n) continuam endociclando ou em endomitose para produzir *PGCCs* mononucleadas ou multinucleadas. Algumas células multinucleadas sofrem cito-fissão para gerar células poliploides menores, de crescimento lento, que persistem durante o tratamento quimioterápico, reiniciando a fase de iniciação do endociclo amfítico.

Em complemento, com base no estudo de Martinez *et al.* (2007), ao estudar GB de células gigantes (gcGBM), células gigantes polimórficas multinucleadas evoluem de células tumorais não gigantes em um estágio inicial do tumor, passando por endomitose. Além disso, apresentam valor de corte para números aumentados de cromossomos excedido para quase todos os cromossomos, alta celularidade, núcleos bizarros hipercromáticos (assim como pode ser constatado pelas figuras 5 e 6 pela marcação para 53BP1 (*p53-binding protein 1*), marcador do sistema de reparo de dano ao DNA).

Em concordância, as alterações quanto à proliferação como salientado pelos tópicos 5.4.2 e 5.4.3 nas integrações referentes à sinalização celular/transdução de sinal e dano ao DNA, uma característica visível é um aumento marcante no tamanho celular para células de GB tratadas com TMZ, como especifica a figura 6. Assim, tais achados concordam com os dados *in silico* quanto a provável mecanística atrelada e com os achados de Mirzayans, Andrais & Murray 2018, que expõe a função da senescência prematura induzida por estresse podem representar um estado intermediário capaz de gerar *PGCCs/MNGCs* produtoras de células mononucleadas de rápida proliferação por um processo de brotamento. Sendo que para linhagens celulares primárias de baixa passagem que foram estabelecidas a partir de tumores de 10 pacientes com GB, a menor frequência de *PGCCs/MNGCs* foi de 1 em 20 células (ou seja, 5% do total de células). Ademais, *PGCCs/MNGCs* tendem aparecer cerca de 3 dias após o tratamento anticâncer, como demonstrado pelos resultados deste estudo (figura 6).

Algo importante a ser destacado é o impacto da parte bioquímica de lipídios e biofísica associada à actina do GB e *PGCCs/MNGCs* como apresentado pelas redes

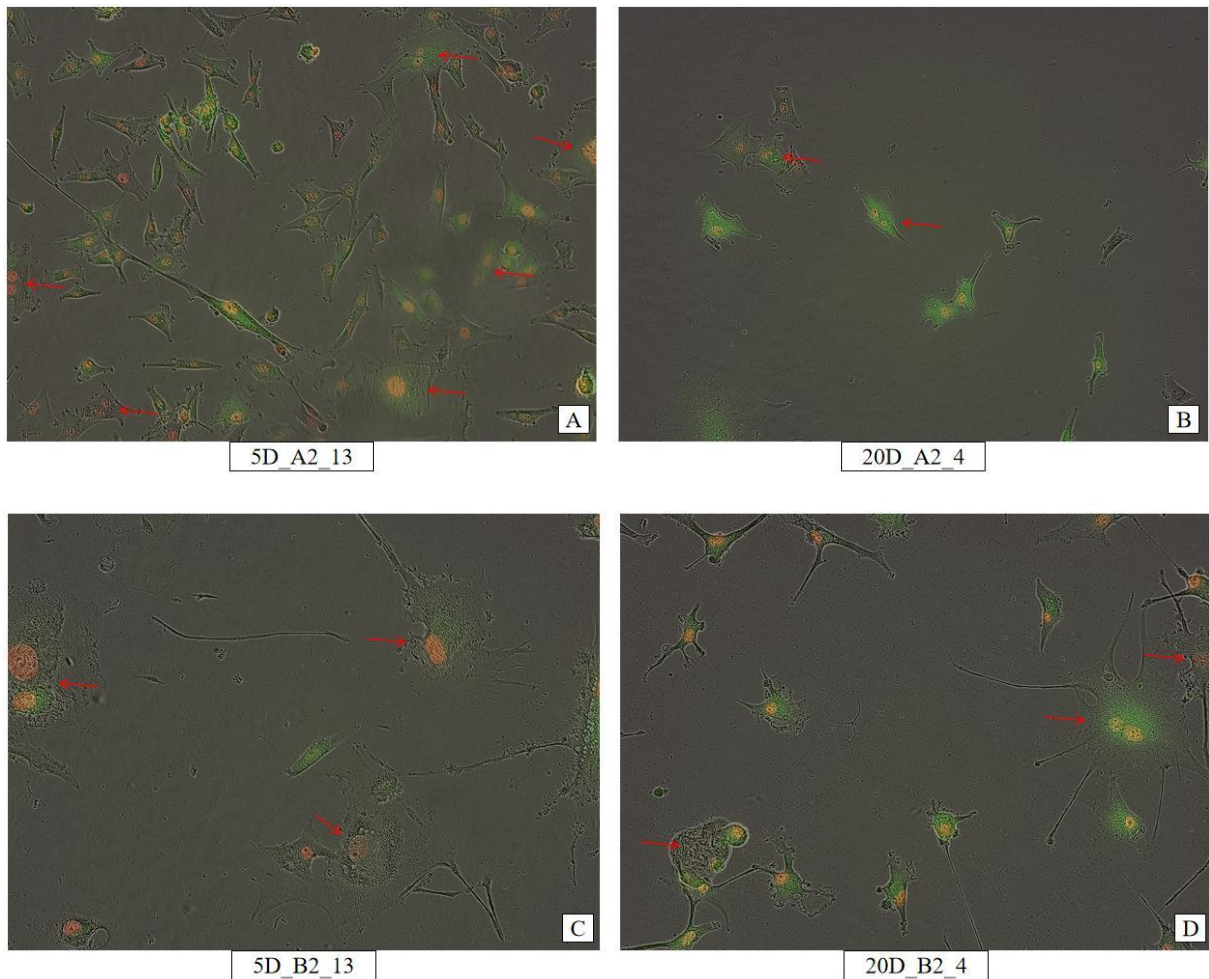
proteicas, isto porque Maeda *et al.* (2003), Zekri *et al.* (2016), Silva *et al.* (2019) e Delgado-Martín & Medina (2020) realçam o protagonismo do citoesqueleto, os quais foram visíveis quanto a demarcação de LC3 e 53BP1, confirmando a necessidade de tamanho para compensar instabilidade genômica, sendo resultado do bloqueio da citocinese e danos no DNA, um compilado de alterações quanto à desregulação da sinalização de crescimento via amplificação e ativação mutacional dos RTKs, ativação de PI3K, atuação de CD44 na adesão célula-célula e célula-substrato ou reorganização do citoesqueleto (no qual as GTPases da família Rho são “interruptores” moleculares dentro das células, que controlam as reorganizações dinâmicas da actina útil à produção de protrusões formadoras de redes multicelulares), assim como referido no tópico 5.4.3 na Integração IV.

Apesar de tais achados, demandar-se-ão mais estudos capazes de interpretar molecularmente a origem dessas células, se seria por falha na citocinese, frequentemente seguida de mitoses multipolares em células de GB, como salientado por Telentschak *et al.* (2015), ou por danos ao DNA juntamente com catástrofe mitótica ou deslizamento mitótico após perda de quinases (como a *Aurora kinase B*) resultando em morfologias nucleares anormais, formação de micronúcleos e pontes nucleoplásmicas, como evidenciado por Pacioni *et al.* (2015) e Zekri *et al.* (2016).

Interpretação Morfométrica

As medições morfométricas da área nuclear (NA), área citoplasmática (CA) e contagem de núcleos por célula (NCC), forneceram uma média de NA de 192 μm^2 (CCs) e 428,50 μm^2 (TTCs), enquanto a CA foi de 1722 μm^2 (CCs) e 11472 μm^2 (TTCs), assim como destacado na figura 7.

Figura 8: Imagens de microscopia utilizadas para análises morfológicas e funcionais



Legenda: A e B. Representam, respectivamente, CCs no 5º dia e 20º dia de monitoramento. C e D. Representam, respectivamente, TTCs 5º dia e 20º dia de monitoramento. As setas vermelhas (RGB: 255.0.0) demonstram *PGCCs/MNGCs* com um fenótipo semelhante a star- e veil-like com aumento da relação N/C e com brotamento celular (como na letra D) ou não.

As CCs apresentaram fenótipos semelhantes às *PGCCs/MNGCs* ou de Pré-*PGCCs/MNGCs*, conforme às características e detalhes apresentados pelos resultados *in silico* nos tópicos 5.4.2 e 5.4.3, sugerindo uma resposta de poliploidização à variação sutis de nutrição e oxigênio, representando uma diversidade/heterogeneidade intratumoral. Em paralelo, as TTCs tiveram um aumento na área e na relação N/C, o que representa um papel importante da poliploidização na organização dos componentes das interações nucleocitoesqueléticas. Essas diferenças contribuem para uma complexa morfológica

(macroestrutura nuclear) das *PGCCs/MNGCs*.

Tais dados obtidos, se somam com achados de outros pesquisadores como Biswas *et al.* (2023), ao destacarem a importância da densidade intracelular no citoesqueleto e nucleoplasma, observando que o núcleo é menos denso que o citoplasma e que os sistemas vivos mantêm uma relação constante de densidade entre esses compartimentos. Neste sentido, apesar das mudanças nas proporções de volume nuclear-citoplasmático (N/C) a relação de densidade N/C é mantida de maneira robusta. Isso sugere que a manutenção de uma relação constante de densidade N/C (a qual pode ser regulada pela relação entre aminoácidos e proteínas) é um mecanismo fundamental de organização celular, com implicações para a senescência e o câncer.

Neste sentido, Taddei *et al.* (2004), Cavalier-Smith (2005), Scholes & Paige (2015), Lanz *et al.* (2022) e Lessenger *et al.* (2024) discutem que possivelmente a variação do tamanho do genoma seja consequência da origem do envelope nuclear e da montagem de sua nucleação pelo DNA, além da seleção adaptativa para otimizar as proporções de volume cario-plasmáticas, tendo genes de controle do ciclo celular influentes sobre os volumes celulares. O que poderia explicar as mudanças morfofisiológicas associadas à duplicação do genoma com os dados *in silico*. E as relações com tamanho celular, volume nuclear e duração do ciclo celular (caracterizados como “nucleotípicos”) nos dados *in vitro* (Doyle & Coate 2019).

Pesquisas em câncer de próstata suplementam os dados alcançados em GB, principalmente, ao observar os aspectos fenotípicos, que segundo Kim *et al.* (2023) associam mudanças perante à sobrevivência após exposição à quimioterapia, como no caso de exposição de GB à TMZ, isto porque células sobreviventes exibiram aumento no tamanho celular e nuclear (que pode ter sido facilitado por endociclagem contínua), resultando em duplicações do genoma e com predomínio de células mononucleadas gigantes, como em GB diante das figuras 6 e 7.

Muitas informações ainda permanecem desconhecidas, sendo que os estudos morfológicos isolados não conseguem responder com facilidade, mas auxiliam na quantificação de alterações e iniciam o desbravamento de novos estudos inovadores quanto ao entendimento da relação biofísica e funcional geral das células de GB

diante da diversidade celular, como a geração de *PGCCs/MNGCs*.

À vista disso, a presença de *PGCCs/MNGCs* após estresse por TMZ em GB também se justifica pelo fato de que essas células exibem uma rigidez elevada tanto no citoplasma quanto no núcleo, características que as ajudam a suportar o estresse mecânico associado ao seu tamanho aumentado e ao tratamento (Xuan *et al.* 2018). A rigidez demonstra-se como resultado de uma estrutura nuclear inerentemente mais rígida, atribuído a uma organização anômala do citoesqueleto, uma regulação disfuncional da via RhoA-ROCK1, aumento na espessura e comprimento dos filamentos de actina, presença de múltiplos centros organizadores de microtúbulos (MTOCs), uma rede aumentada de filamentos intermediários de vimentina e capacidade aumentada de reparar o DNA danificado, concordando com os achados das redes proteicas de *PGCCs/MNGCs* e GB (Xuan *et al.* 2018; Xuan, Ghosh & Dawson 2022; Casotti *et al.* 2023; Kirsch-Volders, Mišík & Gerlache 2024).

7.8 Resumo da Etapa *in vitro*

Conforme a etapa *in silico*, as *PGCCs/MNGCs* desempenham um papel fundamental na evolução e adaptação ao estresse terapêutico do GB, e visualmente se destacam como subpopulações de células tumorais com características funcionais e morfológicas distintas. O rastreamento de célula única *in vitro* revelou a presença de fenótipos com multinucleações, micronucleações e núcleos gigantes em células U87 tratadas com DMSO e TMZ, com evidências de células multinucleadas sendo mais frequentes nas amostras tratadas. Esses resultados corroboram estudos anteriores que indicam a presença de *PGCCs/MNGCs* como um mecanismo de resistência ao tratamento quimioterápico, onde células tumorais devem passar por endomitose ou endociclo, gerando células de poliploidia com alta capacidade de sobrevivência. A análise morfológica revelou um aumento significativo na área nuclear e citoplasmática das células tratadas com TMZ, evidenciando uma maior relação entre volume nuclear e citoplasmático, o que é consistente com a poliploidização observada em resposta ao estresse. A diversidade intratumoral observada sugere uma adaptação ao ambiente de hipóxia e variação nutricional, um fenômeno que também pode ser associado à senescência prematura induzida por

estresse. As alterações morfológicas, incluindo o aumento no tamanho celular e a presença de núcleos bizarros, podem estar em conformidade com a desregulação de vias de sinalização, como a ativação de PI3K e a amplificação de RTKs, além da reorganização do citoesqueleto. Embora os dados *in vitro* e *in silico* sugiram uma complexa interação entre o aumento do tamanho celular, a instabilidade genômica e a resistência ao tratamento, a origem das *PGCCs/MNGCs* ainda necessita de mais estudos, especialmente para entender se elas surgem devido a falhas na citocinese, danos ao DNA ou catástrofes mitóticas. O estudo das redes proteicas associadas à actina e à bioquímica lipídica das *PGCCs/MNGCs* também sugere que a rigidez aumentada do núcleo e do citoplasma dessas células pode conferir uma vantagem na sobrevivência frente ao estresse terapêutico, favorecendo sua capacidade de reparar danos no DNA e reiniciar ciclos celulares. Estes achados abrem portas para novas investigações sobre os mecanismos biofísicos e funcionais das *PGCCs/MNGCs* e sua contribuição para a resistência ao tratamento no GB, destacando a necessidade de mais estudos para elucidar a origem e a dinâmica dessas células em diversos estágios da doença, para além dos dados iniciais alcançados neste estudo piloto de mestrado.

7.9 Estudo Translacional

As neoplasias foram descritas de acordo com os registros dos prontuários eletrônicos do Hospital Estadual Central e dos laudos histopatológicos do Laboratório de Patologia do Espírito Santo (LAPAES) ambos referidos como coalboradores no estudo aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes da Universidade Federal do Espírito Santo - HUCAM/UFES (Parecer nº 6.813.985) e do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo - CCS/UFES (Parecer nº 6.700.676).

O estudo realizado revelou uma prevalência do sexo feminino (56%) e de autodeclarados brancos (83%) entre os 48 pacientes analisados (Tendo sido retirados 2 pacientes com biópsias de outros tecido), o que está alinhado com os achados de Mendes et al. (2014), que também relataram maior prevalência feminina (67%) em sua amostra de 106 casos de tumores primários do sistema nervoso central (SNC). Essa predominância feminina pode ser explicada pelos hormônios envolvidos no desenvolvimento de meningiomas, como observado por Ostrom et al. (2021), que associaram a presença de receptores de progesterona nesse tipo de tumor ao maior acometimento em mulheres. No presente estudo, a baixa frequência de neoplasias cerebrais no sexo masculino (44%) e entre autodeclarados negros (17%) difere do observado por Zavarise et al. (2024), que destacaram maior incidência de neoplasias no sexo masculino na região Norte do Brasil, onde a raça/cor parda predominou entre os pacientes (64,07%). A média de idade dos pacientes foi de 55 anos, corroborando parcialmente os dados de Barioni et al. (2024), que evidenciaram maior prevalência de neoplasias entre indivíduos de meia-idade e idosos.

Dentre os pacientes analisados, apenas 33% não utilizavam ou especificaram relação com medicações de uso contínuo, enquanto 50% apresentaram comorbidades cardiovasculares, principalmente hipertensão arterial sistêmica (HAS), dado que reflete a associação entre HAS e desfechos em tumores cerebrais, como apontado por Mukand et al. (2016). Além disso, 61% dos pacientes apresentaram problemas relacionados à saúde mental, incluindo cefaleia, memória ineficiente,

ansiedade, depressão, convulsões e problemas sensoriais e motores, sendo a cefaleia um dos sintomas mais frequentemente associados a tumores do SNC, conforme relatado por Mendes et al. (2014), com prevalência de 52% em sua amostra. Esses resultados reforçam os dados de Yuile et al. (2023), que associaram cefaleia e perda de memória aos glioblastomas, destacando a complexidade sintomática dos tumores cerebrais. A prevalência de sintomas neurológicos e as condições associadas aos tumores cerebrais apontam para a importância de fatores de risco como radiação ionizante, campos eletromagnéticos e exposições ambientais, discutidos por Yamanaka et al. (2018) e Aydemir et al. (2023), que identificaram tais exposições como potenciais agravantes para gliomas e meningiomas. Esses achados reiteram a necessidade de estratégias integrativas e personalizadas no diagnóstico e tratamento, conforme discutido por Barioni et al. (2024), que destacaram o papel de biomarcadores neurogenéticos na compreensão e manejo de tumores do SNC.

Evolução Clínica

No caso da evolução clínica, revelou-se uma ampla diversidade de desfechos pós-operatórios, com controle clínico e tomográfico estáveis em alguns casos e complicações como hidrocefalia e infecções tratadas com antibióticos em outros. Em consonância com Mendes et al. (2014), que descreveram meningiomas e glioblastomas como os tumores mais prevalentes, observou-se planejamento para ressecção tumoral em gliomas de alta agressividade e acompanhamento oncológico contínuo. A presença de comorbidades, como crises hipertensivas e hiperglicemia induzida por dexametasona, reflete dados de Zavarise et al. (2024), que destacaram elevada incidência de doenças associadas em pacientes do Norte do Brasil.

A recuperação em vários casos apresentou resultados estáveis, alinhando-se a estudos que apontam melhora progressiva no estado clínico de pacientes submetidos à ressecção completa de meningiomas (Ostrom et al., 2021). A utilização de corticoides, como dexametasona, e a realização de radioterapia emependimomas de grau II evidenciam abordagens consistentes com as descritas por Barioni et al. (2024), que enfatizaram a importância de tratamentos personalizados e

integração de biomarcadores genéticos. Casos de ressecção parcial ou suspensão devido a sangramentos volumosos destacam a complexidade cirúrgica e reforçam a alta taxa de morbidade associada.

Em paralelo, a incidência de gliomas e meningiomas com características infiltrativas e recorrências, confirmadas por Ressonância Magnética e Tomografia Computadorizada, é consistente com os achados de Mukand et al. (2016), que relataram taxas elevadas de recidivas em tumores cerebrais. As orientações pós-alta com acompanhamento ambulatorial e desmame de corticoides refletem práticas clínicas descritas por Yuile et al. (2023), que destacaram a necessidade de suporte contínuo para reduzir complicações. A alta prevalência de complicações neurológicas, como tetraparesia e déficit visual, reforça a importância de uma abordagem multidisciplinar e do monitoramento rigoroso, alinhando-se a Ostrom et al. (2021), que relataram déficits sensoriais e motores em tumores do SNC. A associação entre hidrocefalia compressiva e incontinência urinária, bem como a utilização de dispositivos para drenagem, corrobora os dados de Aydemir et al. (2023), que enfatizaram a relação entre fatores locais e o desenvolvimento de complicações pós-cirúrgicas. Por fim, os resultados evidenciam a relevância de intervenções cirúrgicas e radioterápicas adequadas, destacando a necessidade de políticas públicas para melhorar o diagnóstico precoce e ampliar o acesso ao tratamento, conforme sugerido por Zavarise et al. (2024).

Dados Histopatológicos

Os resultados mostram uma predominância de meningiomas grau I (35%), seguidos por GB/astrocitomas grau IV (19%), schwannomas (13%) e neoplasias metastáticas (19%), enquanto astrocitomas graus II e III e ependimomas apresentaram incidências menores (2% cada). Esses achados corroboram com Mendes et al. (2014), que destacaram os meningiomas como o tipo mais prevalente entre os tumores primários do sistema nervoso central (SNC), com 48% dos casos analisados, frequentemente classificados como grau I pela OMS. Além disso, a alta incidência de GBs neste estudo é consistente com a observação de Santos et al. (2021), que identificaram o GB como o tipo de glioma mais comum, responsável por

63,7% dos casos de gliomas e associado a alta malignidade. Visando especificar as principais características dos subtipos tumorais, estruturou-se a tabela 10 a seguir.

Tabela 10: Características Classificadoras Gerais dos Subtipos Tumorais Analisados

| Subtipos Tumorais | Descrição |
|----------------------|---|
| Meningioma Grau I | Tumores predominantemente benignos e de crescimento lento, representam o subtipo mais comum entre os meningiomas. Histologicamente, apresentam corpos psamomatosos, células poliédricas organizadas em lóbulos e uma matriz rica em colágeno. Possuem alta celularidade, com núcleos uniformes e baixa taxa mitótica, frequentemente associada ao índice Ki-67 reduzido. Localizam-se principalmente nas meninges, com compressão de estruturas adjacentes, sem invasão significativa ao tecido cerebral. |
| Ependimoma Grau II | Tumores neuroepiteliais de crescimento lento, originados do revestimento ventricular ou canal central da medula. Morfologicamente, apresentam pseudorosetas perivasculares e rosetas ependimárias, com núcleos monomórficos e citoplasma abundante. A vascularização proeminente e a organização celular em padrões definidos são marcantes. Apesar de serem tipicamente benignos, podem infiltrar estruturas circundantes. |
| Astrocitoma Grau I | Gliomas de baixo grau, frequentemente diagnosticados em crianças e jovens. Morfologicamente, apresentam astrócitos bem diferenciados, com núcleos uniformes e ausência de atipias significativas. Possuem padrão histológico organizado e, muitas vezes, uma cápsula delimitadora que impede a invasão difusa. Sua localização comum é no cerebelo ou nos hemisférios cerebrais. |
| Astrocitoma Grau II | Gliomas difusos com potencial infiltrativo, caracterizados por núcleos alongados e ligeiramente hipercromáticos, com uma organização celular menos definida. A taxa mitótica é baixa, mas a invasão ao parênquima cerebral é significativa, dificultando a delimitação cirúrgica. São tumores mais frequentes em adultos jovens e têm potencial de progressão para subtipos de maior grau. |
| Astrocitoma Grau III | Também conhecido como astrocitoma anaplásico, apresenta maior celularidade, atipias nucleares marcantes e um índice mitótico elevado. A invasividade é mais pronunciada, com margens indistintas e potencial para progressão para glioblastoma. A presença de necrose focal e proliferação vascular indica maior agressividade em comparação aos |

| | |
|-------------------------------------|---|
| | graus anteriores. |
| Glioblastoma/Astrocitoma Grau IV | Subtipo mais agressivo entre os gliomas, caracterizado por alta heterogeneidade celular, atipias nucleares extremas, proliferação vascular aberrante e necrose em pseudopaliçada. As células frequentemente exibem pleomorfismo, multinucleação e elevada atividade mitótica. Sua rápida progressão, capacidade de invasão difusa e resistência terapêutica tornam o glioblastoma um dos tumores mais letais do SNC. |
| Schwannoma | Tumores benignos originados das células de Schwann, frequentemente associados aos nervos cranianos ou espinhais. Histologicamente, possuem áreas bipolares densas (Antoni A) e frouxas (Antoni B), além de corpos de Verocay. Apresentam núcleos fusiformes organizados em palisadas e baixa atividade mitótica. Apesar de benignos, podem causar sintomas significativos devido à compressão nervosa. |
| Neuroendócrino | Tumores que frequentemente apresentam características celulares variadas, com agrupamentos de células uniformes, núcleos pequenos e cromatina em sal e pimenta. Possuem marcadores específicos, como sinaptofisina e cromogranina, indicando sua origem neuroendócrina. São altamente vascularizados e podem ser funcionais, produzindo hormônios que causam síndromes paraneoplásicas. |
| Neuroblastoma | Tumores neuroectodérmicos de alta malignidade, originados das células da crista neural. Caracterizam-se por pequenos núcleos hipercromáticos, cromatina densa e escasso citoplasma, formando pseudorosetas de Homer-Wright. São comuns em crianças e frequentemente metastáticos, envolvendo estruturas adjacentes e órgãos distantes. A presença de amplificação do oncogene MYCN está associada a pior prognóstico. |
| Mesenquimal | Tumores derivados de tecidos conectivos, frequentemente associados à região craniofacial. Morfologicamente, apresentam células fusiformes organizadas em feixes, com matriz extracelular colagenosa e áreas de necrose. Podem exibir pleomorfismo e elevada atividade mitótica, dependendo do grau de malignidade. A angiogênese é frequentemente proeminente nesses tumores. |
| Metástase/Invasão | Caracterizam-se por serem lesões secundárias provenientes de tumores primários de outros órgãos, como pulmão, mama ou rim. Possuem alta heterogeneidade celular, com núcleos pleomórficos, hipercromáticos e alto índice mitótico. Apresentam margens mal definidas, frequentemente infiltrando o parênquima cerebral. A presença de necrose central e |

| |
|---|
| padrão vascular aberrante é comum, refletindo a agressividade e capacidade de disseminação. |
|---|

No que tange aos resultados supracitados, Ostrom et al. (2021) corroboram, enfatizando sobre a prevalência de gliomas como as neoplasias malignas mais comuns do SNC em adultos, enquanto meningiomas continuam a ser o tipo mais frequente de tumor não maligno, confirmando a alta taxa de meningiomas grau I neste estudo. As características histológicas observadas, como corpos psamomatosos em meningiomas e pseudopaliçadas em GBs, alinham-se às descrições clássicas desses tumores na literatura, como apontado por Zavarise et al. (2024), que destacaram a importância dos critérios histopatológicos e moleculares para o diagnóstico e prognóstico dessas neoplasias.

A presença de schwannomas em 13% dos casos reforça a relevância desse tipo de tumor, que, de acordo com Mendes et al. (2014), apresenta crescimento lento e geralmente benigno, mas com impacto clínico significativo dependendo da localização. Neoplasias metastáticas, representando 19% dos casos, também refletem dados de Santos et al. (2021), que identificaram um número considerável de tumores secundários em amostras semelhantes, destacando a necessidade de estratégias terapêuticas personalizadas.

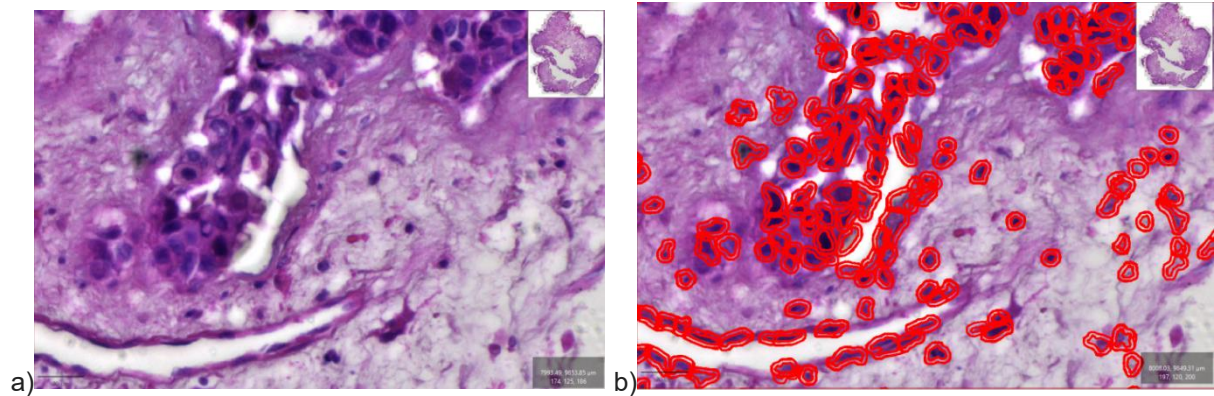
Adicionalmente, os astrocitomas grau II e III, embora menos frequentes, confirmam as observações de Zavarise et al. (2024), que mencionam a raridade desses tumores em comparação aos gliomas de alto grau. A inclusão de neoplasias menos comuns, como neuroblastomas olfatórios e tumores neuroendócrinos, também amplia a relevância clínica e científica do estudo, pois enfatiza a diversidade de neoplasias que podem afetar o SNC. Dessa forma, os achados refletem não apenas padrões epidemiológicos conhecidos, mas também confirmam a importância do diagnóstico precoce e da classificação detalhada, como proposto por Ostrom et al. (2021) e Mendes et al. (2014), para um manejo mais eficaz dos pacientes.

Histomorfometria

Com o conjunto de imagens digitalizadas das lâminas coradas em Hematoxilina e Eosina (H&E) foi possível realizar a segmentação dos núcleos das células por meio

do algoritmo *Cell Detection* do QuPath, assim como salientado na figura 9.

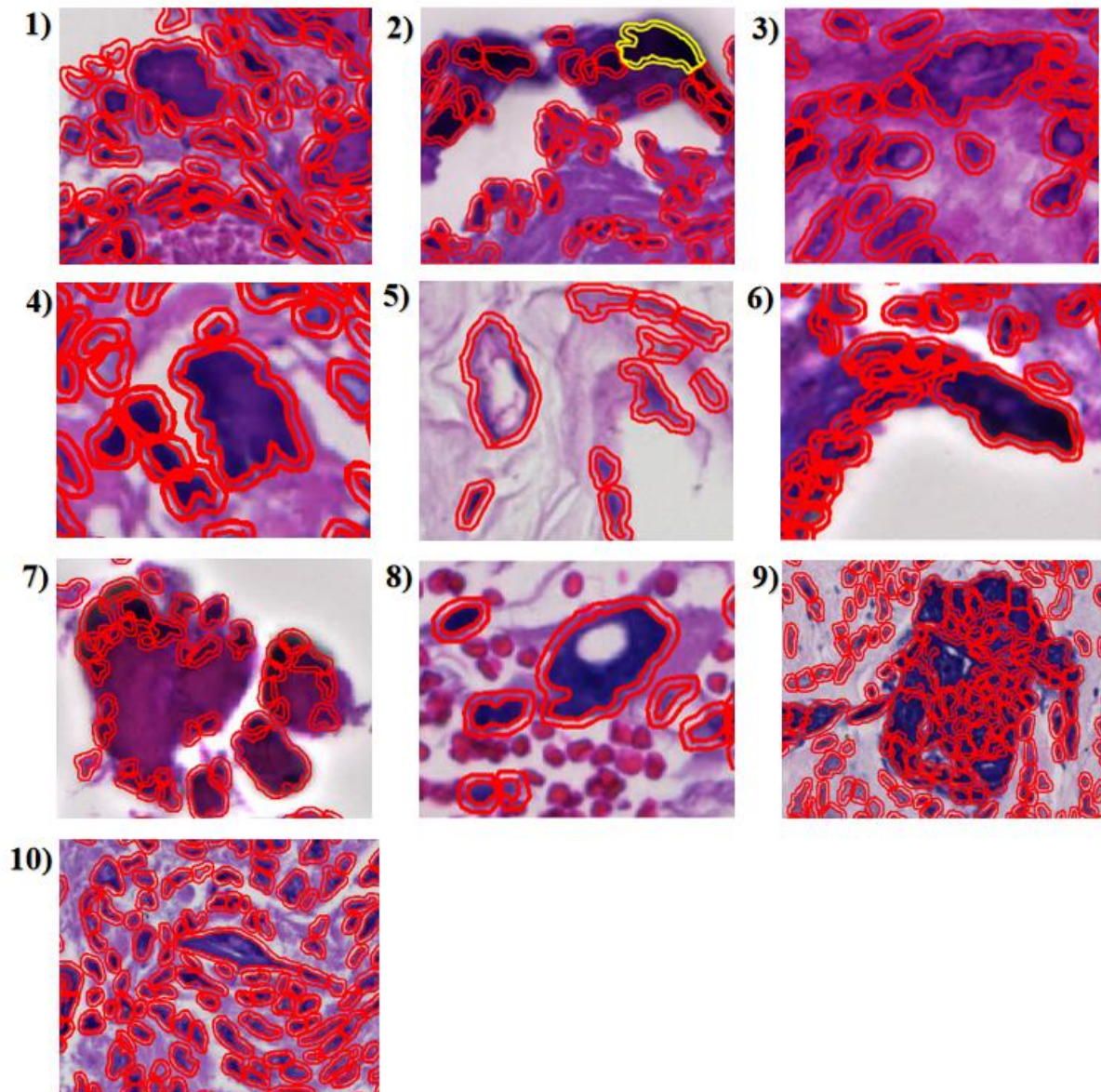
Figura 9: Exemplo de Segmentação de Imagem da Lâmina Digitalizada do Paciente 8754 (Schwannoma)



Legenda: a) Lâmina Original Digitalizada com ampliação de 20x. b) Lâmina Original Segmentada pelo Algoritmo *Cell Detection* do QuPath com as seguintes especificações: 7 de *Background radius - Nucleus*, 1.5 de *Sigma*, 10 de *Minimum area*, 400 de *Maximum area*, 2 de *Cell expansion*, 0.1 de *Threshold*, 2 de *Maximum background intensity*, com *Split by shape* e com *Smooth boundaries*.

Por meio da segmentação, identificou-se um conjunto de células com núcleos gigantes, sendo 7% para Ependimoma Grau II, 12% para Astrocitoma Grau III, 10% para Neuroendócrino, 4% para Mesenquimal, 3% para GB/Astrocitoma Grau IV, 27% para Schwannoma, 28% para Meningioma Grau I, 14% para Neuroblastoma, 16% para Astrocitoma Grau II e 31% para Metástase/Invasão, o que remonta aos achados *in vitro* (Vide figura 10).

Figura 10: Exemplos de diferentes Subtipos Tumorais Segmentados



Legenda: 1) EP=Ependimoma Grau II, 2) AIII=Astrocitoma Grau III, 3) NE=Neuroendócrino, 4) MS=Mesenquimal, 5) AIV/GB=GB/Astrocitoma Grau IV, 6) S=Schwannoma, 7) M=Meningioma Grau I, 8) NB=Neuroblastoma, 9) AII=Astrocitoma Grau II e 10) MT=Metástase/Invasão.

Para a verificação das relações estatísticas presentes entre a média geral dos valores de área e perímetro para cada subtipo tumoral, realizou-se uma média ponderada para subtipos tumorais que estavam presentes em mais de uma lâmina de paciente, fornecendo um valor de média geral com respectivos desvio-padrão para os subtipos tumorais que possuíam mais de um paciente, como destacado na

tabela 11.

Tabela 11: Média Geral de Área e Perímetro dos Subtipos Tumorais calculadas por Média Ponderada

| Subtipo | Média Geral de | Desvio-Padrão | Média Geral | Desvio-Padrão |
|---------|----------------|---------------|-------------|---------------|
| Tumoral | Área | (Área) | Perímetro | (Perímetro) |
| AII | 21,68 | 0 | 177,774 | 0 |
| AIII | 22,91 | 0 | 193,592 | 0 |
| AIV/GB | 22,45 | 1,311 | 182,454 | 10,01 |
| EP | 21,27 | 0 | 174,653 | 0 |
| M | 23,43 | 2,552 | 184,149 | 10,22 |
| MS | 20,7 | 0 | 173,956 | 0 |
| MT | 23,94 | 2,433 | 187,015 | 12,066 |
| NB | 24,77 | 0 | 182,211 | 0 |
| NE | 22,85 | 1,14 | 182,42 | 8,237 |
| S | 23,66 | 3,057 | 182,655 | 14,288 |

Legenda: M=Meningioma Grau I, MT=Metástase/Invasão, EP=Ependimoma Grau II, AI=Astrocitoma Grau I, AII=Astrocitoma Grau II, AIII=Astrocitoma Grau III, AIV/GB=GB/Astrocitoma Grau IV, S=Schwannoma, NE=Neuroendócrino, MS=Mesenquimal, NB=Neuroblastoma. Perímetro= μm e Área= μm^2 .

Tendo em vista, a ausência de mais de um paciente apresentando EP, AII, AIII, MS e NB, para um comparativo entre todos os resultados foi possível aplicar somente a identificação de um coeficiente de variação (CV), indicando o subtipo S com um elevado CV de 12,92% para área, que representa uma alta variabilidade, e de intervalos de confiança (IC), salientando que o subtipo AIV/GB ([19,88;25,02]) não se sobrepõe ao IC do subtipo S ([17,67;29,65]), indicando uma possível diferença significativa. Por meio do indicativo anterior de diferença de ICs, visando avaliar potenciais diferenças significativas perante às variáveis de Área e Perímetro, foram removidos os subtipos tumorais sem desvio-padrão e reformulada a tabela 11 para a tabela 12.

Tabela 12: Média de Área e Perímetro dos Subtipos Tumorais com Desvio-Padrão

| Subtipo | Média Geral de | Desvio-Padrão | Média Geral | Desvio-Padrão |
|---------|----------------|---------------|-------------|---------------|
| Tumoral | Área | (Área) | Perímetro | (Perímetro) |
| AIV/GB | 22,45 | 1,311 | 182,454 | 10,01 |
| M | 23,43 | 2,552 | 184,149 | 10,22 |
| MT | 23,94 | 2,433 | 187,015 | 12,066 |
| NE | 22,85 | 1,14 | 182,42 | 8,237 |
| S | 23,66 | 3,057 | 182,655 | 14,288 |

Legenda: M=Meningioma Grau I, MT=Metástase/Invasão, AIV/GB=GB/Astrocitoma Grau IV, S=Schwannoma, NE=Neuroendócrino. Perímetro= μm e Área= μm^2 .

No que tange a inferência estatística, utilizando-se do *Python* no *Google Colab*, aplicou-se o Teste de Shapiro-Wilk, identificando distribuição normal para valores de área (pvalue=0.759) e normalidade marginal para perímetro (pvalue=0.0503). Em seguida, com o Teste de Levene, indicou-se homogeneidade das variâncias entre os grupos (área x perímetro, pvalue=0.367). Em sequência, os resultados do Teste de ANOVA, indicaram que a área apresenta diferenças significativas entre os grupos (F=2.70 e pvalue=0.032) e o perímetro não possui diferenças significativas entre os grupos (F=1.25 e pvalue=0.291). Por fim, ao aplicar o Teste Tukey HSD para identificação dos pares com diferença estatística, observou-se que somente para a variável de área entre os grupos AIV/GB e MT teve diferença estatisticamente significativa (pvalue adj=0.017).

Os resultados do estudo evidenciaram que a distribuição de células com núcleos gigantes varia significativamente entre subtipos tumorais, com predomínio em Metástase/Invasão (31%), Meningioma Grau I (28%) e Schwannoma (27%). Esses achados estão alinhados com Kolles et al. (1995), que destacaram a relevância do índice Ki-67 e do volume nuclear na diferenciação de meningiomas, indicando que padrões morfométricos desempenham papel central no prognóstico e classificação. A baixa prevalência de núcleos gigantes em subtipos como Ependimoma Grau II (7%) e GB/Astrocitoma Grau IV (3%) reforça a heterogeneidade morfológica, corroborando Nafe et al. (2005), que identificaram diferenças significativas no tamanho e deformidade nuclear associadas ao potencial maligno em glioblastomas. Essa relação entre deformidade nuclear e agressividade tumoral também é

sustentada por Yoshii et al. (1995), que apontaram que gliomas com maior ploidia e maiores índices SG2M apresentam maior malignidade e deformidade nuclear.

O uso de inteligência artificial na análise morfológica de núcleos, como demonstrado por Jensen et al. (2024), valida a abordagem empregada no presente estudo, especialmente na identificação de características como hiperplasia e pleomorfismo nuclear em gliomas e outros tumores do SNC. Contudo, dificuldades técnicas para segmentação de células multinucleadas, também apontadas por Jensen et al. (2024), refletem limitações em bancos de dados de imagens, destacando a necessidade de otimização metodológica. Além disso, os achados do estudo sobre diferenças significativas na área nuclear entre GB/Astrocitoma Grau IV e Metástase/Invasão, revelados por ANOVA e Teste de Tukey HSD, são consistentes com Whitney et al. (2022), que destacaram a relação entre características nucleares, como forma e textura, e subtipos moleculares de meduloblastomas, sugerindo que essas variáveis podem ser usadas como marcadores prognósticos.

A variabilidade observada no coeficiente de variação (CV) para Schwannoma (12,92%) reflete a diversidade morfológica desse subtipo, alinhando-se às observações de Surowka et al. (2014), que destacaram mudanças significativas no formato e tamanho dos núcleos em diferentes subtipos tumorais, especialmente em gliomas de alto grau. A normalidade e a homogeneidade das variâncias, indicadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, reforçam a robustez das análises, conforme defendido por Olaniyi et al. (2023), que enfatizaram a importância de validação estatística em ferramentas de segmentação para aplicações clínicas. Ademais, as análises morfométricas e estatísticas destacam que parâmetros nucleares, como área e deformidade, são preditores robustos de malignidade, como demonstrado por Yoshii et al. (1995), que identificaram que gliomas aneuploides com maior SG2M apresentaram maiores deformidades nucleares e agressividade clínica.

A integração de abordagens computacionais e métodos estatísticos oferece uma ferramenta valiosa para a classificação de tumores do SNC, fornecendo insights que contribuem para a estratificação de risco e planejamento terapêutico, alinhando-se às tendências emergentes na literatura. Essas análises também sugerem que a combinação de características morfométricas, como textura e tamanho nuclear, com

subtipos moleculares, pode melhorar a capacidade prognóstica, como proposto por Whitney et al. (2022), avançando na direção de terapias personalizadas baseadas em dados morfológicos e moleculares.

8 CONCLUSÕES

Os resultados do estudo evidenciaram uma interconexão relevante entre os achados computacionais, *in vitro* e translacionais, reforçando a relevância translacional das *PGCCs/MNGCs* no GB. O estudo computacional destacou que essas células apresentam uma capacidade única de adaptação e resistência, atribuída à plasticidade epigenética e à desregulação de vias de sinalização como Ras-Raf/MEK/ERK e PI3K/Akt/mTOR, conforme esquematizado na Figura 5. A interação com o microambiente tumoral e a reprogramação metabólica, incluindo glicólise aeróbica e síntese de ácidos graxos, foram apontadas como cruciais para a sobrevivência e progressão do GB, corroborando com Jensen et al. (2024), que validaram a importância da segmentação nuclear na identificação de pleomorfismo e hiperplasia em tumores do SNC. O modelo computacional sugeriu que a poliploidização das *PGCCs/MNGCs* promove resistência a múltiplas drogas e favorece a formação de células iniciadoras de câncer, alinhando-se aos achados de Yoshii et al. (1995), que relacionaram deformidade nuclear e ploidia com a agressividade tumoral.

No estudo *in vitro*, essas características computacionais foram corroboradas pela análise morfométrica de células tratadas com TMZ, que exibiram aumento na área nuclear e citoplasmática, indicando poliploidização como mecanismo adaptativo ao estresse terapêutico. A presença de fenótipos com multinucleações e micronucleações reforça a ideia de que *PGCCs/MNGCs* emergem como subpopulações resistentes, conforme sugerido por Nafe et al. (2005), que relacionaram a deformação nuclear ao potencial maligno em gliomas. O impacto da reorganização citoesquelética, mediada por proteínas como cofilina e tropomiosinas, também foi evidenciado, corroborando a ligação entre motilidade celular, invasividade e resistência ao tratamento descrita por Jensen et al. (2024). A diversidade intratumoral observada *in vitro*, com adaptações ao ambiente hipóxico e variações nutricionais, reflete a plasticidade das *PGCCs/MNGCs* e sua capacidade de remodelar o microambiente tumoral.

Translacionalmente, os desfechos clínicos corroboram os dados computacionais e *in vitro*, mostrando ampla diversidade de resultados em pacientes com GB e outros

tumores do SNC. A alta prevalência de meningiomas grau I (35%) e GBs (19%), assim como as características histológicas como corpos psamomatosos em meningiomas e pseudopaliçadas em GBs, refletem os achados de Mendes et al. (2014) e Ostrom et al. (2021), que apontam esses tumores como os mais prevalentes no SNC. As complicações pós-operatórias, como hidrocefalia e infecções, são consistentes com Zavarise et al. (2024), que destacaram a necessidade de abordagens multidisciplinares para reduzir a morbidade. A utilização de tratamentos personalizados, como radioterapia e dexametasona, reforça a importância de integrar biomarcadores genéticos ao manejo clínico, conforme proposto por Barioni et al. (2024). A observação de resistência ao tratamento em casos de GB, com recidivas frequentes e complicações neurológicas, confirma a necessidade de novas estratégias terapêuticas baseadas em dados morfológicos e moleculares, como sugerido por Whitney et al. (2022).

A integração dos estudos computacional, *in vitro* e translacional aponta para a relevância das *PGCCs/MNGCs* como alvos terapêuticos potenciais no GB, fornecendo uma base robusta para o desenvolvimento de tratamentos personalizados. As abordagens computacionais destacam vias moleculares e padrões morfométricos, enquanto os dados *in vitro* oferecem evidências concretas de adaptação celular. Os achados translacionais validam a aplicabilidade clínica, reforçando a necessidade de políticas públicas para melhorar o diagnóstico precoce e ampliar o acesso ao tratamento, conforme proposto por Zavarise et al. (2024). Em suma, o estudo consolida a importância de abordagens integradas para explorar a complexidade das *PGCCs/MNGCs* no contexto do GB e sua implicação no manejo clínico e terapêutico como uma proposta exploratória inicial consistente com o que se objetivou previamente.

9 DESAFIOS, LIMITAÇÕES E SUPERAÇÕES DO ESTUDO

Durante a realização do estudo, destacaram-se alguns desafios, limitações e superações, evidenciando a complexidade de um projeto que exigiu esforço contínuo, resiliência e inovação. A dificuldade na obtenção de material humano foi um dos primeiros obstáculos, dada a necessidade de amostras representativas para garantir a qualidade e relevância científica dos resultados. Essa etapa exigiu um rigoroso processo de aprovação no Comitê de Ética do Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes (HUCAM) e o Centro de Ciências da Saúde (CCS), que, embora necessário para assegurar conformidade com padrões éticos e legais, demandou tempo considerável devido às exigências documentais e à análise detalhada dos protocolos, tendo em vista a necessidade de submissão de duas emendas pelo fato da inclusão de parceiros como o Hospital Estadual Central (HEC), Hospital Santa Rita de Cássia (HSRC) e a Fundação Estadual de Inovação em Saúde - iNOVA Capixaba.

Outro ponto crítico foi a limitação de verba para custeio, um entrave comum em projetos de alta complexidade. A busca por financiamento levou à exploração de parcerias público-privadas como alternativa viável para viabilizar o estudo. A obtenção de recursos financeiros foi dificultada pela burocracia inerente aos processos de captação e repasse de verbas pela Empresa Vale, que conseguimos a parceria e tivemos que superar muitas demandas de diversos setores institucionais da UFES e da Vale, mas a superação desse desafio foi possível por meio de uma articulação estratégica quanto ao impacto da pesquisa pretendida e também dos impactos científico e social do projeto retornáveis para a Sociedade, Vale e UFES.

A complexidade do projeto foi intensificada por questões logísticas, como a necessidade de movimentar amostras e equipamentos para São Paulo e problemas técnicos enfrentados com o digitalizador do HSRC. Esses contratemplos trouxeram atrasos, mas foram superados por meio de soluções inovadoras, como outra parceria estabelecida com o Prof. Dr. Mario Costa Cruz quem disponibilizou o acesso ao digitalizador sob sua supervisão na Facility CONFOCAL localizada no Centro de Facilidades para a Pesquisa (CEFAP) na Universidade de São Paulo (USP). Em paralelo, demandou-se uma estruturação da logística de transporte por meio do uso de transportadora especializada no Deslocamento de Material Biológico. Assim, a

capacitação e o estabelecimento de parcerias pelo diálogo constante foram essenciais para garantir o enfrentamento desse desafio e alcançar a entrega no tempo correto, sendo um movimento de adaptar-se a mudanças inesperadas no cronograma.

Parcerias alcançadas ao longo do projeto foram determinantes para a finalização dessa dissertação. Isto porque, colaborações com laboratórios, universidades e empresas fortaleceram a infraestrutura disponível e proporcionaram acesso a tecnologias e desenvolver expertises que seriam inviáveis de outra forma. Essas parcerias também contribuíram para a superação burocrática, viabilizando a obtenção de recursos e simplificando etapas administrativas. Ao final, o estudo não apenas superou as limitações iniciais, mas também estabeleceu bases sólidas para futuras pesquisas, reforçando a importância de planejamento estratégico, colaboração e inovação como pilares fundamentais para enfrentar desafios em projetos científicos de grande escala.

10 PERSPECTIVAS FUTURAS

Na continuação da proposta dessa pesquisa para inúmeros outros ensaios e metodologias a serem desenvolvidas no doutorado, demandarão de aprofundamentos únicos quanto à associação integrada de estudo computacional, *in vitro* e translacional, conjuntos e relacionados às informações longitudinais quanto a evolução do tumor ao longo de estressores. Para tanto, elucidações moleculares e tavaliações histo-/morfométricas adicionam uma valorosa aplicação de personalização e velocidade tanto ao diagnóstico quanto a um prognóstico em tempo real ao setor patológico e para melhorar a utilização de tratamentos adaptados às necessidades de cada paciente e reduzindo efeitos colaterais.

Dessa maneira, evidencia-se que novos desbravamentos precisam e devem romper um gap entre pesquisa básica e clínica de forma a traçar uma inovação translacional por meio da análise morfológica no câncer com metodologias diversas, indo da área computacional à clínica. Para tanto, análises de células individuais e rastreamento *in vitro* de células individuais são fronteiras do conhecimento essenciais para decifrar a heterogeneidade tumoral e melhorar as estratégias de tratamento. E com isso, a patologia digital combinada com a análise de imagens, por meio de softwares como QuPath, incorporam aprimoramentos significativos para elucidações comparativas entre aspectos morfométricos e resultados clínicos.

Conseqüentemente, novos insights serão alcançáveis através de conexões multidisciplinares (e flexíveis às novidades) em estudos funcionais, misturando conceitos de entropia e caos (refletindo a imprevisibilidade do crescimento, perda de ordem e disseminação de células malignas), mecânica quântica (aspectos moleculares em nível atômico e impactos tecnológicos relacionados à nanotecnologia e terapêuticas), evolução e genética de diversas subpopulações, como *PGCCs/MNGCs* (novas estratégias terapêuticas baseadas na progressão evolutiva do tumor por seleção natural, mutações, herança Mendeliana e McClintock, e melhorias na personalização), e computação avançada (Inteligência Artificial).

Por fim, para o alcance desses novos insights, os próximos passos deste estudo se concentram em expandir e aprofundar as análises realizadas, com o objetivo de aumentar a robustez dos resultados e explorar novas abordagens científicas. Um

dos focos principais será a digitalização de um maior número de lâminas, permitindo a ampliação do conjunto de dados e o aumento do tamanho amostral (n). Essa expansão é essencial para garantir maior representatividade estatística, melhorando a confiabilidade das inferências e a validade externa dos achados.

Além disso, a realização de outros estudos *in vitro* será uma etapa crucial para validar as observações obtidas em análises digitais e computacionais. Para tanto, serão aplicadas metodologias inovadoras como scMTT (publicada pelo Prof. Dr. Razmik Mirzayans) e a quantificação de DNA nuclear por espectroscopia de Raman. Paralelamente, planeja-se ampliar as diferentes marcações utilizadas (como a inclusão da Coloração por Feulgen e Densitometria por Microscopia para quantificar DNA nuclear), incorporando biomarcadores adicionais que possam fornecer informações mais detalhadas sobre os processos celulares, como proliferação, invasão e resistência terapêutica. Assim como a identificação, quantificação e caracterização de *PGCCs/MNGCs* em uma abordagem multimarcação, trazendo uma análise mais rica e integrada dos fenótipos tumorais.

Outra prioridade será a otimização do algoritmo de segmentação, que desempenha papel central na análise das imagens digitalizadas. Melhorias no algoritmo visam aumentar sua precisão na identificação e delimitação de células (como células multinucleadas) e estruturas nucleares, minimizando erros de segmentação e potencializando a extração de parâmetros morfométricos. Essa otimização poderá incluir o uso de técnicas de aprendizado de máquina ou redes neurais convolucionais, garantindo que o algoritmo seja adaptável a diferentes padrões morfológicos encontrados nos tumores analisados.

Nesse sentido, esses próximos passos consolidam um plano de ação estratégico para elevar o nível científico do estudo, ampliando sua aplicabilidade e impacto. Ao integrar esforços para melhorar a coleta de dados, a análise computacional e os experimentos laboratoriais, o projeto não apenas reforça sua contribuição acadêmica, mas também abre caminhos para avanços translacionais em diagnóstico, prognóstico e terapias personalizadas no contexto de tumores do sistema nervoso central.

REFERÊNCIAS

- AASLAND, D. et al. Temozolomide induces senescence and repression of DNA repair pathways in glioblastoma cells via activation of ATR–CHK1, p21, and NF- κ B. *Cancer Research*, v. 79, n. 1, p. 99–113, 2019.
- ABEL, J. et al. Cell-type-specific nuclear morphology predicts genomic instability and prognosis in multiple cancer types. *bioRxiv*, 2023.
- ALAMEDDINE, R. S.; HAMIEH, L.; SHAMSEDDINE, A. From sprouting angiogenesis to erythrocytes generation by cancer stem cells: evolving concepts in tumor microcirculation. *BioMed Research International*, v. 2014, Art. ID 986768, 2014.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Biologia molecular da célula*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2006.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Biologia molecular da célula*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2010.
- ALEXANDER, B. M.; PINNELL, N.; WEN, P. Y.; D'ANDREA, A. Targeting DNA repair and the cell cycle in glioblastoma. *Journal of Neuro-Oncology*, v. 107, p. 463–477, 2012.
- ALHADDAD, L.; CHUPROV-NETOCHIN, R.; PUSTOVALOVA, M.; OSIPOV, A. N.; LEONOV, S. Polyploid/Multinucleated giant and slow-cycling cancer cell enrichment in response to X-ray irradiation of human glioblastoma multiforme cells differing in radioresistance and TP53/PTEN status. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 2, p. 1228, 2023.
- ALHADDAD, L.; OSIPOV, A. N.; LEONOV, S. The molecular and cellular strategies of glioblastoma and non-small-cell lung cancer cells conferring radioresistance. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 21, p. 13577, 2022.
- AMEND, S. R.; TORGA, G.; LIN, K. C.; KOSTECKA, L. G.; DE MARZO, A.; AUSTIN, R. H.; PIENTA, K. J. Polyploid giant cancer cells: unrecognized actuators of tumorigenesis, metastasis, and resistance. *The Prostate*, v. 79, n. 13, p. 1489–1497, 2019.
- ANDOR, N.; ALTROCK, P. M.; JAIN, N.; GOMES, A. P. Tipping cancer cells over the edge: the context-dependent cost of high ploidy. *Cancer Research*, v. 82, n. 5, p. 741–748, 2022.

- ARIOTTA, V. et al. H&E image analysis pipeline for quantifying morphological features. *Journal of Pathology Informatics*, v. 14, p. 100339, 2023.
- ASEERVATHAM, J. Cytoskeletal remodeling in cancer. *Biology*, v. 9, n. 11, p. 385, 2020.
- AYDEMIR, E.; ARSLAN, İ. İ.; GÖRKAY, A. H. The application of electromagnetic fields in cancer. In: *Cell Biology and Translational Medicine, Volume 21: Stem Cell in Lineage, Secretome Regulation and Cancer*. Cham: Springer Nature Switzerland, 2023. p. 103–120.
- BAAK, J. P.; VAN DOP, H.; KURVER, P. H.; HERMANS, J. O. The value of morphometry to classic prognosticators in breast cancer. *Cancer*, v. 56, n. 2, p. 374–382, 1985.
- BALÇA-SILVA, J.; MATIAS, D.; DO CARMO, A.; SARMENTO-RIBEIRO, A. B.; LOPES, M. C.; MOURA-NETO, V. Cellular and molecular mechanisms of glioblastoma malignancy: implications in resistance and therapeutic strategies. In: *Seminars in Cancer Biology*, v. 58, p. 130–141, 2019. Academic Press.
- BARIONI, C. T. S.; PEREIRA, G. M.; FERREIRA, M. B.; STECLAN, C. A. Estudo neurogenético de tumores do sistema nervoso central: uma análise comparativa com biomarcadores epidemiológicos em prol da construção de banco de dados informatizado. *Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences*, v. 6, n. 12, p. 411–440, 2024.
- BARR FRITCHER, E. G. et al. Correlating routine cytology, quantitative nuclear morphometry by digital image analysis, and genetic alterations by fluorescence in situ hybridization to assess the sensitivity of cytology for detecting pancreatobiliary tract malignancy. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 128, n. 2, p. 272–279, 2007.
- BASAVANHALLY, A. N. Quantitative histomorphometry of digital pathology as a companion diagnostic: predicting outcome for ER+ breast cancers. Rutgers The State University of New Jersey, School of Graduate Studies, 2014.
- BASTIDA-RUIZ, D.; VAN HOESEN, K.; COHEN, M. The dark side of cell fusion. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, n. 5, p. 638, 2016.
- BAUER, M. F. et al. Cell-in-cell structures in early breast cancer are prognostically valuable. *Cells*, v. 12, n. 1, p. 81, 2022.

BEGNINI, K. R.; PEREIRA, L. C.; FACCIÓNI, J. L.; LENZ, G.; FILIPPI-CHIELA, E. C. Bioimaging approaches for quantification of individual cell behavior during cell fate decisions. *Biochemical Society Transactions*, v. 50, n. 1, p. 513–527, 2022.

BHARADWAJ, D.; MANDAL, M. Senescence in polyploid giant cancer cells: a road that leads to chemoresistance. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 52, p. 68–75, 2020.

BIGGIOGERA, M.; CAVALLO, M.; CASALI, C. A brief history of the Feulgen reaction. *Histochemistry and Cell Biology*, p. 1–10, 2024.

BISWAS, A. et al. Conserved nucleocytoplasmic density homeostasis drives cellular organization across eukaryotes. *bioRxiv*, 2023-09, 2023.

BÖCKING, A.; FRIEDRICH, D.; SCHRAMM, M.; PALCIC, B.; ERBEZNIK, G. DNA karyometry for automated detection of cancer cells. *Cancers*, v. 14, n. 17, p. 4210, 2022.

BOJKO, A. et al. Improved autophagic flux in escapers from doxorubicin-induced senescence/polyploidy of breast cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 17, p. 6084, 2020.

BORAH, B. J. et al. Rapid digital pathology of H&E-stained fresh human brain specimens as an alternative to frozen biopsy. *Communications Medicine*, v. 3, n. 1, p. 77, 2023.

BUCCITELLI, C.; SALGUEIRO, L.; ROWALD, K.; SOTILLO, R.; MARDIN, B. R.; KORBEL, J. O. Pan-cancer analysis distinguishes transcriptional changes of aneuploidy from proliferation. *Genome Research*, v. 27, n. 4, p. 501–511, 2017.

BUHMEIDA, A. Quantitative pathology: historical background, clinical research and application of nuclear morphometry and DNA image cytometry. *Libyan Journal of Medicine*, v. 1, n. 2, p. 126–139, 2006.

CARELLA, F.; DE VICO, G.; LANDINI, G. Nuclear morphometry and ploidy of normal and neoplastic haemocytes in mussels. *PLoS One*, v. 12, n. 3, p. e0173219, 2017.

CASOTTI, et al. Construindo redes de interação proteína-proteína por curadoria manual. 2021. Disponível em: <https://bioinfo.com.br/construindo-redes-de-interacao-proteina-proteina-por-curadoria-manual/>. Acesso em: 24 jul. 2024.

CASOTTI, M. C.; MEIRA, D. D.; ZETUM, A. S. S.; ARAÚJO, B. C. D.; SILVA, D. R. C.

- D.; SANTOS, E. D. V. W. D.; et al. Computational biology helps understand how polyploid giant cancer cells drive tumor success. *Genes*, v. 14, n. 4, p. 801, 2023.
- CAVALIER-SMITH, T. Economy, speed and size matter: evolutionary forces driving nuclear genome miniaturization and expansion. *Annals of Botany*, v. 95, n. 1, p. 147–175, 2005.
- CECCALDI, R.; RONDINELLI, B.; D'ANDREA, A. D. Repair pathway choices and consequences at the double-strand break. *Trends in Cell Biology*, v. 26, n. 1, p. 52–64, 2016.
- CHARPIN, C. et al. Correlation of nucleolar organizer regions and nuclear morphometry assessed by automatic image analysis in breast cancer with aneuploidy, K167 immunostaining, histopathologic grade and lymph node involvement. *Pathology – Research and Practice*, v. 188, n. 8, p. 1009–1017, 1992.
- CHARPIN, C. et al. Digital image-analysis of nuclear morphometry, DNA-ploidy and AgNORs in breast-carcinoma cell imprints. *International Journal of Oncology*, v. 3, n. 5, p. 949–956, 1993.
- CHEN, M.; XIE, S. Therapeutic targeting of cellular stress responses in cancer. *Thoracic Cancer*, v. 9, n. 12, p. 1575–1582, 2018.
- CHEN, R. J. et al. Pan-cancer integrative histology-genomic analysis via multimodal deep learning. *Cancer Cell*, v. 40, n. 8, p. 865–878, 2022.
- CHEN, S.; JIANG, W.; DU, Y.; YANG, M.; PAN, Y.; LI, H.; CUI, M. Single-cell analysis technologies for cancer research: from tumor-specific single cell discovery to cancer therapy. *Frontiers in Genetics*, v. 14, p. 1276959, 2023.
- CLOUGHESY, T. F.; CAVENEE, W. K.; MISCHSEL, P. S. Glioblastoma: from molecular pathology to targeted treatment. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, v. 9, n. 1, p. 1–25, 2014.
- DE ROBERTIS, D. P.; HIB, J. *Biologia Celular e Molecular*. Guanabara Koogan, 2017.
- DELGADO-MARTÍN, B.; MEDINA, M. Á. Advances in the knowledge of the molecular biology of glioblastoma and its impact in patient diagnosis, stratification, and treatment. *Advanced Science*, v. 7, n. 9, p. 1902971, 2020.
- DEMIN, S.; BERDIEVA, M.; GOODKOV, A. Cell-cell fusions and cell-in-cell

- phenomena in healthy cells and cancer: lessons from protists and invertebrates. In: *Seminars in Cancer Biology*, v. 81, p. 96–105, 2022.
- DEY, P. Cancer nucleus: morphology and beyond. *Diagnostic Cytopathology*, v. 38, n. 5, p. 382–390, 2010.
- DIBITETTO, D. et al. Slx4 and Rtt107 control checkpoint signalling and DNA resection at double-strand breaks. *Nucleic Acids Research*, v. 44, n. 2, p. 669–682, 2016.
- DIBITETTO, D. et al. DNA-PKcs promotes fork reversal and chemoresistance. *Molecular Cell*, v. 82, n. 20, p. 3932–3942, 2022.
- DONCHEVA, N. T.; ASSENOV, Y.; DOMINGUES, F. S.; ALBRECHT, M. Topological analysis and interactive visualization of biological networks and protein structures. *Nature Protocols*, v. 7, n. 4, p. 670–685, 2012.
- DONG, J.; HORVATH, S. Understanding network concepts in modules. *BMC Systems Biology*, v. 1, p. 1–20, 2007.
- DOYLE, J. J.; COATE, J. E. Polyploidy, the nucleotype, and novelty: the impact of genome doubling on the biology of the cell. *International Journal of Plant Sciences*, v. 180, n. 1, p. 1–52, 2019.
- DUDÁS, J.; LADÁNYI, A.; INGRUBER, J.; STEINBICHLER, T. B.; RIECHELMANN, H. Epithelial to mesenchymal transition: a mechanism that fuels cancer radio/chemoresistance. *Cells*, v. 9, n. 2, p. 428, 2020.
- EL DIN, A. A. G. et al. DNA cytometry and nuclear morphometry in ovarian benign, borderline and malignant tumors. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, v. 3, n. 4, p. 537, 2015.
- ERASIMUS, H.; GOBIN, M.; NICLOU, S.; VAN DYCK, E. DNA repair mechanisms and their clinical impact in glioblastoma. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, v. 769, p. 19–35, 2016.
- ERENPREISA, J.; CRAGG, M. S. Three steps to the immortality of cancer cells: senescence, polyploidy and self-renewal. *Cancer Cell International*, v. 13, p. 1–12, 2013.
- ERENPREISA, J. et al. Spatial-temporal genome regulation in stress-response and cell-fate change. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 3, p. 2658,

2023.

ERENPREISA, J.; SALMINA, K.; ANATSKAYA, O.; CRAGG, M. S. Paradoxes of cancer: survival at the brink. In: *Seminars in Cancer Biology*, v. 81, p. 119–131, 2022a.

ERENPREISA, J.; SALMINA, K.; ANATSKAYA, O.; VINOGRADOV, A.; CRAGG, M. The enigma of cancer resistance to treatment. *Organisms. Journal of Biological Sciences*, v. 5, n. 2, p. 71–75, 2022b.

ERRINGTON, R. J. et al. Time-Lapse Microscopy Approaches to Track Cell Cycle and Lineage Progression at the Single-Cell Level. *Current Protocols in Cytometry*, v. 64, n. 1, p. 12–4, 2013.

FABRO, F.; LAMFERS, M. L.; LEENSTRA, S. Advancements, challenges, and future directions in tackling glioblastoma resistance to small kinase inhibitors. *Cancers*, v. 14, n. 3, p. 600, 2022.

FEI, F. et al. The subcellular location of cyclin B1 and CDC25 associated with the formation of polyploid giant cancer cells and their clinicopathological significance. *Laboratory Investigation*, v. 99, n. 4, p. 483–498, 2019.

FEI, F. et al. The number of polyploid giant cancer cells and epithelial-mesenchymal transition-related proteins are associated with invasion and metastasis in human breast cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, v. 34, p. 1–13, 2015.

FERNANDES, C. et al. Cancer cell fusion: a potential target to tackle drug-resistant and metastatic cancer cells. *Drug Discovery Today*, v. 24, n. 9, p. 1836–1844, 2019.

FISCHER, A. H. The diagnostic pathology of the nuclear envelope in human cancers. In: *Cancer Biology and the Nuclear Envelope: Recent Advances May Elucidate Past Paradoxes*, p. 49–75, 2014.

FISCHER, E. G. Nuclear morphology and the biology of cancer cells. *Acta Cytologica*, v. 64, n. 6, p. 511–519, 2020.

FLEMING, H. Opaque polyploid cells in Ishikawa endometrial cultures are capable of forming megamitochondria, organelles derived from the adaptation of fused mitochondria whose capacity to develop gaseous vacuoles suggests CO₂ retention and hypoxic metabolism. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, v. 12, n. 07, p.

229–255, 2021.

FUJITA, M. et al. Aurora-B dysfunction of multinucleated giant cells in glioma detected by site-specific phosphorylated antibodies. *Journal of Neurosurgery*, v. 101, n. 6, p. 1012–1017, 2004.

FULDA, S.; GORMAN, A. M.; HORI, O.; SAMALI, A. Cellular stress responses: cell survival and cell death. *International Journal of Cell Biology*, 2010, Art. ID 214074, 2010.

FUNG, N. H. et al. Understanding and exploiting cell signalling convergence nodes and pathway cross-talk in malignant brain cancer. *Cellular Signalling*, v. 57, p. 2–9, 2019.

GALLUZZI, L.; YAMAZAKI, T.; KROEMER, G. Linking cellular stress responses to systemic homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 19, n. 11, p. 731–745, 2018.

GEDYE, C.; NAVANI, V. Find the path of least resistance: adaptive therapy to delay treatment failure and improve outcomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Reviews on Cancer*, v. 1877, n. 2, p. 188681, 2022.

GHOSH, S. et al. Characterization of polyploidy in cancer: current status and future perspectives. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 268, p. 131706, 2024.

GIANGASPERO, F.; CHIECO, P.; LISIGNOLI, G.; BURGER, P. C. Comparison of cytologic composition with microfluorometric DNA analysis of the glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. *Cancer*, v. 60, n. 1, p. 59–65, 1987.

GIBIEŽA, P.; PETRIKAITĖ, V. The regulation of actin dynamics during cell division and malignancy. *American Journal of Cancer Research*, v. 11, n. 9, p. 4050, 2021.

GIRDHAR, A.; RAJU IV, K.; SREERAMULU, P. N. Significance of nuclear morphometry in breast lesions: a cross-sectional study. *Cureus*, v. 15, n. 5, 2023.

GIULIANO, A.; NUDDS, A. Understanding cytology as a useful tool for the general practitioner. *Companion Animal*, v. 18, n. 7, p. 308–313, 2013.

GRITSCH, S.; BATCHELOR, T. T.; GONZALEZ CASTRO, L. N. Diagnostic, therapeutic, and prognostic implications of the 2021 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system. *Cancer*, v. 128, n. 1, p. 47–58,

2022.

GROSS, S. M.; SANCHEZ-AGUILA, C.; ZHAN, P. J.; HEISER, L. M. Single cell tracing reveals heterogeneous drug-, dose-, and time-dependent effects on cancer cell fates. Cold Spring Harbor Laboratory, 2020.

GUNNING, P.; O'NEILL, G.; HARDENMAN, E. Tropomyosin-based regulation of the actin cytoskeleton in time and space. *Physiological Reviews*, v. 88, n. 1, p. 1–35, 2008.

HERBEIN, G.; NEHME, Z. Polyploid giant cancer cells, a hallmark of oncoviruses and a new therapeutic challenge. *Frontiers in Oncology*, v. 10, p. 567116, 2020.

HEUER, S.; WINKLER, F. Glioblastoma revisited: from neuronal-like invasion to pacemaking. *Trends in Cancer*, 2023.

HIATT, R. A.; BREEN, N. The social determinants of cancer: a challenge for transdisciplinary science. *American Journal of Preventive Medicine*, v. 35, n. 2, p. S141–S150, 2008.

HILSENBECK, O. et al. Software tools for single-cell tracking and quantification of cellular and molecular properties. *Nature Biotechnology*, v. 34, n. 7, p. 703–706, 2016.

HÖLSCHER, D. L. et al. Next-Generation Morphometry for pathomics-data mining in histopathology. *Nature Communications*, v. 14, n. 1, p. 470, 2023.

HUANG, S.; ERNBERG, I.; KAUFFMAN, S. Cancer attractors: a systems view of tumors from a gene network dynamics and developmental perspective. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 20, n. 7, p. 869–876, 2009.

HUMPHRIES, M. P.; MAXWELL, P.; SALTO-TELLEZ, M. QuPath: the global impact of an open source digital pathology system. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, v. 19, p. 852–859, 2021.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (BRASIL). Estimativa 2022: incidência de câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2022.

JENSEN, M. P. et al. Artificial intelligence in histopathological image analysis of central nervous system tumours: a systematic review. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, v. 50, n. 3, p. e12981, 2024.

JIAO, Y.; YU, Y.; ZHENG, M.; YAN, M.; WANG, J.; ZHANG, Y.; ZHANG, S. Dormant

- cancer cells and polyploid giant cancer cells: the roots of cancer recurrence and metastasis. *Clinical and Translational Medicine*, v. 14, n. 2, p. e1567, 2024.
- KALKAVAN, H.; RÜHL, S.; SHAW, J. J.; GREEN, D. R. Non-lethal outcomes of engaging regulated cell death pathways in cancer. *Nature Cancer*, v. 4, n. 6, p. 795–806, 2023.
- KASHYAP, A. et al. Quantification of tumor heterogeneity: from data acquisition to metric generation. *Trends in Biotechnology*, v. 40, n. 6, p. 647–676, 2022.
- KAUR, E.; RAJENDRA, J.; JADHAV, S.; SHRIDHAR, E.; GODA, J. S.; MOIYADI, A.; DUTT, S. Radiation-induced homotypic cell fusions of innately resistant glioblastoma cells mediate their sustained survival and recurrence. *Carcinogenesis*, v. 36, n. 6, p. 685–695, 2015.
- KHABIBOV, M. et al. Signaling pathways and therapeutic approaches in glioblastoma multiforme. *International Journal of Oncology*, v. 60, n. 6, p. 1–18, 2022.
- KIM, C. J. et al. Nuclear morphology predicts cell survival to cisplatin chemotherapy. *Neoplasia*, v. 42, p. 100906, 2023.
- KIRSCH-VOLDERS, M.; MIŠÍK, M.; GERLACHE, J. D. Tetraploidy as a metastable state towards malignant cell transformation within a systemic approach of cancer development. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 896, p. 503764, 2024.
- KOLLES, H. et al. Triple approach for diagnosis and grading of meningiomas: histology, morphometry of Ki-67/Feulgen stainings, and cytogenetics. *Acta Neurochirurgica*, v. 137, p. 174–181, 1995.
- KRATOCHVILOVA, M. et al. Amino acid profiling of zinc resistant prostate cancer cell lines: associations with cancer progression. *The Prostate*, v. 77, n. 6, p. 604–616, 2017.
- LANZ, M. C. et al. Increasing cell size remodels the proteome and promotes senescence. *Molecular Cell*, v. 82, n. 17, p. 3255–3269, 2022.
- LARSSON, L. I.; BJERREGAARD, B.; TALTS, J. F. Cell fusions in mammals. *Histochemistry and Cell Biology*, v. 129, p. 551–561, 2008.
- LARSSON, L. I. et al. Syncytin and cancer cell fusions. *The Scientific World Journal*, v. 7, p. 1193, 2007.

- LEE, A. H.; MEJIA PEÑA, C.; DAWSON, M. R. Comparing the secretomes of chemorefractory and chemoresistant ovarian cancer cell populations. *Cancers*, v. 14, n. 6, p. 1418, 2022.
- LEITE, C. A. V. G. et al. Receptores tirosina-quinase: implicações terapêuticas no câncer. *Revista Brasileira de Oncologia Clínica*, v. 8, n. 29, p. 130–142, 2012.
- LEMMON, M. A.; SCHLESSINGER, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, v. 141, n. 7, p. 1117–1134, 2010.
- LESSENGER, A. T. et al. Somatic polyploidy supports biosynthesis and tissue function by increasing transcriptional output. *bioRxiv*, 2024-03, 2024.
- LI, C. H. et al. Fascin-1: updated biological functions and therapeutic implications in cancer biology. *BBA Advances*, v. 2, p. 100052, 2022.
- LI, G. J. et al. Correlation between vascular endothelial growth factor and quantitative dual-energy spectral CT in non-small-cell lung cancer. *Clinical Radiology*, v. 71, n. 4, p. 363–368, 2016.
- LI, X. et al. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and targeted therapy for glioblastoma. *Oncotarget*, v. 7, n. 22, p. 33440, 2016.
- LI, Z. et al. Arsenic trioxide promotes tumor progression by inducing the formation of PGCCs and embryonic hemoglobin in colon cancer cells. *Frontiers in Oncology*, v. 11, p. 720814, 2021.
- LIM, H. C.; MULTHAUP, H. A.; COUCHMAN, J. R. Cell surface heparan sulfate proteoglycans control adhesion and invasion of breast carcinoma cells. *Molecular Cancer*, v. 14, p. 1–18, 2015.
- LIN, L. S. et al. Trend analysis of palliative care consultation service for terminally ill non-cancer patients in Taiwan: a 9-year observational study. *BMC Palliative Care*, v. 20, p. 1–11, 2021.
- LIU, J. The dualistic origin of human tumors. In: *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press, 2018. v. 53, p. 1–16.
- LIU, J.; ERENPREISA, J.; SIKORA, E. Polyploid giant cancer cells: an emerging new field of cancer biology. In: *Seminars in Cancer Biology*, v. 81, p. 1–4, 2022.
- LIU, K. et al. Association and clinicopathologic significance of p38MAPK-ERK-JNK-CDC25C with polyploid giant cancer cell formation. *Medical Oncology*, v. 37, p. 1–11,

2020.

LOPEZ-SÁNCHEZ, L. M. et al. CoCl_2 , a mimic of hypoxia, induces formation of polyploid giant cells with stem characteristics in colon cancer. *PLoS One*, v. 9, n. 6, p. e99143, 2014.

LV, H. et al. Polyploid giant cancer cells with budding and the expression of cyclin E, S-phase kinase-associated protein 2, stathmin associated with the grading and metastasis in serous ovarian tumor. *BMC Cancer*, v. 14, p. 1–9, 2014.

LV, S. et al. Cofilin acts as a booster for progression of malignant tumors represented by glioma. *Cancer Management and Research*, v. 14, p. 3245, 2022.

MACK, D.; HACKER, G. W. Image cytometry of DNA-ploidy. In: *Modern Methods in Analytical Morphology*. 1994. p. 381–393.

MAEDA, K.; MIZUNO, M.; WAKABAYASHI, T.; TAKASU, S.; NAGASAKA, T.; INAGAKI, M.; YOSHIDA, J. Morphological assessment of the development of multinucleated giant cells in glioma by using mitosis-specific phosphorylated antibodies. *Journal of Neurosurgery*, v. 98, n. 4, p. 854–859, 2003.

MANCUSI, R.; MONJE, M. The neuroscience of cancer. *Nature*, v. 618, n. 7965, p. 467–479, 2023.

MAO, J. J. et al. Integrative oncology: addressing the global challenges of cancer prevention and treatment. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 72, n. 2, p. 144–164, 2022.

MARTINEZ, R.; ROGGENDORF, W.; BARETTON, G.; KLEIN, R.; TOEDT, G.; LICHTER, P.; et al. Cytogenetic and molecular genetic analyses of giant cell glioblastoma multiforme reveal distinct profiles in giant cell and non-giant cell subpopulations. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, v. 175, n. 1, p. 26–34, 2007.

MASLOV, S.; SNEPPEN, K. Computational architecture of the yeast regulatory network. *Physical Biology*, v. 2, n. 4, p. S94, 2005.

MEIERJOHANN, S. Effect of stress-induced polyploidy on melanoma reprogramming and therapy resistance. In: *Seminars in Cancer Biology*. v. 81, p. 232–240, 2022. Academic Press.

MEIRA, D. D.; DE ALMEIDA, V. H.; MORORÓ, J. S.; NÓBREGA, I.; BARDIELLA, L.; SILVA, R. L. A.; et al. Combination of cetuximab with chemoradiation, trastuzumab or

MAPK inhibitors: mechanisms of sensitisation of cervical cancer cells. *British Journal of Cancer*, v. 101, n. 5, p. 782–791, 2009.

MEIRA, D. D.; NÓBREGA, I.; DE ALMEIDA, V. H.; MORORÓ, J. S.; CARDOSO, A. M.; SILVA, R. L.; et al. Different antiproliferative effects of matuzumab and cetuximab in A431 cells are associated with persistent activity of the MAPK pathway. *European Journal of Cancer*, v. 45, n. 7, p. 1265–1273, 2009.

MENDES, G. A.; ONGARATTI, B. R.; PEREIRA-LIMA, J. F. S. Epidemiologia de uma série de tumores primários do sistema nervoso central. *Arquivos Brasileiros de Neurocirurgia: Brazilian Neurosurgery*, v. 33, n. 04, p. 279–283, 2014.

MERCAPIDE, J.; LORICO, A. Adhesion signaling promotes protease-driven polyploidization of glioblastoma cells. *International Journal of Molecular Medicine*, v. 34, n. 5, p. 1365–1371, 2014.

MIROSHNIKOVA, Y. A.; MOUW, J. K.; BARNES, J. M.; PICKUP, M. W.; LAKINS, J. N.; KIM, Y.; et al. Tissue mechanics promote IDH1-dependent HIF1 α –tenascin C feedback to regulate glioblastoma aggression. *Nature Cell Biology*, v. 18, n. 12, p. 1336–1345, 2016.

MIRZAYANS, R. Changing the landscape of solid tumor therapy from apoptosis-promoting to apoptosis-inhibiting strategies. *Current Issues in Molecular Biology*, v. 46, n. 6, p. 5379–5396, 2024.

MIRZAYANS, R.; MURRAY, D. Do TUNEL and other apoptosis assays detect cell death in preclinical studies? *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 23, p. 9090, 2020.

MIRZAYANS, R.; MURRAY, D. Intratumor heterogeneity and treatment resistance of solid tumors with a focus on polyploid/senescent giant cancer cells (PGCCs). *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 14, p. 11534, 2023.

MIRZAYANS, R.; ANDRAIS, B.; MURRAY, D. Roles of polyploid/multinucleated giant cancer cells in metastasis and disease relapse following anticancer treatment. *Cancers*, v. 10, n. 4, p. 118, 2018.

MIRZAYANS, R.; ANDRAIS, B.; MURRAY, D. Viability assessment following anticancer treatment requires single-cell visualization. *Cancers*, v. 10, n. 8, p. 255, 2018.

- MOSCALU, M. et al. Histopathological images analysis and predictive modeling implemented in digital pathology—current affairs and perspectives. *Diagnostics*, v. 13, n. 14, p. 2379, 2023.
- MOSIENIAK, G. et al. Polyploidy formation in doxorubicin-treated cancer cells can favor escape from senescence. *Neoplasia*, v. 17, n. 12, p. 882–893, 2015.
- MUKAND, J. A.; BLACKINTON, D. D.; CRINCOLI, M. G.; LEE, J. J.; SANTOS, B. B. Incidence of neurologic deficits and rehabilitation of patients with brain tumors. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation*, v. 80, n. 5, p. 346–350, 2001.
- MUKHERJEE, B. et al. EGFRvIII and DNA double-strand break repair: a molecular mechanism for radioresistance in glioblastoma. *Cancer Research*, v. 69, n. 10, p. 4252–4259, 2009.
- MYTHREYE, K.; BLOBE, G. C. Proteoglycan signaling co-receptors: roles in cell adhesion, migration and invasion. *Cellular Signalling*, v. 21, n. 11, p. 1548–1558, 2009.
- NABORS, L. B. et al. Central nervous system cancers, version 3.2020, NCCN clinical practice guidelines in oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, v. 18, n. 11, p. 1537–1570, 2020.
- NAFE, R.; FRANZ, K.; SCHLOTE, W.; SCHNEIDER, B. Morphology of tumor cell nuclei is significantly related with survival time of patients with glioblastomas. *Clinical Cancer Research*, v. 11, n. 6, p. 2141–2148, 2005.
- NAFE, R.; SCHLOTE, W.; SCHNEIDER, B. Histomorphometry of tumour cell nuclei in astrocytomas using shape analysis, densitometry and topometric analysis. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, v. 31, n. 1, p. 34–44, 2005.
- NEHME, Z. et al. Polyploid giant cancer cells, stemness and epithelial-mesenchymal plasticity elicited by human cytomegalovirus. *Oncogene*, v. 40, n. 17, p. 3030–3046, 2021.
- NELSON, W. et al. To embed or not: network embedding as a paradigm in computational biology. *Frontiers in Genetics*, v. 10, p. 381, 2019.
- NICULESCU, V. F. Cancer genes and cancer stem cells in tumorigenesis: evolutionary deep homology and controversies. *Genes & Diseases*, v. 9, n. 5, p. 1234–1247, 2022.

- NICULESCU, V. F. The evolutionary cancer genome theory and its reasoning. *Genetics in Medicine Open*, v. 1, n. 1, p. 100809, 2023.
- NIJMAN, S. M. Perturbation-driven entropy as a source of cancer cell heterogeneity. *Trends in Cancer*, v. 6, n. 6, p. 454–461, 2020.
- NIU, N.; MERCADO-URIBE, I.; LIU, J. Dedifferentiation into blastomere-like cancer stem cells via formation of polyploid giant cancer cells. *Oncogene*, v. 36, n. 34, p. 4887–4900, 2017.
- OBERMANN, W. M.; BROCKHAUS, K.; EBLE, J. A. Platelets, constant and cooperative companions of sessile and disseminating tumor cells, crucially contribute to the tumor microenvironment. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 9, p. 674553, 2021.
- O'CONNELL, C. B. et al. Relative contributions of chromatin and kinetochores to mitotic spindle assembly. *Journal of Cell Biology*, v. 187, n. 1, p. 43–51, 2009.
- OLANIYI, O. O.; MORAKINYO, A. H.; OLUWOLE, K. A. The role of cell detection tool of QuPath-0.3.2 software in differentiating benign cervical epithelium from malignant epithelial clusters. *Journal of Advances in Medicine and Medical Research*, v. 35, n. 10, p. 50–60, 2023.
- OSTROM, Q. T.; FRANCIS, S. S.; BARNHOLTZ-SLOAN, J. S. Epidemiology of brain and other CNS tumors. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, v. 21, p. 1–12, 2021.
- PACIONI, S. et al. Mesenchymal stromal cells loaded with paclitaxel induce cytotoxic damage in glioblastoma brain xenografts. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 6, p. 1–11, 2015.
- PASQUALE, E. B. Eph receptors and ephrins in cancer progression. *Nature Reviews Cancer*, v. 24, n. 1, p. 5–27, 2024.
- PAVONE, A. M. et al. Digital pathology: a comprehensive review of open-source histological segmentation software. *BioMedInformatics*, v. 4, n. 1, p. 173–196, 2024.
- PELL, R. et al. The use of digital pathology and image analysis in clinical trials. *The Journal of Pathology: Clinical Research*, v. 5, n. 2, p. 81–90, 2019.
- PRAGER, B. C. et al. Glioblastoma stem cells: driving resilience through chaos. *Trends in Cancer*, v. 6, n. 3, p. 223–235, 2020.

- PRAMESH, C. S. et al. Priorities for cancer research in low-and middle-income countries: a global perspective. *Nature Medicine*, v. 28, n. 4, p. 649–657, 2022.
- QU, Y.; ZHANG, L.; RONG, Z.; HE, T.; ZHANG, S. Number of glioma polyploid giant cancer cells (PGCCs) associated with vasculogenic mimicry formation and tumor grade in human glioma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, v. 32, p. 1–7, 2013.
- RAVASZ, E.; SOMERA, A. L.; MONGRU, D. A.; OLTVAI, Z. N.; BARABÁSI, A. L. Hierarchical organization of modularity in metabolic networks. *Science*, v. 297, n. 5586, p. 1551–1555, 2002.
- RICHARDS, J. S.; CANDELARIA, N. R.; LANZ, R. B. Polyploid giant cancer cells and ovarian cancer: new insights into mitotic regulators and polyploidy. *Biology of Reproduction*, v. 105, n. 2, p. 305–316, 2021.
- ROSENBERG, S. A. et al. Targeting glutamatergic signaling and the PI3 kinase pathway to halt melanoma progression. *Translational Oncology*, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2015.
- RUSSACK, V. A.; ARTYMYSHYN, R. L. Image cytometry: current applications and future trends. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, v. 31, n. 1, p. 1–34, 1994.
- SABRKHANY, S.; GRIFFIEEN, A. W.; OUDE EGBRINK, M. G. The role of blood platelets in tumor angiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Reviews on Cancer*, v. 1815, n. 2, p. 189–196, 2011.
- SAINI, G. et al. Polyploid giant cancer cell characterization: new frontiers in predicting response to chemotherapy in breast cancer. *Seminars in Cancer Biology*, v. 81, p. 220–231, 2022.
- SAITO, A.; YOSHII, Y.; NOSE, T. Image analysis of nuclear DNA content and morphometric characteristics of the tumor cells in human astrocytomas. *Noshuyo Byori = Brain Tumor Pathology*, v. 11, n. 2, p. 143–146, 1994.
- SALARI, N. et al. The global prevalence of primary central nervous system tumors: a systematic review and meta-analysis. *European Journal of Medical Research*, v. 28, n. 1, p. 39, 2023.
- SALEM, A.; PINTO, K.; KOCH, M.; LIU, J.; SILVA, E. G. Are polyploid giant cancer

cells in high grade serous carcinoma of the ovary blastomere-like cancer stem cells? *Annals of Diagnostic Pathology*, v. 46, p. 151505, 2020.

SALMINA, K. et al. "Mitotic slippage" and extranuclear DNA in cancer chemoresistance: a focus on telomeres. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 8, p. 2779, 2020.

SALMINA, K.; HUNA, A.; KALEJS, M.; PJANOVA, D.; SCHERTHAN, H.; CRAGG, M. S.; ERENPREISA, J. The cancer aneuploidy paradox: in the light of evolution. *Genes*, v. 10, n. 2, p. 83, 2019.

SALMINA, K. et al. When three isn't a crowd: a digyny concept for treatment-resistant, near-triploid human cancers. *Genes*, v. 10, n. 7, p. 551, 2019.

SANTOS, B. L.; OLIVEIRA, A. M. P.; OLIVEIRA, H. A.; AMORIM, R. L. O. D. Primary central nervous system tumors in Sergipe, Brazil: descriptive epidemiology between 2010 and 2018. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v. 79, n. 6, p. 504–510, 2021.

SCHNEIDER, B. L.; KULESZ-MARTIN, M. Destructive cycles: the role of genomic instability and adaptation in carcinogenesis. *Carcinogenesis*, v. 25, n. 11, p. 2033–2044, 2004.

SCHOLES, D. R.; PAIGE, K. N. Plasticity in ploidy: a generalized response to stress. *Trends in Plant Science*, v. 20, n. 3, p. 165–175, 2015.

SHABO, I. et al. Roles of cell fusion, hybridization and polyploid cell formation in cancer metastasis. *World Journal of Clinical Oncology*, v. 11, n. 3, p. 121, 2020.

SHANKARANARAYANAN, J. S.; KANWAR, J. R.; AL-JUHAISHI, A. J. A.; KANWAR, R. K. Doxorubicin conjugated to immunomodulatory anticancer lactoferrin displays improved cytotoxicity overcoming prostate cancer chemo resistance and inhibits tumour development in TRAMP mice. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, p. 1–16, 2016.

SHARMA, S.; KARAK, A. K.; SARKAR, C.; GOMATHY, G.; BANERJI, A. K.; SCHMITT, H. P. A grading study of gliomas using computer aided malignancy classification and histologic morphometry. *Journal of Neuro-Oncology*, v. 27, p. 75–85, 1996.

SHU, Z.; ROW, S.; DENG, W. M. Endoreplication: the good, the bad, and the ugly. *Trends in Cell Biology*, v. 28, n. 6, p. 465–474, 2018.

SIKORA, E.; CZARNECKA-HEROK, J.; BOJKO, A.; SUNDERLAND, P. Therapy-

induced polyploidization and senescence: coincidence or interconnection? In: *Seminars in Cancer Biology*, v. 81, p. 83–95, 2022.

SILVA, B. D. et al. Chemically induced neurite-like outgrowth reveals a multicellular network function in patient-derived glioblastoma cells. *Journal of Cell Science*, v. 132, n. 19, p. jcs228452, 2019.

SINGH, A.; WINTERBOTTOM, E.; DAAR, I. O. Eph/ephrin signaling in cell-cell and cell-substrate adhesion. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, v. 17, p. 473, 2012.

SINGH, I.; LELE, T. P. Nuclear morphological abnormalities in cancer: a search for unifying mechanisms. In: *Nuclear, Chromosomal, and Genomic Architecture in Biology and Medicine*, p. 443–467, 2022.

SIROIS, I. et al. A unique morphological phenotype in chemoresistant triple-negative breast cancer reveals metabolic reprogramming and PLIN4 expression as a molecular vulnerability. *Molecular Cancer Research*, v. 17, n. 12, p. 2492–2507, 2019.

SKINNER, B. M.; JOHNSON, E. E. Nuclear morphologies: their diversity and functional relevance. *Chromosoma*, v. 126, p. 195–212, 2017.

SOERJOMATARAM, I.; BRAY, F. Planning for tomorrow: global cancer incidence and the role of prevention 2020–2070. *Nature Reviews Clinical Oncology*, v. 18, n. 10, p. 663–672, 2021.

SONG, Y.; ZHAO, Y.; DENG, Z.; ZHAO, R.; HUANG, Q. Stress-induced polyploid giant cancer cells: unique way of formation and non-negligible characteristics. *Frontiers in Oncology*, v. 11, p. 724781, 2021.

SPINELLI, C.; TAWIL, N.; ADNANI, L.; RAK, J.; CHOI, D. Extracellular vesicle mediated vascular pathology in glioblastoma. In: *New Frontiers: Extracellular Vesicles*, p. 247–273, 2021.

SQUATRITO, M.; HOLLAND, E. C. DNA damage response and growth factor signaling pathways in gliomagenesis and therapeutic resistance. *Cancer Research*, v. 71, n. 18, p. 5945–5949, 2011.

SURESH, R.; DIAZ, R. J. The remodelling of actin composition as a hallmark of cancer. *Translational Oncology*, v. 14, n. 6, p. 101051, 2021.

SUROWKA, A. D.; ADAMEK, D.; RADWANSKA, E.; LANKOSZ, M.;

- SZCZERBOWSKA-BORUCHOWSKA, M. A methodological approach to the characterization of brain gliomas, by means of semi-automatic morphometric analysis. *Image Analysis and Stereology*, v. 33, n. 3, p. 201–218, 2014.
- TADDEI, A.; HEDIGER, F.; NEUMANN, F. R.; GASSER, S. M. The function of nuclear architecture: a genetic approach. *Annu. Rev. Genet.*, v. 38, n. 1, p. 305–345, 2004.
- TAFAZZOLI-SHADPOUR, M.; MOHAMMADI, E.; TORKASHVAND, E. Mechanics of actin filaments in cancer onset and progress. In: *International Review of Cell and Molecular Biology*, v. 355, p. 205–243, 2020. Academic Press.
- TAGAL, V.; ROTH, M. G. Loss of aurora kinase signaling allows lung cancer cells to adopt endoreplication and form polyploid giant cancer cells that resist antimetabolic drugs. *Cancer Research*, v. 81, n. 2, p. 400–413, 2021.
- TAYLOR, E. T.; FURNARI, B. F.; CAVENEE, K. W. Targeting EGFR for treatment of glioblastoma: molecular basis to overcome resistance. *Current Cancer Drug Targets*, v. 12, n. 3, p. 197–209, 2012.
- TELENTSCHAK, S.; SOLIWODA, M.; NOHROUDI, K.; ADDICKS, K.; KLINZ, F. J. Cytokinesis failure and successful multipolar mitoses drive aneuploidy in glioblastoma cells. *Oncology Reports*, v. 33, n. 4, p. 2001–2008, 2015.
- TEODORCZYK, M.; MARTIN-VILLALBA, A. Sensing invasion: cell surface receptors driving spreading of glioblastoma. *Journal of Cellular Physiology*, v. 222, n. 1, p. 1–10, 2010.
- TORRISI, F. et al. The hallmarks of glioblastoma: heterogeneity, intercellular crosstalk and molecular signature of invasiveness and progression. *Biomedicines*, v. 10, n. 4, p. 806, 2022.
- TUNCEL, G.; KALKAN, R. Receptor tyrosine kinase-Ras-PI3kinase-Akt signaling network in glioblastoma multiforme. *Medical Oncology*, v. 35, p. 1–12, 2018.
- VELTRI, R. W.; CHRISTUDASS, C. S.; ISHARWAL, S. Nuclear morphometry, nucleomics and prostate cancer progression. *Asian Journal of Andrology*, v. 14, n. 3, p. 375, 2012.
- VELTRI, R. W.; PARTIN, A. W.; MILLER, M. C. Quantitative nuclear grade: clinical applications of the quantitative measurement of nuclear structure using image

analysis. In: *Cancer Chemoprevention: Volume 2 – Strategies for Cancer Chemoprevention*, p. 97–108, 2005.

VITALE, I.; GALLUZZI, L.; CASTEDO, M.; KROEMER, G. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 12, n. 6, p. 385–392, 2011.

VOELKEL-JOHNSON, C. Sphingolipids in embryonic development, cell cycle regulation, and stemness – implications for polyploidy in tumors. In: *Seminars in Cancer Biology*, v. 81, p. 206–219, 2022. Academic Press.

WAS, H. et al. Polyploidy formation in cancer cells: how a Trojan horse is born. In: *Seminars in Cancer Biology*, v. 81, p. 24–36, Jun. 2022. Academic Press.

WATTS, D. J.; STROGATZ, S. H. Collective dynamics of ‘small-world’ networks. *Nature*, v. 393, n. 6684, p. 440–442, 1998.

WEINBERG, R. A. *A biologia do câncer*. Artmed Editora, 2016.

WENG, C. H.; WU, C. S.; WU, J. C.; KUNG, M. L.; WU, M. H.; TAI, M. H. Cisplatin-induced giant cells formation is involved in chemoresistance of melanoma cells. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 21, p. 7892, 2020.

WHITE-GILBERTSON, S.; VOELKEL-JOHNSON, C. Giants and monsters: unexpected characters in the story of cancer recurrence. *Advances in Cancer Research*, v. 148, p. 201–232, 2020.

WHITE-GILBERTSON, S. et al. Polyploid giant cancer cells are dependent on cholesterol for progeny formation through amitotic division. *Scientific Reports*, v. 12, n. 1, p. 8971, 2022.

WHITNEY, J. et al. Quantitative nuclear histomorphometry predicts molecular subtype and clinical outcome in medulloblastomas: preliminary findings. *Journal of Pathology Informatics*, v. 13, p. 100090, 2022.

WINKLER, F. et al. Cancer neuroscience: state of the field, emerging directions. *Cell*, v. 186, n. 8, p. 1689–1707, 2023.

XUAN, B.; GHOSH, D.; DAWSON, M. R. Contributions of the distinct biophysical phenotype of polyploidal giant cancer cells to cancer progression. In: *Seminars in Cancer Biology*, v. 81, p. 64–72, 2022.

XUAN, B.; GHOSH, D.; CHENEY, E. M.; CLIFTON, E. M.; DAWSON, M. R.

Dysregulation in actin cytoskeletal organization drives increased stiffness and migratory persistence in polyploid giant cancer cells. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 11935, 2018.

YABO, Y. A.; NICLOU, S. P.; GOLEBIEWSKA, A. Cancer cell heterogeneity and plasticity: a paradigm shift in glioblastoma. *Neuro-Oncology*, v. 24, n. 5, p. 669–682, 2022.

YADAV, A. K.; SHUKLA, R.; SINGH, T. R. Topological parameters, patterns, and motifs in biological networks. In: *Bioinformatics*, p. 367–380, 2022. Academic Press.

YAMANAKA, R.; HAYANO, A.; KANAYAMA, T. Radiation-induced gliomas: a comprehensive review and meta-analysis. *Neurosurgical Review*, v. 41, p. 719–731, 2018.

YOSHII, Y. et al. Nuclear characterization and G2M ploidy in human brain tumors using semiautomated image analysis. *Noshuyo Byori – Brain Tumor Pathology*, v. 12, n. 1, p. 61–67, 1995.

YOSHII, Y.; SAITO, A.; NOSE, T. Nuclear morphometry and DNA densitometry of human gliomas by image analysis. *Journal of Neuro-Oncology*, v. 26, p. 1–9, 1995.

YOU, B. et al. AMPK–mTOR–mediated activation of autophagy promotes formation of dormant polyploid giant cancer cells. *Cancer Research*, v. 82, n. 5, p. 846–858, 2022.

YU, J.; ZHANG, R.; WANG, W. Review of polyploid giant cancer cells. *World Journal of Cancer Research*, v. 9, n. 1, p. 45–59, 2019.

YUILE, P.; DENT, O.; COOK, R.; BIGGS, M.; LITTLE, N. Survival of glioblastoma patients related to presenting symptoms, brain site and treatment variables. *Journal of Clinical Neuroscience*, v. 13, n. 7, p. 747–751, 2006.

ZAVARISE, M. D. C. et al. Perfil epidemiológico dos casos de neoplasia do sistema nervoso central na região norte – 2013 a 2023. *Brazilian Journal of Health Review*, v. 7, n. 5, p. e73830–e73830, 2024.

ZEKRI, A. et al. Inhibitor of aurora kinase B induces differentially cell death and polyploidy via DNA damage response pathways in neurological malignancy: shedding new light on the challenge of resistance to AZD1152-HQPA. *Molecular Neurobiology*, v. 53, p. 1808–1823, 2016.

- ZHANG, D.; WANG, Y.; ZHANG, S. Asymmetric cell division in polyploid giant cancer cells and low eukaryotic cells. *BioMed Research International*, 2014, Art. ID 432652, 2014.
- ZHANG, S.; MERCADO-URIBE, I.; HANASH, S.; LIU, J. iTRAQ-based proteomic analysis of polyploid giant cancer cells and budding progeny cells reveals several distinct pathways for ovarian cancer development. *PLoS One*, v. 8, n. 11, p. e80120, 2013.
- ZHANG, S.; XU, X.; ZHU, S.; LIU, J. PGCCs generating erythrocytes to form VM structure contributes to tumor blood supply. *BioMed Research International*, 2015.
- ZHANG, S.; ZHANG, D.; YANG, Z.; ZHANG, X. Tumor budding, micropapillary pattern, and polyploid giant cancer cells in colorectal cancer: current status and future prospects. *Stem Cells International*, 2016, Art. ID 4810734, 2016.
- ZHANG, Z. et al. Irradiation-induced polyploid giant cancer cells are involved in tumor cell repopulation via neosis. *Molecular Oncology*, v. 15, n. 8, p. 2219–2234, 2021.
- ZHOU, M. et al. The roles of connexins and gap junctions in the progression of cancer. *Cell Communication and Signaling*, v. 21, n. 1, p. 8, 2023.
- ZHOU, M. et al. Single-cell morphological and transcriptome analysis unveil inhibitors of polyploid giant breast cancer cells in vitro. *Communications Biology*, v. 6, n. 1, p. 1301, 2023.
- ZHOU, X. et al. Polyploid giant cancer cells and cancer progression. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 10, p. 1017588, 2022.
- ZHU, J.; TSAI, H. J.; GORDON, M. R.; LI, R. Cellular stress associated with aneuploidy. *Developmental Cell*, v. 44, n. 4, p. 420–431, 2018.

APÊNDICES

Produção Bibliográfica

| Título (DOI) | Descrição Biotecnológica | Qualis (Biotecnologia/Interdisciplinar) |
|---|---|--|
| Translational Bioinformatics Applied to the Study of Complex Diseases (10.3390/genes14020419) - 1º Autor | Bioinformática Translacional (TBI) e Doenças Complexas na Biotecnologia Vermelha Bioinformática | A3 (Genes: 2073-4425) |
| Prognostic Factors and Markers in Non-Small Cell Lung Cancer: Recent Progress and Future Challenges (10.3390/genes14101906) | Biomarcadores para Câncer de Pulmão na Biotecnologia Vermelha Molecular | A3 (Genes: 2073-4425) |
| O Farmacêutico na Oncologia: Uso de Novas Tecnologias no Acompanhamento Farmacoterapêutico (10.47820/recima21.v4i12.4548) | Farmacoterapia na Biotecnologia Vermelha Molecular | B4 (RECIMA21: 2675-6218) |
| Implicações da Pandemia de Covid-19 no Transtorno de Ansiedade Generalizada (10.47820/recima21.v4i11.4298) | Covid e Ansiedade na Biotecnologia Vermelha Molecular (Saúde Mental) | B4 (RECIMA21: 2675-6218) |
| Análise <i>in silico</i> do Processo de Regeneração Celular Através da Interação Piwi/PiRNA em <i>Mus musculus</i> (10.47820/recima21.v4i11.4302) | Via de Piwi e Regeneração Celular na Biotecnologia Vermelha Molecular e Bioinformática | B4 (RECIMA21: 2675-6218) |
| Analysis of 12 X-STRs loci in a population from southeastern Brazil (10.1016/j.fsigen.2023.102974) | Forense na Biotecnologia Vermelha Molecular e Genética de Populações | A1 (Forensic Science International: Genetics: 1872-4973) |
| Physical-chemical and microscopic characterization of bee honey (<i>Apis mellifera</i> L.) produced in Pernambuco and | Bioprospecção e Bioeconomia com a Biotecnologia Vermelha Molecular e Bioinformática | A2 (Conciliium: 0010-5236) |

| | | |
|--|---|--------------------------|
| sold in the Metropolitan Region of Recife, Brazil (10.53660/CLM-1492-23H26B) | | |
| Biomarkers in Breast Cancer: An Old Story with a New End (10.3390/genes14071364) | Biomarcadores para Câncer de Mama na Biotecnologia Vermelha Molecular | A3 (Genes: 2073-4425) |
| Computational Biology Helps Understand How Polyploid Giant Cancer Cells Drive Tumor Success (10.3390/genes14040801) - 1º Autor | Biomarcadores para Subpopulação tumoral de PGCCs na Biotecnologia Vermelha Molecular e Bioinformática | A3 (Genes: 2073-4425) |
| Bioinformatics and molecular biology tools for diagnosis, prevention, treatment and prognosis of COVID-19 (10.1016/j.heliyon.2024.e34393) | Covid na Biotecnologia Vermelha Molecular e Bioinformática | A4 (Heliyon: 2405-8440) |
| Advances in Biotechnology for Cellular and Tissue Regeneration: Challenges and Perspectives in Human Disease Treatment (10.47820/recima21.v5i3.4956) | Regeneração Celular na Biotecnologia Vermelha Molecular e Bioinformática | B4 (RECIMA21: 2675-6218) |
| Análise de Genes Diferencialmente Expressos em Amostras de Câncer de Mama do Sequence Read Archive (SRA) (10.47820/recima21.v5i3.4955) - 1º Autor | Câncer de Mama e Análise de Bancos de Dados na Biotecnologia Vermelha Molecular e Bioinformática | B4 (RECIMA21: 2675-6218) |
| Biotechnology and Genetic Engineering: Current Advancements, Emerging Challenges, and Future Horizons in Modern Science (10.47820/recima21.v5i2.4797) | Engenharia Genética, Biotecnologia Geral e Análise de Bancos de Dados na Biotecnologia Vermelha Molecular, Engenharia Genética e Bioinformática | B4 (RECIMA21: 2675-6218) |

| | | |
|--|--|---------------------------------------|
| Integrating frontiers: a holistic, quantum and evolutionary approach to conquering cancer through systems biology and multidisciplinary synergy (10.3389/fonc.2024.1419599) - 1º Autor | Biologia de Sistemas (Ômicas, Modelagem Computacional, Biotecnologia Sintética), Biologia Quântica, Teoria do Caos e Biocomplexidade (Dinâmica de Sistemas Biológicos, Biologia Computacional, Ecologia de Sistemas), Biofísica, Bioquímica e Estudando Centros Organizadores Nucleares e Metabólicos no Câncer unindo Biotecnologia Vermelha com a Biotecnologia Computacional e Integrativa (Translacional e Multidisciplinar) | A4 (Frontiers in Oncology: 2234-943X) |
| PGCC: uma resposta complexa do câncer (10.22533/at.ed.740231309) - 1º Autor Organizador | Livro - Biotecnologia Integrativa | L1 (Cálculo suposto) |
| Bioinformática aplicada à Oncogenética: uma nova ferramenta para casos complexos - Volume I (10.22533/at.ed.884230512) | Livro - Biotecnologia Vermelha Molecular e Bioinformática | L1 (Cálculo suposto) |
| Bioinformática aplicada à Oncogenética: uma nova ferramenta para casos complexos - Volume II (10.22533/at.ed.891230512) | Livro - Biotecnologia Vermelha Molecular e Bioinformática | L1 (Cálculo suposto) |
| Bioinformática aplicada à Oncogenética: uma nova ferramenta para casos complexos - Volume III (10.22533/at.ed.860230512) | Livro - Biotecnologia Vermelha Molecular e Bioinformática | L1 (Cálculo suposto) |
| Bioinformática aplicada à Oncogenética: uma nova ferramenta para casos complexos - Volume IV (10.22533/at.ed.522242602) | Livro - Biotecnologia Vermelha Molecular e Bioinformática | L1 (Cálculo suposto) |
| Genética humana e molecular: um olhar multidisciplinar (10.22533/at.ed.330232711) | Livro - Biotecnologia Integrativa | L1 (Cálculo suposto) |
| CYPS & agrotóxicos: o que você precisa saber? (10.22533/at.ed.207230310) | Livro - Biotecnologia Vermelha Molecular e Integrativa | L1 (Cálculo suposto) |

Totais de produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódico - 23 (4 como 1º Autor)

Livros publicados (1º Autor, Co-Autor e Organizador) - 8 (1 no Tema de PGCCs - Primeiro Material em Português)

Capítulos de livros publicados (Autor e Co-autor) - 45

Trabalhos publicados em anais de eventos (Autor e Co-autor) - 30

Apresentações de trabalhos - 6

Projetos de Inovação - 4

Produção técnica e de Extensão

Curso de curta duração ministrado - 4

Eventos

Participações em eventos - 7 (3 Internacionais: Salamanca - Espanha, NASA - EUA, Houston - EUA)

Participação em banca de trabalhos de conclusão (graduação) - 4

Estágio Técnico-Ciêntífico em Portugal durante 3 meses