



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

Breno Rangel Moreira Corã

**PREDIÇÃO COMPUTACIONAL DAS POTENCIAIS INTERAÇÕES SISTÊMICAS
ENTRE O CÂNCER DE MAMA PRIMÁRIO (ER+, HER2+ e TNBC), CÉLULAS
HEMATOPOIÉTICAS DA MEDULA ÓSSEA E PULMÃO**

Florianópolis

2024

Breno Rangel Moreira Corã

**PREDIÇÃO COMPUTACIONAL DAS POTENCIAIS INTERAÇÕES SISTÊMICAS
ENTRE O CÂNCER DE MAMA PRIMÁRIO (ER+, HER2+ e TNBC), CÉLULAS
HEMATOPOIÉTICAS DA MEDULA ÓSSEA E PULMÃO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-
graduação em Biotecnologia e Biociências da
Universidade Federal para a obtenção do título
de mestre em Biotecnologia e Biociências.
Orientador: Prof. Dr. Edroaldo Lummertz da
Rocha

Florianópolis

2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC

Corã, Breno Rangel Moreira

Predição computacional das potenciais interações sistêmicas entre o câncer de mama primário (ER+, HER2+ e TNBC), células hematopoiéticas da medula óssea e pulmão / Breno Rangel Moreira Corã ; orientador, Edroaldo Lummertz da Rocha, 2024.

95 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Biologia de Sistemas. 3. Comunicação celular. 4. Câncer de mama. 5. Microambiente pré-metastático. I. da Rocha, Edroaldo Lummertz . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

Breno Rangel Moreira Corã

Predição computacional das potenciais interações sistêmicas entre o câncer de mama primário (ER+, HER2+ e TNBC), células hematopoiéticas da medula óssea e pulmão

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Alfeu Zanotto Filho, Dr.

Instituição (Universidade Federal de Santa Catarina)

Prof^a. Izabella Thaís da Silva, Dra.

Instituição (Universidade Federal de Santa Catarina)

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Biociências

Prof. Aguinaldo R. Pinto, Dr.

Coordenador do PPG em Biotecnologia e Biociências

Prof.(a) Edroaldo Lummertz da Rocha, Dr.

Orientador

Florianópolis, 2024

Este trabalho é dedicado aos meus pais, à minha irmã e a todas as pessoas que, nos momentos difíceis, estenderam suas mãos para mim. Também é dedicado àquelas que não desistiram da ciência.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha sincera gratidão ao meu orientador, Dr. Edroaldo Lummertz da Rocha, obrigado por incontáveis oportunidades. Fica minha eterna gratidão por nunca ter desistido de fazer ciência e por honrar seu compromisso com seus orientandos, mesmo diante das surpresas da vida. Espero que o laboratório continue formando pesquisadores que façam diferença na ciência, assim como o senhor tem feito em sua vida acadêmica. Muito obrigado!

Deixo meus agradecimentos aos doutores e pós-doc Gabi, Marcelo, Natã e Paula, pelo apoio, paciência e pela torcida, tanto dentro quanto fora do laboratório. Vocês são pesquisadores e pessoas incríveis! Aos demais integrantes do laboratório. E em especial, Mylla, por toda a ajuda desde o primeiro até o último dia.

Aos membros da banca, Dr. Alfeu Zanotto, Dra. Izabella Thaís da Silva, Dr. Rubens Tadeu Delgado Duarte e Dr. Guilherme Razzera, pela disponibilidade em participar da avaliação deste trabalho e por contribuir para minha formação acadêmica. Foi um imenso prazer também ter estado em sala de aula, onde, como aluno, pude aprender ainda mais com vocês.

Ao CNPq por todo o suporte financeiro para a realização deste trabalho.

A minha amiga Eulália, que me acompanha desde antes de passar na UFSC e mesmo estando distante geograficamente, está sempre presente.

Aos meus familiares, especialmente tias e minhas avós, por sempre torcerem por mim.

Aos meus pais, Joelma e Paulo, por sempre terem dado suporte aos meus sonhos e por sempre me acolherem nos momentos de fracasso.

Em especial, gostaria de agradecer à minha irmã, Lorena, por todo o suporte, por nunca ter desistido de si mesma e por assumir as responsabilidades chatas da vida para que eu pudesse arriscar e fazer apostas maiores na vida.

Por fim, meus profundos agradecimentos a todos e todas que participaram direta ou indiretamente no meu amadurecimento pessoal e profissional.

"Nothing in Biology Makes Sense Except in the Light of Evolution"

(Theodosius Dobzhansky, 1973)

RESUMO

O câncer é uma doença multifatorial e uma das principais causas de mortalidade em todo o mundo. Entre os tumores malignos, o câncer de mama é o mais comum entre as mulheres em escala global. Este tipo de câncer é altamente heterogêneo, composto por diversos subtipos moleculares, tais como ER+ (receptor de estrogênio positivo), HER2+ (receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 positivo) e TNBC (câncer de mama triplo negativo). Todos esses subtipos têm potencial metastático, frequentemente disseminando-se para microambientes como a medula óssea e os pulmões. Embora distintos, o microambiente tumoral é um nicho composto por células cancerígenas e, não cancerígenas, que estabelecem redes de interações, principalmente com células do sistema imunológico. Além das modificações e interações no microambiente tumoral local, os processos tumorais desencadeiam alterações homeostáticas sistêmicas. Essas alterações propiciam a migração e a instalação de células tumorais disseminadas, assim como a modificação de nichos distantes, tornando-os permissíveis para o desenvolvimento de tumores secundários originados a partir de células tumorais circulantes provenientes de tumores primários. Os mecanismos de disseminação de células tumorais estabelecem interações significativas com a hematopoiese e, por conseguinte, com o sistema imunológico. O objetivo deste trabalho busca identificar ligantes comuns presentes no microambiente tumoral mamário e os receptores nos microambientes hematopoiético e pulmonar, além de prever potenciais interações em nível sistêmico. Foram utilizados conjuntos de dados de célula única, previamente publicados e disponibilizados por outros grupos de pesquisa. As análises foram conduzidas no RStudio utilizando os pacotes de programação ClusterProfiler, GO e FUSCA, com os algoritmos do CellRouter e CellComm. As interações identificadas nas análises abrangem uma variedade de funções biológicas, incluindo recrutamento, migração e motilidade celular, além de interações com a matriz extracelular. Essas interações comuns estão associadas à inflamação e à vascularização tumoral (angiogênese). Das interações notáveis entre as células cancerígenas, as células-tronco e progenitoras hematopoiéticas (HSPC) e o microambiente pulmonar, o ligante MIF (Fator de Migração de Macrófagos), apresentou potencial de interação sistêmico com os receptores CD74/CD44, ITGA4 e EGFR. Por outro lado, os fibroblastos associados ao câncer (CAFs) apresentaram o ligante CXCL12, potencialmente interagindo com o receptor CXCR4, uma interação amplamente documentada na literatura, com diversas funções tanto em estados saudáveis quanto associados a processos patológicos como o câncer. Esses resultados auxiliam na compreensão do mecanismo molecular comum entre o câncer mamário, com potencial para alterar sistemicamente a hematopoiese e o microambiente pulmonar, investigando as interações celulares e estabelecendo relações a serem exploradas experimentalmente em futuras pesquisas.

Palavras-chave: scRNA-seq; Biologia de sistemas; Câncer de mama; Hematopoiese; microambiente pulmonar.

ABSTRACT

Cancer is a multifactorial disease and one of the leading causes of mortality worldwide. Among malignant tumors, breast cancer is the most common among women globally. This type of cancer is highly heterogeneous, composed of various molecular subtypes, such as ER+ (estrogen receptor-positive), HER2+ (human epidermal growth factor receptor 2-positive), and TNBC (triple negative). All these subtypes have metastatic potential, often spreading to microenvironments such as bone marrow and lungs. Although distinct, the tumor microenvironment is a niche composed of cancerous and non-cancerous cells that establish networks of interactions, mainly with cells of the immune system. In addition to modifications and interactions in the local tumor microenvironment, tumor processes trigger systemic homeostatic alterations. These changes facilitate the migration and establishment of disseminated tumor cells, as well as the modification of distant niches, making them permissive for the development of secondary tumors originating from circulating tumor cells derived from primary tumors. Mechanisms of tumor cell dissemination establish significant interactions with hematopoiesis and, consequently, with the immune system. The aim of this study is to identify common ligands present in the mammary tumor microenvironment and receptors in hematopoietic and pulmonary microenvironments, as well as to predict potential interactions at the systemic level. Single-cell datasets, previously published and made available by other research groups, were used. Analyses were conducted in RStudio using programming packages ClusterProfiler, GO, and FUSCA, with algorithms from CellRouter and CellComm. The interactions identified in the analyses encompass a variety of biological functions, including recruitment, migration, and cell motility, as well as interactions with the extracellular matrix. These common interactions are associated with inflammation and tumor vascularization (angiogenesis). Of note among the interactions between cancer cells, hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs), and the pulmonary microenvironment, the ligand MIF-Macrophage Migration Factor showed potential systemic interaction with receptors CD74/CD44, ITGA4, and EGFR. On the other hand, cancer-associated fibroblasts (CAFs) presented the ligand CXCL12, potentially interacting with receptor CXCR4, a widely documented interaction in the literature, with various functions in both healthy and pathological states such as cancer. These results help to understand the common molecular mechanism between breast cancer with the potential to systemically alter hematopoiesis and the pulmonary microenvironment, investigating cellular interactions and establishing relationships to be experimentally explored in future research.

Keywords: scRNA-seq; Systems Biology; Breast Cancer; Hematopoiesis; Pulmonary microenvironment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Hallmarks of cancer 2022</i>	18
Figura 2 - Estratificação simplificada dos subtipos de câncer de mama	20
Figura 3 - Representação esquemática do microambiente tumoral (TME)	21
Figura 4 - Fluxo de trabalho	29
Figura 5 - <i>Clusterização</i> celular por microambiente	34
Figura 6 - Painel de expressão dos marcadores hormonais	36
Figura 7 - Painel de interação entre grupos celulares: ER+, HER2+ e TNBC	37
Figura 8 - Proporção dos grupos celulares por subtipo de câncer de mama	40
Figura 9 - Painel de interação entre grupos celulares em tecidos saudáveis	42
Figura 10 - <i>Merge</i> entre os dados dos subtipos de câncer de mama e pulmão	44
Figura 11 - <i>Merge</i> entre os dados dos subtipos de câncer de mama e medula óssea	44
Figura 12 - Painel de interação entre grupos celulares: Câncer de mama e medula óssea	46
Figura 13 - Painel de interação entre grupos celulares: Câncer de mama e pulmão	47
Figura 14 - Interações priorizadas: Células cancerígenas com HSPC	50
Figura 15 - Interações priorizadas: CAFs com HSPC	54
Figura 16 - Expressão gênica por grupo celular	59
Figura 17 - Interações priorizadas: Células cancerígenas com microambiente pulmonar	67
Figura 18 - Expressão gênica por grupo celular	72
Figura 19 - Relação de conjuntos e enriquecimento funcional	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Taxas brutas e ajustadas* de incidência por neoplasia maligna da mama 19

Tabela 2 - Números absolutos e proporcionais por grupo celular referente aos três subtipos de câncer de mama 40

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

AGTRAP	Angiotensin II type I receptor-associated protein
ANXA6	Anexina A6
APC-like	Células semelhantes a apresentadoras de antígenos
APLP	Amyloid Beta Precursor Like Protein
APP	Amyloid precursor protein
ARF	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
BLBC	Basal-like breast cancer
BM	Bone Marrow
BMDCs	Células derivadas da medula óssea
C5AR1	Receptor de anafilatoxina C5a
CAFs	Cancer-Associated Fibroblasts
CALM	Calmodulina (CaM)
CARL	Calreticulina
CD	Cluster of differentiation
cDC	Células Dendríticas Clássicas
CLP1	Progenitora Linfocítica Comum 1
CLP2	Progenitora Linfocítica Comum 2
Cmp/Lmpp	Progenitor Mieloide Comum/Progenitor Multipotente Linhagem Linfoide
COL1A1	Cadeia alfa 1 do colágeno tipo I
CRT	Calreticulina
CTC	Células tumorais circulantes
CXCL	C-X-C Motif Chemokine Ligand
DCs	Dendríticas monocíticas
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ER	Receptor de estrogênio
ER+	Receptor de estrogênio positivo
ERBB2	Receptor de fator de crescimento epidérmico 2
ESR1	Estrogen Receptor 1
FAS	Cell surface death receptor
FN1	Fibronectina
FUSCA	Framework for Unified Single-Cell Analysis

Galectin-3	LGALS3
GEO	Gene Expression Omnibus
GMP	Progenitora de Granulócito e Monócito
GMPNeut	Progenitora de Granulócito e Monócito Comprometida para Neutrófilo
GO	Gene Ontology
GSTP1	Glutathione S-transferase Pi
HER2	Receptor de fator de crescimento epidérmico humano
HER2+	Receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 positivo
HMGB1	High Mobility Group Box 1
HSC	Células-tronco hematopoiéticas
HSPC	Células-tronco e progenitoras hematopoiéticas
ICAM1	Adesão celular intercelular 1 (ICAM-1)
INCA	Instituto Nacional de Câncer
ITGA4	Subunidade alfa-4 da integrina
LumA	Luminal A
LumB	Luminal B
LY96	lin-96
MDSCs	Células supressoras derivadas da linhagem mieloide
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MIF	Fator de Migração de Macrófagos
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro
MSC	Células tronco mesenquimais
MYLK	Myosin light chain kinase
NAMPT	Nicotinamide Phosphoribosyltransferase
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCSTN	Nicastrin
NG2+	Neural Glial Antigen 2 positivo
NK	Natural killer
NOTCH1	Notch homolog 1, translocation-associated
NTRK1	Receptor tirosina quinase de neurotrofina 1 (TrkA)
NTRK1	Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase 1
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCA	Componentes principais de análises
PD-1	Receptor de morte celular programada 1

PD-L1	Ligante de morte celular programada 1
pDC	Dendríticas Plasmocitoides
PGR	Gene que codifica para o Receptor de progesterona
PR	Receptor de progesterona
PR+	Positivo para receptor de progesterona positivo
PVL	Perivascular-like cells
RNA	Ácido ribonucleico
RPS19	Proteína ribossomal s19
RPSA	laminina receptor precursor (LAMR1)
RTN4	Reticulon-4
scRNA-seq	Single-cell RNA sequencing
SDC1	Sindecana-1
SDF-1	Stromal Derived Factor 1
SLC1A5	Alanina, Serina, Cisteína transportador 2
SNP	Sialophorin - CD43
SORL1	Sortilin Related Receptor 1
TAM	Macrófagos associados ao tumor
TFRC	Transferrin receptor 1
TGF - β	Transforming growth factor β
TLR	Toll like receptor
TME	Microambiente tumoral
TNBC	Triplo negativo breast cancer
TNFRSF14	Receptor 14 do fator de necrose tumoral
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UMAP	Projeção de Variedade Uniforme
unk1	Célula não identificada 1
unk2	Célula não identificada 2
VCAM1	Molécula de adesão celular vascular 1
VEGFR1	Receptor do fator de crescimento endotelial vascular 1

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	17
1.1 Câncer de mama	19
1.2. Microambiente tumoral (TME)	21
1.3. Alterações na hematopoiese, no sistema imunológico e no nicho pré-metastático podem ser modulados pelo tumor durante a disseminação de células cancerígenas	22
1.4. Algoritmos de comunicação celular	25
2. HIPÓTESE	27
3. OBJETIVO	28
3.1. Objetivo geral	28
3.2. Objetivos específicos	28
4. METODOLOGIA	28
4.1. Obtenção dos datasets	28
4.2. Pré-processamento dos dados e criação do objeto CellRouter a partir dos conjuntos de dados	29
4.3. Visualização dos clusters celulares nos datasets	31
4.4. Interações ligantes-receptor	32
4.5. Representação em Teoria de conjuntos	32
4.6. Enriquecimento funcional	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1. Caracterização dos grupos celulares	33
5.2. Estratificação molecular dos três subtipos de câncer de mama	35
5.3. Interações entre grupos celulares em microambientes locais - Câncer de mama	37
5.4. Interações entre grupos celulares em microambientes locais - Medula óssea e Pulmão	41
5.5 Análises sistêmicas (Merge)	43
5.6. Interações entre grupos celulares sistêmicos	45
5.7. Interação ligante-receptor entre os grupos celulares sistêmicos	49
5.7.1. Ligantes comuns - Células Epiteliais cancerígenas	51
5.7.2. Ligantes comuns - CAFs	53
5.7.3. Receptores comuns - células-tronco e progenitoras hematopoiéticas	56
5.7.4. Interações sistêmicas previstas com potencial de alterar a hematopoiese	58
5.7.4.1. MIF_CD74 e CD44	60
5.7.4.2. CXCL12_CXCR4	63
5.7.5. Pulmão	67
5.7.5.1. Ligantes células cancerígenas	69
5.7.5.2. Receptores microambiente pulmonar	70
5.7.5.3. Interações pulmonares	71
5.7.5.4. MIF_ITGA4 e MIF_EGFR	73
5.8 Interações comuns e Enriquecimento funcional	74

7. CONCLUSÕES	78
8. PERSPECTIVAS	79
REFERÊNCIAS	80

1. INTRODUÇÃO GERAL

O câncer é uma doença multifatorial e uma das principais causas de mortalidade em escala global. Conforme dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 20 milhões de novos casos e 9,7 milhões de óbitos foram atribuídos a essa patologia em 2022 (WHO, 2024). Estima-se que uma em cada cinco pessoas desenvolverá algum tipo de tumor antes de completar 75 anos. Projeções para o ano de 2040 apontam para um registro de aproximadamente 29,5 milhões de novos casos em todo o mundo (Cavaletti *et al.*, 2019).

Independentemente da diversidade e classificação, todo tumor apresenta como característica fundamental a proliferação aberrante de células anormais. A origem do tumor está intrinsecamente associada às mutações, dando início a um processo complexo de múltiplas etapas que engloba interações entre as células pré-malignas, malignas e não malignas. Adicionalmente, as trajetórias tumorais são fortemente influenciadas pelo microambiente em que se desenvolvem. (Boutry *et al.*, 2022; Colella *et al.*, 2008; Kamb, 2005; Rozenblatt-Rosen *et al.*, 2020; Sachs; Clevers, 2014).

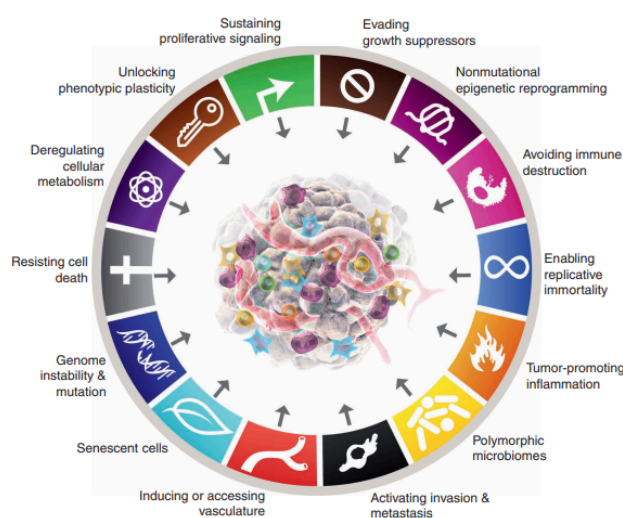
Em 2000, Hanahan e Weinberg apresentaram uma revisão abordando a tumorigênese, processo de surgimento e progressão tumoral. Foram abstraídas desta revisão as "Marcas Registradas do Câncer" (*Hallmarks of cancer*) (Figura 1). Inicialmente, foram destacadas seis dessas marcas: autossuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a sinais anticrescimento, evasão de apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada e invasão tecidual e metástase (Hanahan; Weinberg, 2000).

Posteriormente, dois traços facilitadores foram acrescentados: instabilidade do genoma/mutação, resultando em maior diversidade celular, e inflamação promotora/promovida pelo tumor. Além disso, duas novas "marcas registradas" foram incorporadas ao processo de neoplasia: reprogramação do metabolismo energético e evasão da resposta imunológica (Hanahan; Weinberg, 2011).

Em 2022, foram incorporadas mais quatro características: capacidade de desbloqueio do fenótipo de plasticidade celular, que permite a aquisição de fenótipos menos diferenciados, relacionado com a instabilidade genômica. A reprogramação epigenética não mutacional foi introduzida, que influencia o perfil de expressão gênica por meio de modificações epigenéticas, evidenciando a importância do controle dos processos celulares. A presença de células senescentes foi reconhecida, contribuindo para as alterações nas dinâmicas celulares associadas ao surgimento e progressão tumoral, relacionadas à evasão do sistema

imunológico. Por fim, os microbiomas polimórficos foram apresentados, representando perfis de microrganismos distintos associados à progressão tumoral, enfatizando a interação entre o microambiente e o desenvolvimento do câncer (Hanahan, 2022). Essas adições ampliam ainda mais nossa compreensão sistêmica das complexas características associadas ao desenvolvimento e progressão tumoral. No entanto, ainda se faz necessário investigar como esses processos sistêmicos são orquestrados por meios de interações moleculares entre distintos microambientes celulares.

Figura 1. *Hallmarks of Cancer 2022.*



Legenda: *The Hallmarks of Cancer* - novas adições. Representadas estão as adições canônicas e prospectivas aos "*Hallmarks of Cancer*" (Hanahan, 2022).

De acordo com Boutry et al. (2022), a progressão tumoral pode ser compreendida sob uma abordagem evolutiva e ecológica, considerando tempo e escala, sob uma perspectiva celular, na qual as células alteradas atravessam ciclos de seleção clonal que podem favorecer à progressão tumoral (Boutry *et al.*, 2022; Fouad; Aanei, 2017). Essa seleção é moldada pelas interações com o tecido original, o microambiente tumoral, assim como alterações sistêmicas em casos de metástase, e também pelas defesas do hospedeiro (Dasari *et al.*, 2021; Fidler, 2003; Kamb, 2005; Yates; Campbell, 2012).

Assim, a plasticidade e heterogeneidade celular, influenciadas pelo microambiente e pelos mecanismos de defesa do hospedeiro, têm o potencial de promover a seleção de populações tumorais funcionalmente diversas em níveis celular e molecular. Essa diversidade celular, por sua vez, pode impactar a eficácia terapêutica, uma vez que a ampliação da diversidade celular pode propiciar a formação de subpopulações quimio-resistentes em

tumores, mesmo antes de sua detecção (Hochberg *et al.*, 2013; Kinker *et al.*, 2020).

1.1 Câncer de mama

O câncer de mama é o tumor maligno mais prevalente entre as mulheres em escala global. No ano de 2022, cerca de 2,3 milhões de mulheres foram diagnosticadas com esse tipo de câncer, resultando em 670 mil óbitos ao redor do mundo, conforme dados fornecidos pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2024).

No cenário brasileiro, excluindo os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama desponta como o mais incidente entre mulheres de todas as regiões, sendo mais prevalente nas áreas Sul e Sudeste. Além disso, assume o posto de principal causa de morte por câncer nesse gênero. A taxa de mortalidade, ajustada por idade para a população mundial, foi de 11,71 óbitos a cada 100.000 mulheres no ano de 2021. As projeções do Instituto Nacional de Câncer (INCA), indicam que mais de 73 mil novos casos são esperados anualmente no período de 2023 a 2025, com uma incidência estimada de 41,89 casos por 100 mil mulheres (INCA,2022) (tabela 1).

Tabela 1. Taxas brutas e ajustadas* de incidência por neoplasia maligna da mama, por 100 mil mulheres, estimadas para cada ano do triênio 2023-2025, segundo Brasil, regiões e Unidades da Federação.

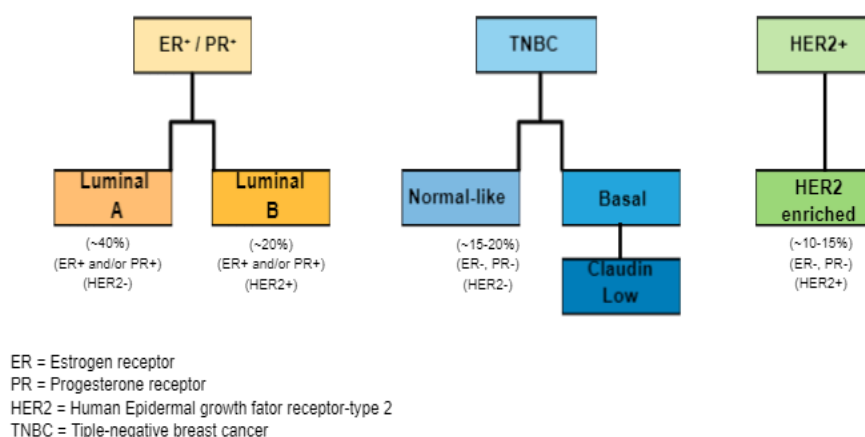
Região / Unidade da Federação	Nº de casos	Taxa bruta	Taxa ajustada*
Região Norte	2.410	24,99	27,73
Acre	100	22,21	26,20
Amapá	80	16,58	20,04
Amazonas	500	22,77	28,34
Pará	1.020	22,83	23,88
Roraima	70	22,09	27,73
Tocantins	320	38,58	35,72
Região Nordeste	15.690	52,20	42,11
Alagoas	690	39,23	34,89
Bahia	4.230	54,35	43,28
Ceará	3.080	63,92	54,13
Maranhão	1.060	28,76	28,29
Paraíba	1.180	55,40	41,37
Pernambuco	2.880	56,58	46,40
Piauí	860	50,31	41,89
Rio Grande do Norte	1.140	61,61	50,11
Sergipe	570	46,42	42,11
Região Centro-Oeste	4.950	57,28	47,30
Distrito Federal	1.030	62,70	49,76
Goiás	1.970	52,74	45,63
Mato Grosso	1.040	57,70	47,51
Mato Grosso do Sul	910	62,22	47,10
Região Sudeste	39.330	84,46	52,83
Espírito Santo	900	42,20	32,94
Minas Gerais	7.670	69,80	49,28
Rio de Janeiro	10.290	111,83	70,57
São Paulo	20.470	84,43	56,37
Região Sul	11.230	71,44	41,06
Paraná	3.650	60,76	41,06
Rio Grande do Sul	3.720	62,67	36,60
Santa Catarina	3.860	102,12	74,79
Brasil	73.610	66,54	41,89

* Taxas ajustadas pela população mundial padrão. Fonte: INCA, 2022.

O câncer mamário é uma doença heterogênea, composta por diversos subtipos moleculares podendo diferir em sua origem celular, biologia e resposta ao tratamento. Os principais subtipos de câncer de mama são: subtipo ER+, que apresenta expressão acima do limiar do receptor de estrogênio (ER) pelas células cancerígenas, podendo haver expressão conjunta ou não do receptor de progesterona (ER+; PR+/-), HER2 (receptor de fator de crescimento epidérmico humano), sem expressão concomitante dos receptores de estrogênio e progesterona (HER2+; ER-, PR-) e o TNBC- triplo negativo, caracterizado pela ausência de expressão acima do limiar de receptores hormonais e HER2 pelas células alteradas (TNBC; ER-, PR-, HER2-) (Januškevičienė; Petrikaitė, 2019; Wu *et al.*, 2021)(Figura 2).

Além disso, os cânceres mamários podem ser classificados a partir de transcriptomas com base na assinatura de 50 genes, conhecida como PAM50, em cinco subtipos moleculares: tipo luminal (LumA e LumB), enriquecido com HER2 (HER2E), tipo basal-like (BLBC) e normal-like. O perfil fornecido pelo PAM50 também pode indicar as chances de metástase tumoral (Jørgensen *et al.*, 2021). Essas classificações proveniente de informações moleculares permitem uma abordagem mais refinada na compreensão e tratamento dos tumores mamários.

Figura 2. Estratificação simplificada dos subtipos de câncer de mama.



Legenda: Simplificação de classificação dos subtipos de câncer de mama.

Sugere-se que os subtipos de câncer de mama apresentam diferentes características devido às suas células de origem, que podem variar desde o estado de células-tronco até células em estados de diferenciação terminal (Prat *et al.*, 2010; Proia *et al.*, 2011; Song; Hu, 2017). No entanto, embora o câncer de mama seja amplamente estudado, ainda não existe consenso sobre os aspectos celulares e moleculares que justificam a agressividade tumoral,

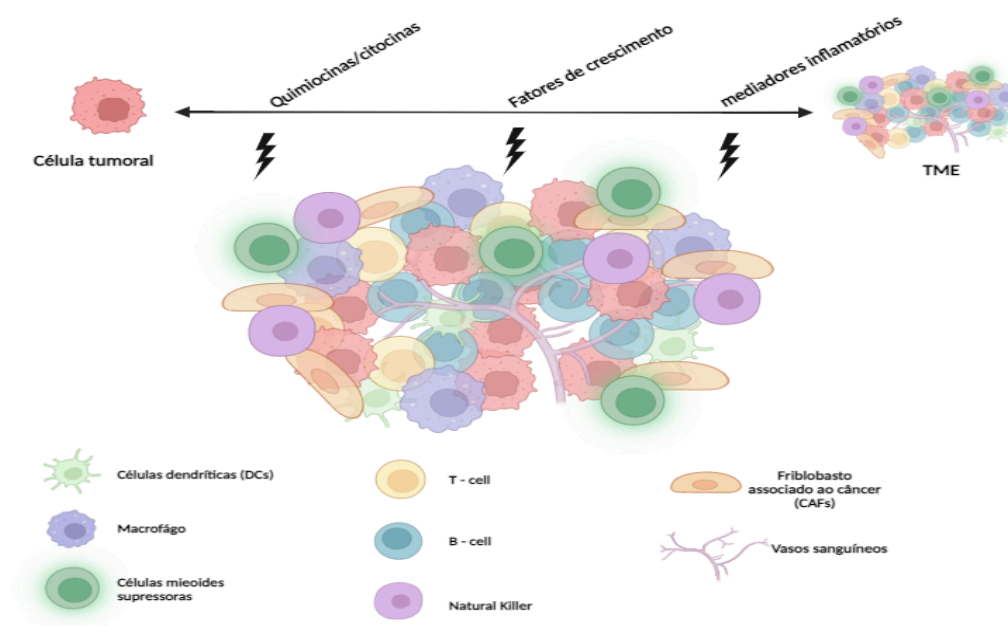
disseminação, dormência e recorrência em microambientes secundários.

1.2. Microambiente tumoral (TME)

O microambiente tumoral (TME) constitui um nicho de interações dinâmicas entre as células cancerígenas e seu entorno. Essa rede complexa de interações define a funcionalidade e organização do microambiente, seja nas comunicações célula-célula e/ou célula-matriz. As células tumorais estabelecem interações complexas com outras células presentes no microambiente, como fibroblastos, células endoteliais e células imunológicas, tanto da linhagem mieloide quanto da linhagem linfoide. Além disso, componentes não celulares na matriz extracelular, como fibronectinas, colágeno e laminina, também podem sofrer alterações na presença de tumores (Baghban *et al.*, 2020; Jahanban-Esfahlan *et al.*, 2017, 2018).

Em ambientes adversos, as células cancerígenas interagem com diferentes tipos celulares, promovendo, por meio de seleção e adaptação, a sobrevivência e progressão tumoral (Baghban *et al.*, 2020). Essa rede complexa de interações, também conhecida como interatoma (conjunto de interações), pode ser mediada por fatores solúveis, tais como quimiocinas, citocinas, fatores de crescimento e mediadores inflamatórios, dentre outros (Balkwill; Capasso; Hagemann, 2012; Denisenko; Budkevich; Zhivotovsky, 2018) Figura 3.

Figura 3. Representação Esquemática do Microambiente Tumoral.



Legenda: O microambiente tumoral (TME) consiste em um nicho de interações dinâmicas entre as células cancerígenas e seu entorno, composto principalmente por células imunes hematopoiéticas, CAFs, e células estromais residentes, além disto, Os componentes extracelulares como citocinas, quimiocinas e fatores solúveis permitem a comunicação intercelular. Fonte: autoria própria).

1.3. Alterações na hematopoiese, no sistema imunológico e no nicho pré-metastático podem ser modulados pelo tumor durante a disseminação de células cancerígenas

Além das modificações e interações no microambiente tumoral local, estudos diversos evidenciaram que os processos tumorais desencadeiam alterações homeostáticas sistêmicas. Essas alterações propiciam a migração e a instalação de células tumorais disseminadas, assim como a modificação de nichos distantes, tornando-os permissíveis para o desenvolvimento de tumores secundários originados a partir de células tumorais circulantes provenientes de tumores primários. Os mecanismos de disseminação de células tumorais estabelecem interações significativas com a hematopoiese e, por conseguinte, com o sistema imunológico. (Kaplan *et al.*, 2005; Kovacic; Croucher; McDonald, 2014; Kusmartsev; Gibrilovich, 2006; Nobre *et al.*, 2021; Peinado *et al.*, 2017).

Todas as linhagens celulares do sistema imune têm sua origem no processo de hematopoiese, que, em mamíferos adultos, ocorre em microambientes específicos, conhecidos como nichos, localizados no interior de ossos longos, denominado medula óssea. Este microambiente é intrincado, especializado e heterogêneo em sua composição celular, sendo constituído por células mesenquimais, células tronco hematopoiéticas, células hematopoiéticas progenitoras e diferenciadas e células vasculares. Esses componentes interagem de maneira coordenada para sustentar o processo hematopoiético por meio de sinalizações rigorosamente reguladas. (Baccin *et al.*, 2020).

As células-tronco e progenitoras hematopoiéticas (HSPC) residem nesse microambiente, sendo responsáveis pela geração de toda a variedade de células imunológicas. Essa variedade de células englobam tanto a linhagem mieloide, que inclui células dendríticas, monócitos, granulócitos e megacariócitos, quanto a linhagem linfocítica, que abrange as células natural killer (NK), linfócito B e linfócito T. Essas células desempenham funções essenciais e, coletivamente, integram o sistema imunológico do organismo (Doulatov *et al.*, 2012).

O nicho hematopoiético em condições normais e saudáveis opera por meio de ciclos circadianos, através de processos de retroalimentação, alternando entre períodos de

quiescência e divisões celulares assimétricas. Quando o nicho hematopoiético apresenta alguma perturbação que desregula o ciclo circadiano, esse processo pode gerar divisões e diferenciações celulares anormais, dando origem a células supressoras imunológicas, como células supressoras derivadas da linhagem mieloide (MDSCs), o que pode promover o crescimento tumoral, aumento de permissividade de nichos pré-metastático e progressão metastática (Gabrilovich, 2017; Giles *et al.*, 2016).

Perturbações da hematopoiese induzida pela presença do tumor têm sido documentadas ao nível celular, como a expansão proeminente de células como neutrófilos e monócitos ambos em desenvolvimento de maturação incompleto, que migram para o microambiente tumoral gerando efeito imunossupressor e diminuindo a ação de células mais eficientes como NK e células T citotóxicas frente à progressão tumoral (Canè *et al.*, 2019; Gabrielovich; Ostrand-Rosenberg; Bronte, 2012; Jaillon *et al.*, 2020).

Adicionalmente, em estudo recente, Nobre e colaboradores (2021) identificaram um importante mecanismo de dormência de células tumorais disseminadas. Utilizando células tumorais de câncer de mama encontradas na medula óssea, identificaram interação entre célula-tronco mesenquimal NG2+/Nestin+ (MSC-NG2+/Nestin+) com células tumorais, desencadeando mecanismos moleculares que promovem dormência dessas células tumorais disseminadas. Estes mecanismos também são identificados em interações entre MSC-NG2+/Nestin+ e células-tronco hematopoiéticas saudáveis, promovendo a manutenção e o controle da divisão celular deste nicho (Nobre *et al.*, 2021).

É importante ressaltar que este processo de indução à dormência e em um microambiente complexo como a medula óssea pode ser um fator determinante para o reaparecimento a longo prazo de tumores após terapia e em estado de remissão, já que células tumorais podem beneficiar-se de mecanismos sistêmicos e se alojarem em nichos distintos para permanecerem no organismo, posteriormente repopulando microambientes secundários ou até mesmo em microambiente de origem (Nobre *et al.*, 2021).

Além disso, a identificação de mecanismos capazes de regular a latência, disseminação e progressão das células tumorais oferece *insights* e abre novas perspectivas para abordagens terapêuticas. Isso evidencia que o microambiente pode prevalecer sobre a sinalização oncogênica potente, reforçando a noção de que os mecanismos microambientais podem ter um papel dominante sobre a genética quando as células cancerosas ainda conseguem responder aos sinais celulares e microambientais do hospedeiro (Nobre *et al.*, 2021).

Um dos mecanismos mais relevantes na tumorigênese é a interação bidirecional com

células do sistema imune, seja local ou por mecanismos sistêmicos (Baghban *et al.*, 2020). As células do sistema imune são capazes de reconhecer e eliminar células tumorais. No entanto, eventualmente esse processo é ineficaz, seja por condições que diminuem a eficiência imunológica ou pela própria natureza das células tumorais, que adquirem capacidade de escape do sistema imune (Hanahan; Weinberg, 2011). Virtualmente, todas as células do sistema imune estão envolvidas no processo de defesa contra tumores e são componentes importantes no microambiente tumoral. As interações imunológicas com o tumor desempenham um papel fundamental na seleção, afetando não apenas a progressão local do tumor, mas também potencialmente o processo de disseminação para locais distantes, conhecido como metástases (Baghban *et al.*, 2020; Fouad; Aanei, 2017; Hiam-Galvez; Allen; Spitzer, 2021).

A disseminação de células da neoplasia primária para órgãos distantes e seu crescimento desordenado é geralmente associado a casos clínicos mais severos. Apesar de ser uma doença relativamente ordinária e potencialmente capaz de disseminar-se e desenvolver-se em qualquer tecido do hospedeiro, é sabido que determinados cânceres apresentam maior afinidade por tecidos e nichos específicos. Tal afinidade foi apresentada como a hipótese “semente e solo” (*seed and soil*), proposta por Stephen Paget em 1889. Paget propôs que certas células tumorais (que ele equiparou à “semente”) têm afinidade específica para o microambiente de determinados órgãos (que ele equiparou ao “solo”). O autor dessa hipótese concluiu que as metástases se formavam apenas quando a semente e o solo eram compatíveis (Fidler, 2003).

Além disso, microambiente de nichos distantes e saudáveis pode sofrer modificações, tornando-se mais permissível à colonização por células tumorais disseminadas, resultando em tumores secundários. A mudança na composição celular, especialmente de células do sistema imunológico nos microambientes distantes, pode criar um nicho conhecido como pré-metastático. Ou seja, antes mesmo da detecção de células tumorais nesses microambientes distantes, é possível identificar alterações locais que sugerem maior permissividade para a hospedagem de células tumorais disseminadas (Kaplan *et al.*, 2005; Peinado *et al.*, 2017).

Em 2005, Kaplan e seus colegas demonstraram em estudos com camundongos que células derivadas da medula óssea (BMDCs), que expressam o receptor do fator de crescimento endotelial vascular 1 (VEGFR1), migram para locais pré-metastáticos específicos, como o pulmão, e formam aglomerados celulares antes da chegada de células tumorais. Essas células tumorais começam a ser detectadas localmente após alguns dias do aumento da população de BMDCs no local (Kaplan *et al.*, 2005; Peinado *et al.*, 2017).

Em um estudo mais recente, utilizando scRNAseq, Kaczanowska e colaboradores (2021) acompanharam mudanças nas populações celulares imunológicas no pulmão antes e após a presença de tumores no organismo, mas antes da migração de células tumorais para o pulmão. Observou-se um aumento significativo no número de populações de células mieloides, incluindo granulócitos, monocitos, macrófagos e células dendríticas monocíticas (DCs), nos pulmões de camundongos com tumores. Por outro lado, encontrou-se uma diminuição dramática de DCs convencionais, que são necessários para apresentação de antígeno e ativação de uma resposta imune adaptativa eficaz. Essas alterações em sítios não adjacentes ao tumor primário podem desempenhar um papel crucial na criação de microambientes pré-metastáticos mais permissivos (Kaczanowska *et al.*, 2021).

1.4. Algoritmos de comunicação celular

Para realizar análises de interações na tumorigênese, algoritmos de comunicação examinam dados de expressão provenientes de análises transcriptômicas com resolução celular, como sequenciamento de RNA de célula única (scRNAseq). Esses algoritmos identificam elementos de comunicação intercelular e exploram listas de interações entre ligantes e receptores, assim como redes de expressão intracelular (Medaglia *et al.* 2017; Wu *et al.* 2021; Lummertz da Rocha *et al.* 2022). Essa abordagem permite uma compreensão mais detalhada das dinâmicas moleculares e celulares envolvidas no processo tumoral.

Diversos algoritmos são empregados no estudo de interatomas, como o CCCEXplorer, que se destaca ao utilizar componentes de interação ligante-receptor e mensurar a regulação gênica através de fatores de transcrição regulados positivamente (CHOI *et al.*, 2015). Este algoritmo foi aplicado na análise de amostras de câncer de ovário, identificando redes de sinalização Smad dependentes de TGF- β e independentes de TGF- β em uma cascata de comunicação em fibroblastos associados ao câncer (CAFs). A ativação dessas redes mostrou-se associada a baixas taxas de sobrevivência dos pacientes (Yeung *et al.*, 2018).

Wang e colaboradores (2019) empregaram o algoritmo NicheNet, que, fundamentado em conhecimentos prévios da literatura, deduz interações celulares (proteína-proteína), sinalização intracelular, regulação gênica e modulações de fatores de transcrição-alvo. Este algoritmo foi utilizado em análises de interações entre células tumorais de câncer de cabeça, câncer de pescoço e componentes imunológicos no microambiente tumoral (Browaeys; Saelens; Saeys, 2020).

Em uma abordagem distinta, Chiara Medaglia e colaboradores (2017) desenvolveram

o Niche-seq, que combina repórteres fluorescentes fotoativáveis, microscopia de dois fótons e sequenciamento de RNA de célula única (scRNA-seq) para inferir a composição celular e molecular de nichos. Ao aplicar o Niche-seq para avaliar a composição imune de diferentes nichos em tumores de melanoma, os pesquisadores identificaram distintas composições mieloides em nichos que apresentam diferentes estruturas de matriz extracelular (Medaglia *et al.*, 2017).

Recentemente, Rocha e colaboradores (2022) apresentaram o algoritmo CellComm, que foi desenvolvido com o propósito de inferir diferenciação e destino celular durante o estágio embrionário de células-tronco hematopoiéticas em modelos de camundongo. Este algoritmo demonstrou sua capacidade em prever interações entre células ou locais específicos (utilizando dados de transcriptoma espacial), regulação gênica e transição fenotípica. Os pesquisadores identificaram redes de transcrição que regulam o processo celular de origem hematopoiética, tais como Stat3, Nr0b2, Ybx1 e App. Posteriormente, os papéis desses genes foram confirmados em modelos animais, incluindo zebrafish, camundongo e células humanas (Lummertz da Rocha *et al.*, 2022).

Adicionalmente, o algoritmo CellComm foi empregado na inferência de redes de comunicação celular a partir de dados de transcriptômica espacial originados de carcinoma de células escamosas, um tipo de câncer de pele (Lummertz da Rocha *et al.*, 2022). Essa aplicação destaca a adaptabilidade e eficácia do algoritmo em diferentes tecidos, tanto em estados saudáveis quanto alterados. Esses avanços contribuem significativamente para a compreensão das complexas dinâmicas celulares e moleculares em diversos contextos biológicos.

Portanto, a aplicação de diversas ferramentas, como a utilização de algoritmos para inferir a comunicação intercelular (*crossstalk*), é agregador ao escopo de conhecimento no entendimento do microambiente celular. Essa comunicação pode ocorrer por meio de interações célula-a-célula, envolvendo proteínas de superfície, ou ser mediada por secretomas, que são sistemas de ligantes secretados no meio extracelular podendo ter efeito à distância, inclusive sistêmico.

Além disso, a compreensão dessas intrincadas redes de comunicação no microambiente apresenta potencial para aprimorar o desenvolvimento de imunoterapias eficazes contra o câncer, particularmente aquelas que visam a inibição da comunicação celular. Um exemplo notável é a terapia centrada na inibição do *checkpoint* imunológico, especificamente na interação entre o PD-1 (receptor de morte celular programada 1) e o

PD-L1 (ligante de morte celular programada 1). Essa estratégia imunoterápica emerge como uma abordagem significativa no tratamento oncológico, buscando interromper a sinalização que desativa as respostas imunológicas das células T quando estas interagem com células cancerígenas que expressam PD-L1 (Topalian; Drake; Pardoll, 2012).

A complexidade dos processos tumorais, a heterogeneidade celular dos microambientes teciduais e a dinâmica da comunicação celular apresentam desafios significativos para a investigação da biologia tumoral. Os processos de comunicação celular, tanto localmente quanto sistemicamente, ainda não foram totalmente compreendidos.

A capacidade atual de quantificar os transcriptomas de células individuais têm proporcionado uma compreensão sem precedentes da diversidade celular em vários tecidos. Técnicas como *single cell*, aplicadas em microambientes teciduais, permitem inferências mais precisas dos processos biológicos em níveis molecular e celular, incluindo estados saudáveis e alterados, como no câncer.

A abordagem da Biologia de Sistemas, integrando diferentes níveis e aspectos da organização biológica, pode contribuir para entender a biologia do câncer e da metástase. Essa interdisciplinaridade entre Ciências Biológicas e Ciência da Computação permite a mensuração e integração de grandes quantidades de dados de sistemas biológicos complexos, contribuindo para compreender os efeitos sistêmicos do câncer no organismo. Algoritmos desenvolvidos e aplicados em estudos biológicos são ferramentas importantes para direcionar predições *in silico* e o desenvolvimento de novas abordagens em experimentos *in vitro* e *in vivo*.

Além disso, estudos mostram que as células tumorais do câncer de mama frequentemente metastizam para a medula óssea e o pulmão. A compreensão da comunicação entre o tumor e esses microambientes em nível celular e molecular é crucial para entender a biologia da metástase desses tumores.

2. HIPÓTESE

As células do microambiente tumoral dos diferentes subtipos de câncer de mama (receptor de estrogênio positivo - ER+, receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 - HER2+ e triplo negativo - TNBC) apresentam potenciais interações sistêmicas com grupos celulares da medula óssea e do microambiente pulmonar.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

Caracterizar o conjunto de ligantes e receptores expressos nos subtipos de câncer de mama, assim como os ligantes e receptores expressos em órgãos distantes, investigando potencial interação entre si.

3.2. Objetivos específicos

- Buscar e analisar os dados públicos de célula única referentes aos três subtipos de câncer de mama (ER+, HER2+ e TNBC), bem como à medula óssea e ao pulmão.
- Identificar quais grupos celulares apresentam maiores potenciais de interação a nível local e sistêmico, entre os subtipos de câncer de mama, medula óssea e pulmão.
- Identificar ligantes de células cancerígenas dos três subtipos de câncer de mama (ER+, HER2+ e TNBC) com potencial de interação com receptores de grupos celulares da medula óssea e pulmão.
- Abstrair as interações comuns dos três subtipos de câncer de mama (ER+, HER2+ e TNBC) com a medula óssea e pulmão, assim como inferir funcionalidade biológicas;

4. METODOLOGIA

4.1. Obtenção dos datasets

A busca e seleção dos conjuntos de dados foi realizada em paralelo com uma revisão da literatura. Durante esse processo de seleção, foram estabelecidos dois requisitos essenciais. Primeiramente, os dados deveriam ter sido gerados utilizando a tecnologia scRNAseq, garantindo, assim, uma resolução de célula única. Em seguida, era necessário que os dados fossem provenientes da espécie *Homo sapiens*. Como este estudo foca exclusivamente em predições computacionais de interações sistêmicas do eixo câncer de mama, medula óssea e

pulmão, os dados são provenientes de amostras biológicas desses distintos nichos (ER+, HER2+, TNBC, medula óssea e pulmão), oriundos de trabalhos realizados e publicados por grupos de estudos independentes, mas disponibilizados publicamente. Neste estudo todos os conjuntos de dados estão disponíveis para acesso no GEO - NCBI (Gene Expression Omnibus - National Center for Biotechnology Information).

Dessa forma, os conjuntos de dados dos subtipos de câncer de mama (ER+, HER2+, TNBC) são provenientes do artigo intitulado "*A single-cell and spatially resolved atlas of human breast cancers*", com o código de identificação GSE176078 (Wu *et al.*, 2021). O conjunto de dados da medula óssea foi publicado no artigo intitulado "*Single cell, multi-omic analysis identifies regulatory programs in mixed phenotype acute leukemia*", sob o acesso GSE139369 (Granja *et al.*, 2019). Por fim, para o microambiente pulmonar, utilizou-se o conjunto de dados com o número de acesso GSE171524, publicado no artigo intitulado "*A molecular single-cell lung atlas of lethal COVID-19*" (Melms *et al.*, 2021).

Figura 4. Fluxo de trabalho.



Figura 5: Os dados biológicos foram gerados por grupos de pesquisas distintos a partir de amostras específicas e independentes de cada estudo (verde). Os dados foram disponibilizados em plataformas públicas (azul). Os conjuntos de dados passaram por filtros e análises *in silico* (rosa). Por fim, utilizando os algoritmos e predições, orientou nossas inferências biológicas (marrom). (Figura do autor, produzida no Biorender)

4.2. Pré-processamento dos dados e criação do objeto CellRouter a partir dos conjuntos de dados

Para a análise dos dados de células individuais, empregamos uma ferramenta denominada *Framework for Unified Single-Cell Analysis* (FUSCA, versão 1.3.1), um pacote desenvolvido na linguagem de programação R. O FUSCA é um software composto de dois

módulos: o CellRouter (Lummertz da Rocha *et al.*, 2018), e o CellComm (Lummertz da Rocha *et al.*, 2018, 2022).

Em resumo, o CellRouter é uma plataforma versátil de análise de células individuais que utiliza redes de fluxo para identificar trajetórias complexas de transição fenotípica e obter perfis de subpopulações celulares. Este algoritmo não requer conhecimento prévio da estrutura da trajetória, como o número de ramificações ou destinos celulares. O software introduz o conceito de subpopulação para identificar transições fenotípicas celulares e encontrar comunidades dentro do ecossistema tecidual ou nicho. Independentemente da complexidade e ramificação dos dados, o CellRouter permite estudar qualquer transição entre subpopulações (Lummertz da Rocha *et al.*, 2018).

Por outro lado, o CellComm é um algoritmo de Biologia de Sistemas que utiliza dados de scRNA-seq para ponderar redes de interação ligante-receptor, usando medições de co-expressão intracluster para prever vias de regulação a partir de interações intercelulares em microambientes. Quando dados de transcriptômica espacial estão disponíveis, o CellComm pode considerar a co-localização de tipos de células ou nichos para prever a comunicação celular.

Este algoritmo pode inferir quais tipos de células se comunicam com base nas interações ligante-receptor, identificadas pelo cálculo da expressão média intragrupo de ligantes ou receptores entre combinações de pares de tipos de células (Lummertz da Rocha *et al.*, 2022). Além disso, o CellComm implementa um algoritmo de otimização para identificar caminhos no interactoma que conectam genes de superfície celular a reguladores transcricionais a jusante, prevendo efetores putativos de redes de sinalização de forma orientada por dados (Lummertz da Rocha *et al.*, 2022).

O FUSCA foi executado através do ambiente RStudio, a partir do servidor do Laboratório de Biologia de Sistema da UFSC. O emprego das ferramentas do FUSCA possibilita a realização do pré-processamento de dados, uma fase essencial que se encarrega da normalização e ajuste dos dados, tornando-os aptos para uma variedade de análises em várias etapas, de acordo com as necessidades do usuário.

Após o processamento, inicialmente, foram criados cinco objetos do tipo CellRouter. Destes, três objetos representam o câncer de mama, cada um separado por subtipos (ER+, HER2+, TNBC). Além disso, um objeto contém dados da medula óssea saudável (BM) e outro contém dados do pulmão saudável (Lung). Posteriormente, foram gerados outros seis objetos pela combinação de cada subtipo de câncer de mama com a medula óssea (ER_BM, HER2_BM e TNBC_BM), bem como os três subtipos de câncer de mama com o pulmão

(ER_LUNG, HER2_LUNG e TNBC_LUNG). Para a fusão dos dados provenientes de estudos independentes, foi utilizado o pacote Harmony, após a integração dos dados, visando minimizar interferências provenientes do processamento laboratorial até a obtenção dos dados para análise.

As análises conduzidas neste estudo empregaram os mesmos conjuntos de dados iniciais. No entanto, duas abordagens distintas foram necessárias: análises de nicho específico (local) e análises sistêmica (interação entre nichos). Embora a metodologia e os algoritmos tenham sido previamente desenvolvidos, aplicados e validados para análises de nicho específico, neste projeto, uma abordagem semelhante foi adotada para as análises sistêmicas, com ajustes pertinentes para relacionar diferentes nichos. Esta abordagem possui similaridade no trabalho de Magidey-Klein e colaboradores (2021), que utilizaram análises de expressão diferencial da medula óssea de camundongos com tumores melanoma para identificar receptores-alvo na medula óssea de citocinas produzidas pelo tumor primário (Magidey-Klein *et al.*, 2021).

4.3. Visualização dos clusters celulares nos datasets

Após o pré-processamento, foram conduzidas etapas de filtragem para avaliar a qualidade dos dados, incluindo a verificação da porcentagem (5%-10%) de genes mitocondriais expressos em comparação com a expressão global de RNA de cada célula, bem como a definição de uma quantidade mínima e máxima de genes expressos (200-2500). Em seguida foi feito a normalização (*NormalizeData*), escalonamento (*ScaleData*), procura de caracteres discrepantes (*FindVariableFeatures*) e cálculo da correlação entre as células usando a análise de componentes principais de análises (PCA) e aproximação e projeção de variedade uniforme (UMAP).

Para visualizar a representação dos grupos celulares dentro do objeto CellRouter, utilizamos a função *PlotReducedDimension*, configurando parâmetros como o objeto de análise, o método de redução aplicado (UMAP) e o tipo de anotação (`annotation = "celltype"`). Inicialmente, geramos gráficos de clusterização para cada conjunto de dados, sem identificar tipos celulares específicos. Em seguida, importamos as anotações celulares correspondentes dos artigos utilizados ou disponíveis nos arquivos do Laboratório de Biologia de Sistemas - UFSC e as sobrepujamos nos gráficos.

4.4. Interações ligantes-receptor

O FUSCA é capaz de usar qualquer lista de ligantes e receptores como entrada, para este estudo utilizou-se os ligantes e receptores disponibilizados pelo NicheNet (BROWAEYS et al., 2020) que é um dos mais completos atualmente. Durante o processo de análise de comunicação intercelular, alguns objetos com informações são criados.

Tendo as interações e aplicando $p < 0.01$, criou-se uma matriz de interação (tmp), a qual se aplicou o comando *plotInteractionMatrix2* e obteve-se um *heatmap* apresentando a interação entre os clusters. Dessa forma, obteve-se uma visão geral da comunicação inter grupos celulares presente no conjunto de dados. Adicionalmente, foram feitas listas contendo grupos celulares selecionados específicos, considerando os objetivos do estudo, como por exemplo, células cancerígenas proveniente do câncer de mama (*cluster_ligante*), células imunológicas ou células hematopoéticas e progenitoras da medula óssea (*cluster_receptor*), assim como células receptoras do microambiente pulmonar, em vez de se limitar apenas aos grupos celulares com as maiores amplitudes de interações. Essas listas serviram como base para a aplicação do comando *plotPairDotplot* do pacote ggplot2 (versão 3.4.1), resultando na geração de um gráfico que evidencia os ligantes e receptores priorizados dentro dos grupos celulares selecionados.

4.5. Representação em Teoria de conjuntos

Os procedimentos mencionados anteriormente foram aplicados de forma individual para cada contexto específico, assim como para cada interação sistêmica entre os subtipos de câncer de mama e a medula óssea, bem como o pulmão. Como resultado, foram geradas listas de interações para cada conjunto de dados, abrangendo os nichos isolados (ER, HER2, TNBC) e as interações sistêmicas entre os subtipos de câncer de mama e a medula óssea (ER_BM, HER2_BM, TNBC_BM) e entre os subtipos de câncer de mama e o pulmão (ER_LUNG, HER2_LUNG, TNBC_LUNG). A partir dessas listas de interações, foram realizadas operações de conjuntos para abstrair informações quantitativas em cada relação de conjunto. Com essas relações, foram feitas listas referente às interseções gerais e realizado o enriquecimento funcional.

4.6. Enriquecimento funcional

Os genes selecionados na seção anterior foram então convertidos para a identificação proveniente do banco de dados do Ensembl. E a análise de enriquecimento funcional, aplicando a ontologia de gene (GO), fez uso da função *enrichGO* e *enrichKEGG* do *clusterProfiler* (versão 4.6.2; WU et al., 2021) e a anotação do *org.Hs.eg.db* (Carlson, M. 2022; *org.Hs.eg.db: Genome wide annotation for Human. versão 3.16.0*).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização dos grupos celulares

Os dados de câncer de mama foram gerados a partir de 26 amostras biológicas (11 ER+, 5 HER2+ e 10 TNBC) utilizando o sequenciamento de single cell. Após a importação dos dados, pré-processamento e aplicação dos filtros de qualidade do FUSCA, resultou em um conjunto de dados comportando um total de 35.942 células, distribuídas entre os três subtipos de câncer de mama (ER+ = 10.212, HER2+ = 10.284, TNBC = 15.446) e foram atribuídos para todos os três subtipos, 9 grupos celulares, sendo eles: células epiteliais normais (*normal epithelial*), células epiteliais cancerígenas (*cancer epithelial*), células T (T-cells), células mieloides (*myeloid*), células B (B-cells), plasmoblastos (*plasmoblasts*), células endoteliais (*endothelial*), fibroblastos associados ao cancer (*cancer-associated fibroblasts - CAFs*) e células semelhantes a perivasculares (perivascular-like cells - PVL) (Figura 5)

Provenientes de amostras pulmonar de pacientes saudáveis, resultou-se em 36.677 células, distribuídas em 9 grupos celulares: Células epiteliais (*Epithelial cells*), fibroblastos (*Fibroblasts*), mieloides (*Myeloids*), linfócitos-T (T-cells), mastócitos (*cells Mast*), linfócitos-B (B-cells), células endoteliais (*Endothelial cells*), células neuronais (*Neuronal cells*) células semelhantes a apresentadoras de antígenos (*APC-like*) (Figura 5)

Por fim, nos dados proveniente da medula óssea ao termino do processamento e agrupamento celular, resultou-se em 5.702 células, distribuídas em 26 grupos celulares, são eles: células tronco hematopoiética (*HSC*), eritrócito imaturo (*early eryth*), eritrócito maduro (*later eryth*), basófilo imaturo (*early baso*), Progenitor Mielóide Comum/Progenitor Multipotente Preparado para a Linhagem Linfóide - (Cmp/Lmpp), Progenitora linfocítica

5.2. Estratificação molecular dos três subtipos de câncer de mama

Para confirmar o subtipo de câncer de mama relacionado aos conjuntos de dados utilizados neste estudo, além das informações provenientes do artigo original, foi feita uma busca nos conjuntos de dados pela expressão dos genes marcadores para confirmar os subtipos. Os genes utilizados para a classificação dos subtipos são: ESR1, PGR e ERBB2; correspondentes aos receptor de estrogênio = ER, receptor de progesterona = PR e ao receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 = HER2 (Tsang; Tse, 2020).

Quando expresso ESR1 acima do limiar, com ou sem a expressão dos genes PGR e HER2, o tumor foi classificado como do subtipo ER+ (ESR1+ associado a PGR+/PGR-, ERBB2+/ERBB2-). Amostras que apresentaram expressão alterada apenas do gene ERBB2 (HER2), sem expressão dos receptores ESR1 e PGR entre as células epiteliais cancerígenas, foram classificadas como do subtipo HER2+ (ERBB2+, ESR1-; PGR-). Por fim, amostras que não mostraram expressão alterada dos marcadores hormonais e HER2 pelas células epiteliais cancerígenas foram classificadas como do subtipo triplo negativo (TNBC = ERBB2-, ESR1-; PGR-)(Hammond *et al.*, 2010).

Na Figura 6, representa a média de expressão dos genes correspondentes aos receptores hormonais e a porcentagem de células que expressam os respectivos genes: ESR1 (receptor de estrogênio = ER), PGR (receptor de progesterona = PR) e o gene ERBB2 (receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 = HER2). Os dados de cada subtipo de câncer de mama, previamente classificado pelos autores do artigo de origem (Wu *et al.*, 2021), apresentaram correspondência entre a classificação prévia e o perfil de expressão dos marcadores específicos neste estudo.

Figura 6. Painel de expressão gênica dos marcadores hormonais (ESR1 e PGR) e HER2

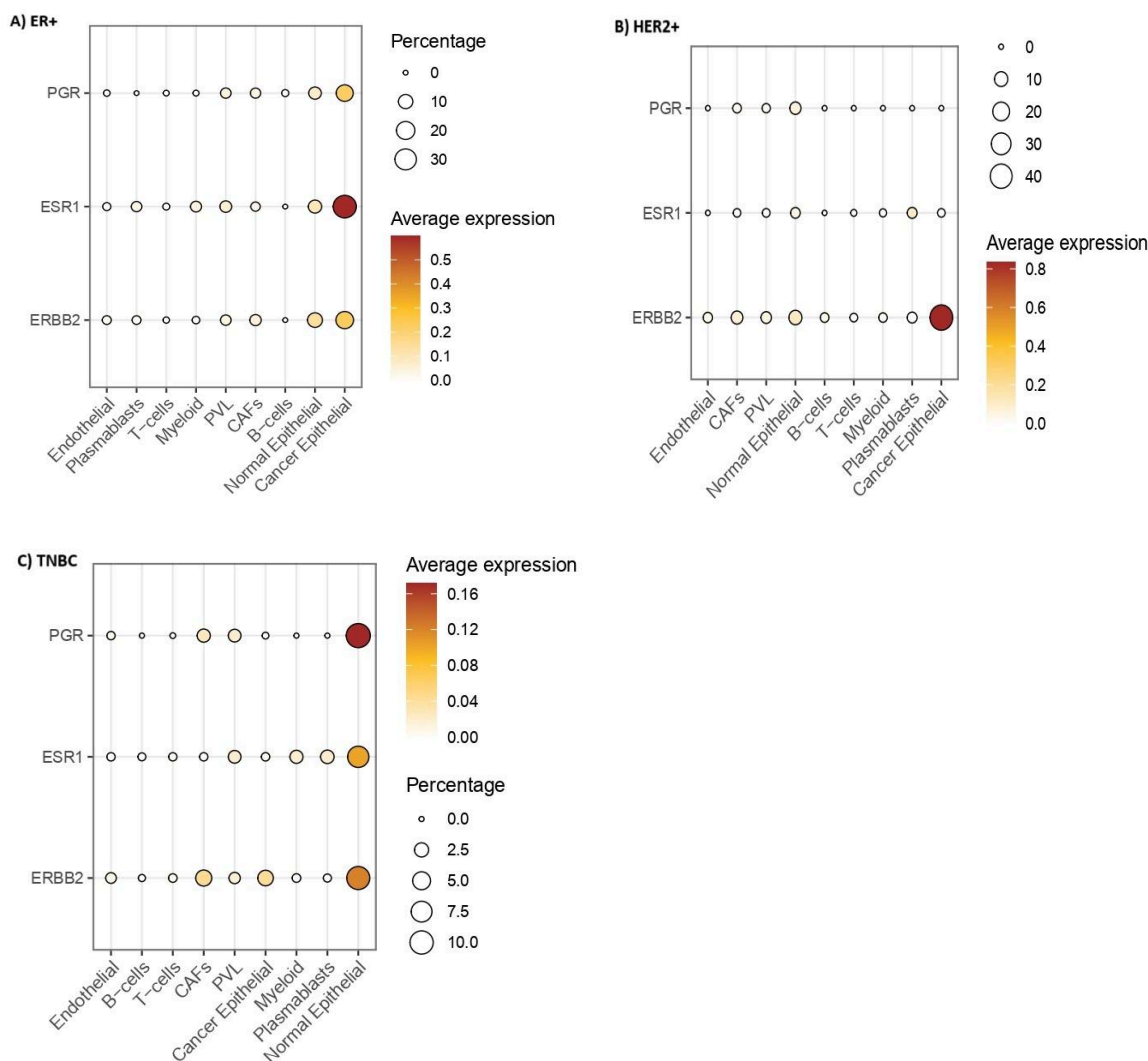


Figura 6. Expressão gênica dos marcadores específicos nos conjuntos de dados referente aos três subtipos de câncer de mama. A) ER+, B) HER2 e C) TNBC. O tamanho da circunferência do círculo representa a porcentagem de células pertencentes ao grupo celular do mesmo tipo que expressam o gene; enquanto a coloração indica a intensidade de expressão média dos genes em cada grupo celular.

É importante ressaltar que a estratificação dos subtipos de câncer de mama considera os perfis de expressão das células cancerígenas. Células epiteliais normais, apresentam expressão basal ou expressão dentro da normalidade, conforme a saúde, idade e ciclos menstruais dos indivíduos, etc (Taraborrelli, 2015; Yaşar *et al.*, 2017). Portanto, a identificação e a classificação dos tumores mamários precisam apresentar multi-etapas ou métodos quando em clínica, mas para este estudo, a classificação foi em nível de RNA mensageiro (mRNA), pois, consideramos que a expressão dos receptores seja diretamente proporcional à expressão do mRNA.

5.3. Interações entre grupos celulares em microambientes locais - Câncer de mama

A análise dos padrões de interação entre grupos celulares em diferentes subtipos de câncer de mama foi conduzida usando um painel de calor, baseado em uma matriz derivada da permutação dos ligantes e receptores dentro dos grupos celulares (Figura 7). Os potenciais de interação entre os grupos é definido pela quantidade de pares ligante-receptores co-expressos entre os tipos celulares correspondentes, com a cor no mapa de calor sendo proporcional a este número. Adicionalmente, foi elaborada uma tabela de proporção celular, juntamente com um painel (Tabela 2), demonstrando a fração de cada tipo celular dentro de cada subtipo tumoral (Figura 8).

Figura 7. Painel de interações entre grupos celulares: Câncer de mama ER+, HER2+ e TNBC.

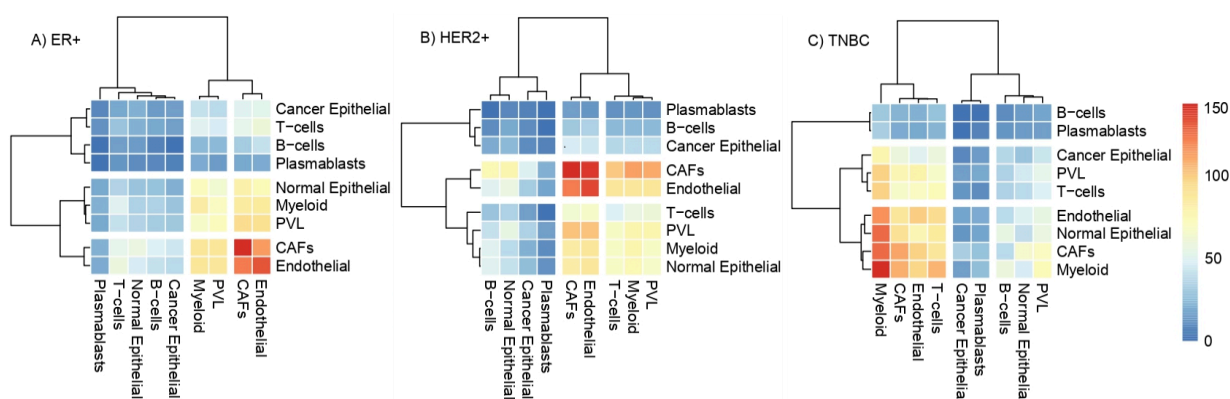


Figura 7. Interações entre os clusters por subtipo de câncer de mama: **A)** ER+, **B)** HER2+, **C)** TNBC. A escala de cores representa o grau da amplitude na rede de interação dos pares ligantes-receptores, sendo azul (menor grau) e vermelho (maior grau).

Todos os três subtipos de câncer de mama compartilham os mesmos grupos celulares. No entanto, quanto às interações entre os grupos celulares, tanto os subtipos ER+ quanto HER2+ exibem um padrão de interações entre grupos, semelhantes. Observa-se que tanto o subtipo ER+ quanto o subtipo HER2+ apresentam uma quantidade significativamente maior de interações entre os grupos CAFs_CAFs e Endothelial_Endothelial, seguidas por interações cruzadas entre esses mesmos grupos celulares, ou seja, CAFs_Endothelial. Além disso, no *heatmap*, observa-se que nesses dois subtipos (ER+ e HER2+), os grupos celulares PVL e células mieloides, embora apresentem menor destaque em comparação com os grupos CAFs e células endoteliais, estão presentes no quadrante mais destacável entre os grupos celulares

dentro de um mesmo subtipo de câncer de mama. O subtipo TNBC também demonstra, no quadrante destacado, interações entre os grupos celulares CAFs e células endoteliais. Entretanto, é o grupo de células mieloides que se destaca nas interações entre os grupos Myeloid_Myeloid, Myeloid_CAFs, Myeloid_Normal cell e Myeloid_Endothelial.

Fibroblastos e células endoteliais, são essenciais para manutenção da homeostase tecidual, são grupos celulares em constante atividade, principalmente na renovação e manutenção da matriz extracelular mesmo em tecidos saudáveis (Plikus *et al.*, 2021; Trimm; Red-Horse, 2023). Apesar de os mecanismos celulares no microambiente tumoral inicialmente poderem desempenhar atividades antitumorais, a ineficácia desses mecanismos pode levar a interações entre os grupos celulares ao longo do processo tumorigênico, os quais podem induzir mecanismos que promovem a progressão do tumor (Balta; Wabnitz; Samstag, 2021).

Os Fibroblastos associado ao câncer (CAFs), é um grupo importante na composição do microambiente tumoral e apresenta interações que podem moldar a progressão do tumor (Custódio; Biddle; Tavassoli, 2020). Os CAFs estão ligados ao aumento da diversidade fenotípica tumoral, especialmente a proliferação e invasão de células cancerígenas, e também promovem a angiogênese. Esses fibroblastos associados ao câncer desempenham um papel crucial na intensificação do processo inflamatório e na remodelação da matriz extracelular (MEC), fatores fundamentais para a progressão tumoral (Gascard; Tlsty, 2016; Li; Zhu, 2019).

Células endoteliais são células especializadas que revestem a superfície interna dos vasos. Desempenham função importante, como a permeabilidade vascular e interação com células circulantes, como células imunes, além de serem essenciais nos processos de angiogênese e inflamação. Em microambientes tumorais, além de fornecer estrutura física na formação de vasos, aportando oxigênio e nutrientes, células endoteliais participam ativamente na progressão de tumores sólidos, sendo capazes de remodelar matriz extracelular enquanto invadem tecidos circundantes, essencial para o crescimento tumoral e disseminação metastática (Potente; Mäkinen, 2017; Zhang *et al.*, 2018).

As células mieloides, por sua vez, são um grupo celular heterogêneo, composto por monócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, células dendríticas e megacariócitos, entre outros. Essas células são especializadas em detecção, fagocitose, apresentação de antígenos, destruição de patógenos, inflamação, doenças autoimunes e

cânceres (Bassler *et al.*, 2019; van Vlerken-Ysla *et al.*, 2023). Virtualmente todas as células do sistema imunológico participam de mecanismos complexos em nível sistêmico e local, além de estarem associados a diversos processos que modulam a progressão tumoral (Cha; Koo, 2020; Engblom; Pfirschke; Pittet, 2016; Lei *et al.*, 2020; van Vlerken-Ysla *et al.*, 2023).

É destacável o papel imunossupressor desenvolvido no ambiente tumoral associado ao processo inflamatório crônico, presente em câncer (Liu; Cao, 2016; Rahma; Hodi, 2019). Essa alteração duradoura acumula linhagens celulares como células imunossupressoras derivadas da linhagem mieloide (MDSCs), macrófagos associados ao tumor (TAM) e neutrófilos (Jaillon *et al.*, 2020; Raskov *et al.*, 2021; Tang; Li; Sun, 2021). Essas células promovem um ambiente imunossuprimido não só por sua abundância no microambiente tumoral, mas ativamente suprimem atividades de células mais eficientes como linfócitos e NK (Cha; Koo, 2020; Jaillon *et al.*, 2020; Nakamura; Smyth, 2020).

Devido ao grupo de células mieloides apresentar maior destaque em interações no TNBC, quando comparado ao mesmo grupo celular dos outros dois subtipos de câncer de mama (ER+ e HER+), foi considerado que essa maior interação celular poderia estar associado ao quantitativo celular dentro de cada subtipo, ou seja, maior quantidade celular, maior potencial de interações. Porém, não é evidenciado uma relação proporcionalmente direta entre a quantidade de células em termos absolutos e relativos a uma maior quantidade de interações entre grupos celulares em cada subtipo.

Por exemplo, no subtipo TNBC, o número de células mieloides é significativamente maior (1594) em comparação com o subtipo ER+ (716) e HER2+ (481). Essa diferença na quantidade absoluta e proporcional de células mieloides pode contribuir para um aumento nas interações observadas neste grupo celular no subtipo TNBC. Por outro lado, quando consideramos o grupo de células epiteliais cancerígenas, observamos que o subtipo TNBC também apresenta uma quantidade absoluta e proporcionalmente maior de células (2404) em comparação com os subtipos ER+ (603) e HER2+ (348). Apesar desta diferença significativa na quantidade de células, não há uma alteração notável no perfil de interação observado no *heatmap* entre os três subtipos em relação a esse grupo celular específico.

Tabela 2. Números absolutos e proporcionais por grupo celular referente aos três subtipos de câncer de mama.

Tipo celular	ER+		HER2+		TNBC	
	absoluto	proporção (%)	absoluto	proporção (%)	absoluto	proporção (%)
<i>Normal Epithelial</i>	218	2.134743	409	3.9770517	163	1.055289
<i>Cancer Epithelial</i>	603	5.904818	348	3.3838973	2404	15.563900
<i>Endothelial</i>	953	9.332158	348	3.3838973	317	2.052311
<i>PVL</i>	833	8.157070	420	4.0840140	341	2.207691
<i>Plasmablasts</i>	117	1.145711	29	0.2819914	372	2.408391
<i>CAFs</i>	714	6.991774	753	7.3220537	1256	8.131555
<i>Myeloid</i>	716	7.011359	481	4.6771684	1594	10.319824
<i>T-cells</i>	5886	57.638073	7199	70.0019448	8179	52.952221
<i>B-cells</i>	172	1.684293	297	2.8879813	820	5.308818

Legenda: Números absolutos e proporcionais por grupo celular referente aos três subtipos de câncer de mama.

Figura 8. Proporção dos grupos celulares comparada aos três subtipos de câncer de mama.

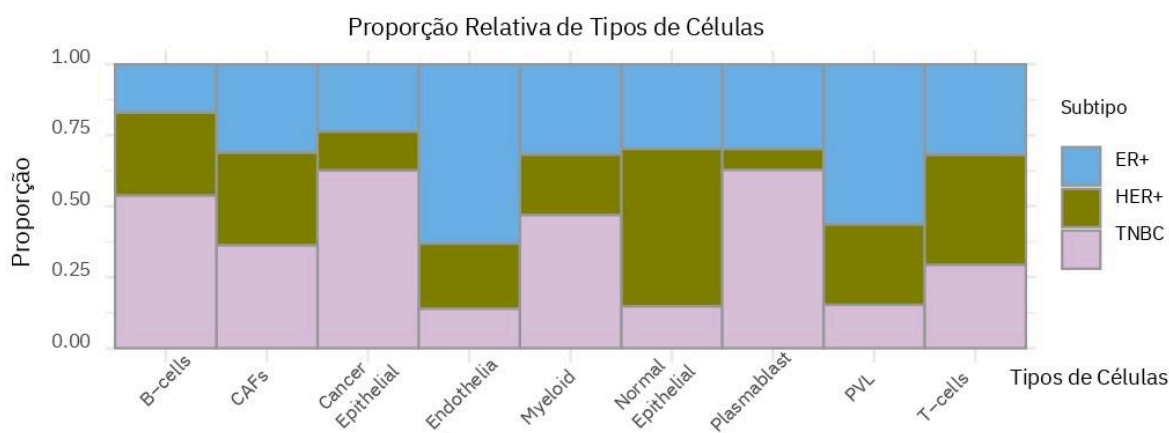


Figura 8. O gráfico de barras representa a proporção dos grupos celulares identificados nos três subtipos de câncer de mama. A cor azul indica a porção do subtipo ER+, a cor verde indica o subtipo HER+ e a cor lilás é referente ao subtipo TNBC. Quanto maior o preenchimento do gráfico de barras pela respectiva cor, indica que a população celular está presente em maior número na fração correspondente.

Ademais, embora o grupo celular de linfócitos T seja significativamente superior em termos tanto de quantidade absoluta quanto proporcional nos três subtipos de câncer de mama, sua relevância no *heatmap* em relação à quantidade de interações entre grupos celulares não demonstra um aumento proporcional. Tal fenômeno pode estar relacionado com a ineficiência funcional de alguns tipos celulares mediante a progressão tumoral (Calcinotto *et al.*, 2019; Yasuda; Baba; Ishimoto, 2023).

Os linfócitos T desempenham um papel crucial nas respostas imunes contra os tumores. Contudo, a evasão do sistema imunológico ocorre através da expressão elevada de receptores inibitórios, da redução na produção de citocinas eficazes e da diminuição da atividade citotóxica. Isso, combinado com a baixa imunogenicidade dos antígenos tumorais, resulta no acúmulo de células T senescentes, anérgicas e exaustas no microambiente tumoral (TME) (Davoodzadeh Gholami *et al.*, 2017). Estratégias terapêuticas, como o bloqueio de receptores inibitórios, especialmente PD-1 e PD-L1, têm sido exploradas para restaurar a função das células T e aumentar a resposta antitumoral. A terapia combinada tem mostrado resultados promissores, superando algumas limitações associadas ao uso isolado de bloqueadores de receptores inibitórios (Schütz *et al.*, 2017).

Assim, mesmo que haja uma maior quantidade relativa ou absoluta de células de um determinado tipo em um microambiente, isso não resultou em uma mudança diretamente proporcional e significativa no perfil geral de interação dos três subtipos, indicando uma complexidade na influência do microambiente tumoral que vai além dos aspectos quantitativos celulares. É notável que, nos três subtipos de câncer de mama, o grupo de células epiteliais cancerígenas apresenta uma menor quantidade de interações com outros grupos em comparação com o grupo celular do mesmo tipo, mas sem alterações, sugerindo que embora as células cancerígenas sejam imprescindíveis para o desenvolvimento de um microambiente tumoral, este por sua vez é sustentado e modulado por diversos tipos celulares circundantes.

5.4. Interações entre grupos celulares em microambientes locais - Medula óssea e Pulmão

O *heatmap* do microambiente da medula óssea destaca um quadrante devido ao seu potencial de interações entre grupos celulares que interagem entre si. Entre eles, incluem-se: CD14mono1, CD14mono2, CD14mono, pDC, cDC e HSC. Dos pares de interação entre os grupos celulares da medula óssea, destaca-se: HSC_CD14Mono2, HSC_CD16Mono, CD14Mono2_CD14Mono2 e CD16Mono_CD14Mono2 (Figura 9).

Figura 9. Painel de interações entre grupos celulares em tecidos saudáveis

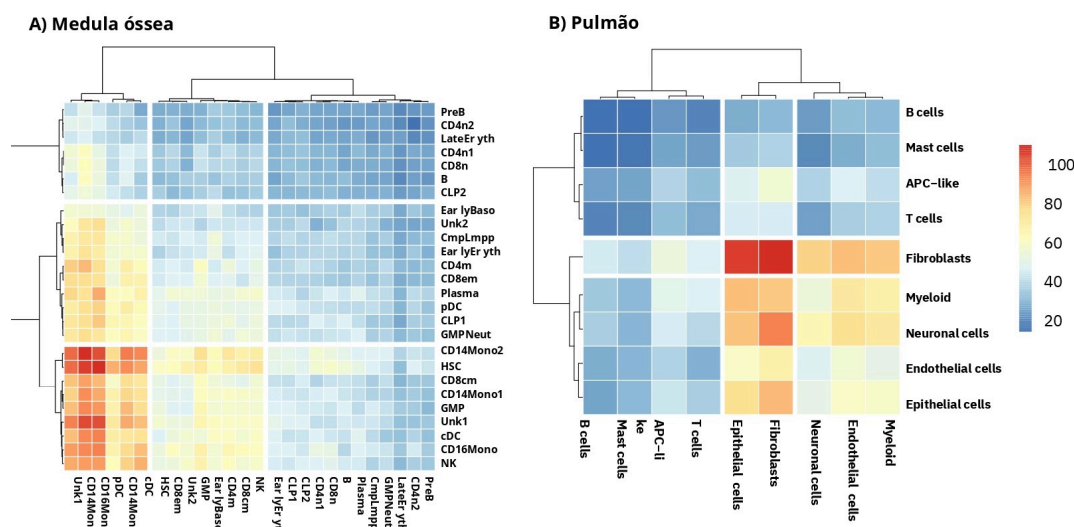


Figura 9. Interações entre os clusters: **A)** medula óssea e **B)** Pulmão. A escala de cores representa o grau da amplitude na rede de interação dos pares ligantes-receptores, sendo azul (menor grau) e vermelho (maior grau).

O nicho hematopoiético é mantido por uma variedade de células, incluindo células mesenquimais, vasculares, dendríticas e monócitos residentes, que interagem para modular a diferenciação ou dormência das células-tronco e progenitoras (Belyavsky; Petinati; Drize, 2021). No que diz respeito às células-tronco hematopoiéticas (HSC), embora sejam células cruciais no nicho hematopoiético, nossos resultados mostraram uma interação mais evidente com monócitos (CD16+ e CD14+) e células dendríticas. É importante observar que os dados da medula óssea não incluem células mesenquimais, as quais, conforme evidenciado na literatura, desempenham uma forte funcionalidade biológica na manutenção e modulação de HSPC. Vale ressaltar que a célula desconhecida 1 (unk1) será desconsiderada em nossa abordagem devido à ausência de informações.

É notável que tanto os monócitos (CD14+ e CD16+) quanto as células dendríticas demonstram um perfil de interações mais evidente em comparação com outros grupos celulares. Essas interações podem ser atribuídas à maturidade e atividade das células dentro do microambiente hematopoiético, contribuindo para a manutenção do nicho.

Ao analisarmos o *heatmap* do pulmão, os fibroblastos foram o grupo com maior destaque em interações, tanto intra grupo (Fibroblast_Fibroblast), quanto intergrupo (Fibroblast_Epithelial) (Figura 9).

Nos espaços intersticiais dos pulmões, os fibroblastos residentes desempenham um papel central na síntese da matriz extracelular e têm uma importância crucial como células efectoras durante o processo de reparo de lesões (White, 2015). Por outro lado, as células epiteliais possuem um elevado número de corpos lamelares e desempenham a função de produzir e secretar surfactante, o qual desempenha um papel crucial na manutenção da função pulmonar normal (John *et al.*, 2021).

Ambos os grupos celulares (fibroblastos e células epiteliais) desempenham funções estruturais e de manutenção ativa no ambiente pulmonar, mesmo em condições saudáveis. O perfil de interação de ambos os grupos celulares no *heatmap* pode estar associado às suas atividades contínuas e essenciais para a manutenção e homeostase do microambiente pulmonar saudável.

5.5 Análises sistêmicas (*Merge*)

A partir deste ponto, as análises serão conduzidas integrando os dados individuais de cada subtipo tumoral (ER+, HER2+ e TNBC) com os conjuntos de dados da medula óssea e com os dados do microambiente pulmonar. O objetivo dessas análises é prever virtualmente as possíveis interações sistêmicas que envolvem distintos microambientes.

Os conjuntos de dados também foram analisados em combinações entre câncer de mama e medula óssea (ER+_BM, HER2+_BM e TNBC_BM), assim como câncer de mama e pulmão (ER+_LUNG, HER2_LUNG e TNBC_LUNG), para prever interações sistêmicas. Para isso, foi realizado o *merge* utilizando a função *Harmony*, com o objetivo de reduzir a interferência decorrente do processamento e da origem dos dados (Figura 10 e Figura 11).

Figura 10. *Merge* entre os dados dos subtipos de câncer de mama e pulmão.

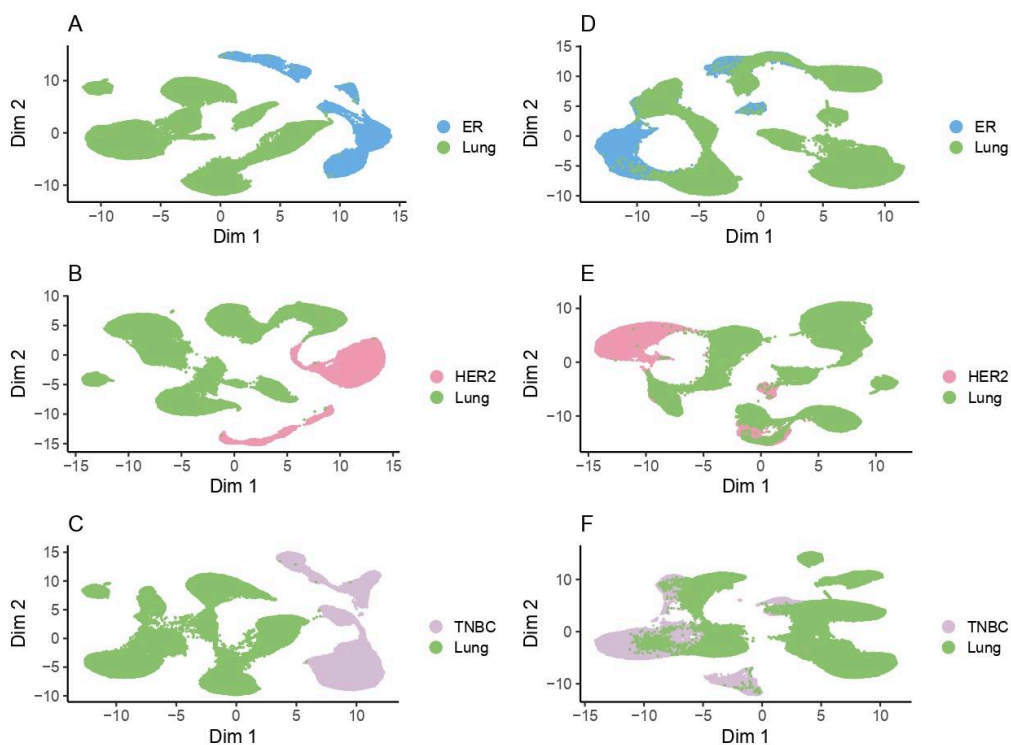


Figura 10. Merge entre os dados dos subtipos de câncer de mama e pulmão: **A**, **B** e **C** - Merge utilizando os dados de cada subtipo de câncer de mama e do pulmão antes da aplicação do pacote Harmony. **D**, **E** e **F** - Utilizando os mesmo dados e aplicando o pacote harmony, diminuindo assim a interferência do processamento e origem dos dados.

Figura 11. *Merge* entre os dados dos subtipos de câncer de mama e medula óssea.

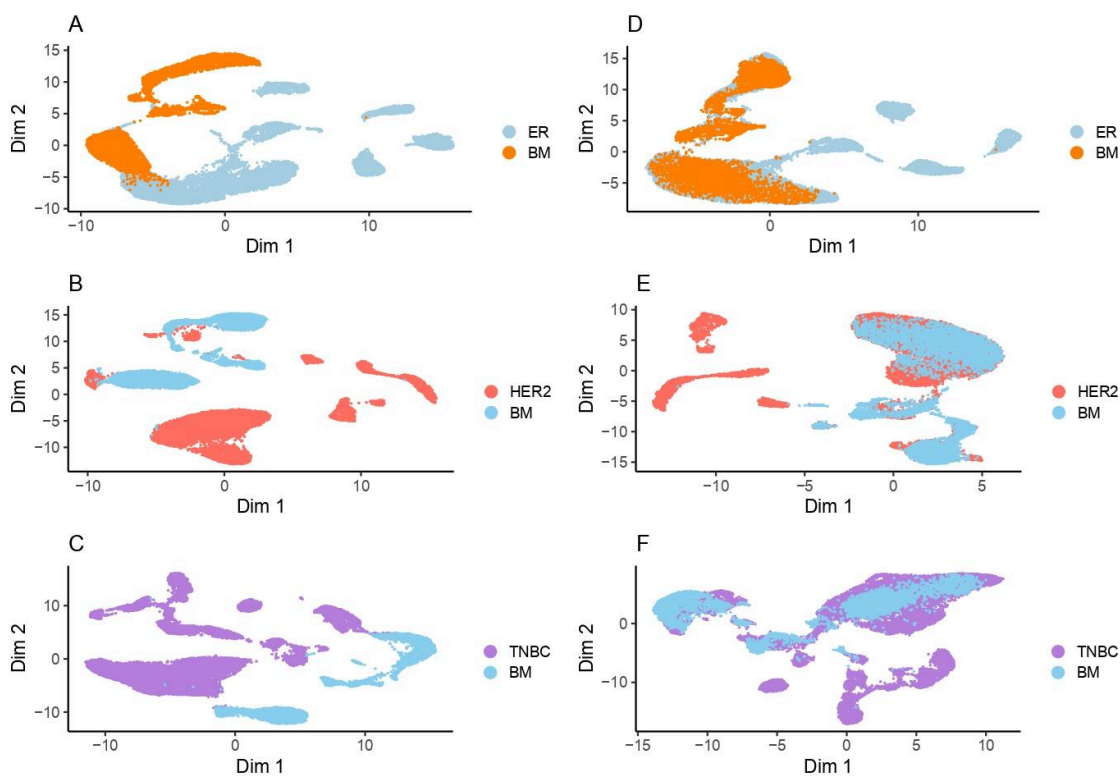


Figura 11 - Merge entre os dados dos subtipos de câncer de mama e medula óssea: **A, B e C** - Merge utilizando os dados de cada subtipo de câncer de mama e da medula óssea antes da aplicação do pacote Harmony. **D, E e F** - Utilizando os mesmo dados e aplicando o pacote harmony, diminuindo assim a interferência do processamento e origem dos dados.

As Figuras 10 e 11 ilustram os pares de conjuntos de dados antes e depois da aplicação do pacote *Harmony*. Notavelmente, A, B e C de ambas as figuras, a distribuição celular exibia uma tendência a agrupar-se de acordo com a origem dos dados, mantendo assim um viés nas análises. Mesmo em microambientes distintos, tipos celulares semelhantes, deveriam estar mais próximos uns dos outros do que grupos distintos dentro do mesmo conjunto de dados. No entanto, após a aplicação do pacote *Harmony*, os dados se sobrepõem de forma significativa, indicando uma distribuição baseada em semelhanças celulares em vez de semelhança entre a origem dos dados.

Conseqüentemente, após a fusão dos pares de conjuntos de dados, foram realizadas análises e aplicados os mesmos procedimentos de processamento utilizados para os conjuntos de dados individuais, com algumas modificações relevantes para preservar as informações sobre o microambiente de origem.

5.6. Interações entre grupos celulares sistêmicos

Foi realizada uma análise dos padrões de interação entre grupos celulares em diferentes subtipos de câncer de mama e medula óssea, utilizando um *heatmap* de força de interação. Esse heatmap foi construído com base em uma matriz derivada da permutação dos ligantes e receptores dentro dos grupos celulares. Todos os grupos celulares provenientes dos conjuntos de dados individuais foram mantidos, sem exclusões, resultando na junção completa dos dados individuais. Assim, o *heatmap* apresenta um panorama virtual das interações entre os grupos celulares, incluindo os pares: ER+_BM, HER2+_BM e TNBC_BM (Figura 12).

Figura 12. Painel de interações entre grupos celulares: Câncer de mama com medula óssea

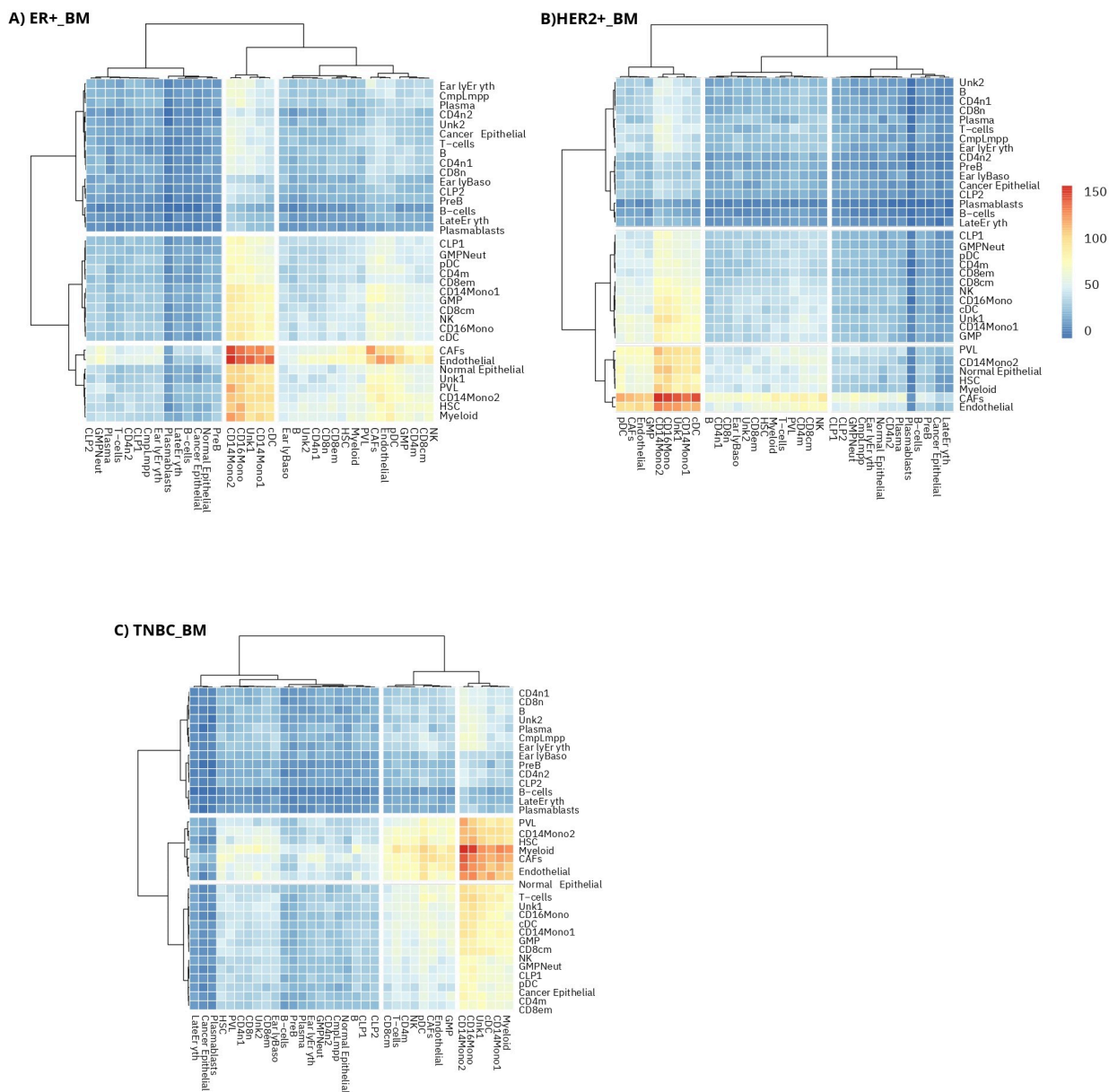


Figura 12. Interações entre os clusters: **A) ER+_BM**, **B) HER2+_BM** e **C) TNBC_BM**. A escala de cores representa o grau da amplitude na rede de interação dos pares ligantes-receptores, sendo azul (menor grau) e vermelho (maior grau).

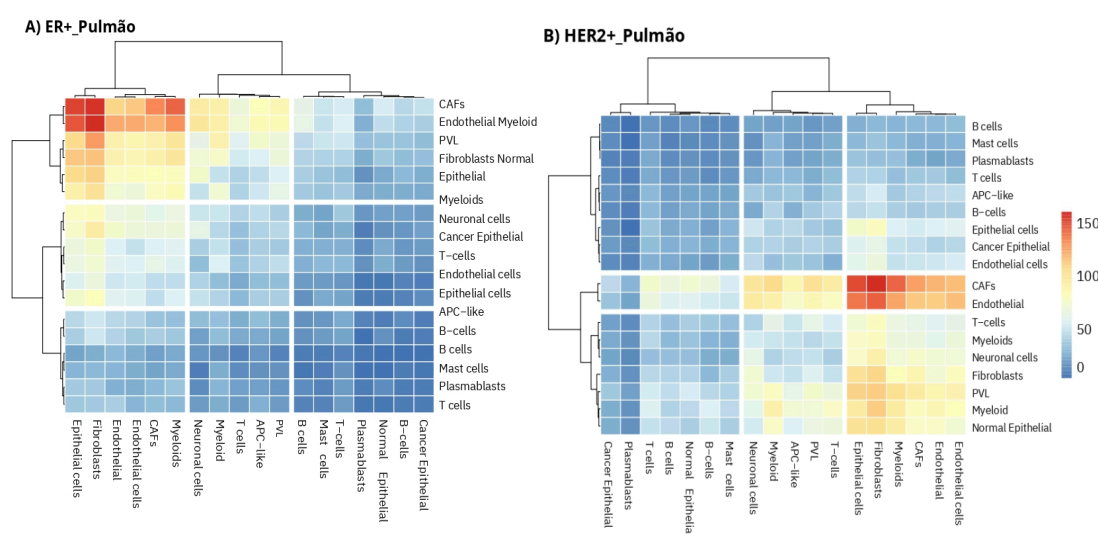
O padrão de interações entre os três subtipos de câncer de mama (ER+, HER2+ e TNBC) e a medula óssea, evidenciado pelo mapa de calor, mostrou que os grupos celulares com interações virtualmente mais significativas permaneceram proeminentes mesmo durante as análises em pares (ER+_BM, HER2+_BM, TNBC_BM). Em todos os subtipos, os grupos de fibroblastos associados ao câncer (CAFs) e células endoteliais emergiram como os mais

interativos. Além disso, no subtipo TNBC, as células mieloides também se destacaram como um grupo celular com potencial significativo de interações intercelulares. Quanto às células hematopoiéticas da medula óssea, os grupos de monócitos CD14 e CD16, assim como as células dendríticas (cDC e pDC), mantiveram consistentemente uma posição de maior perfil de interações.

No entanto, nota-se que esses grupos celulares mostraram de forma proeminente interações cruzadas nas análises sistêmicas, ou seja, CAFs e células endoteliais provenientes do câncer de mama, tiveram maior perfil de interações com monócitos e células dendríticas proveniente da medula óssea com relação aos demais grupos. Em todos os subtipos de câncer de mama, as células CAFs interagiram significativamente com os monócitos e células dendríticas presentes na medula óssea. Além disso, no subtipo TNBC, as células mieloides também apresentaram maior destaque em interações.

Devido a similaridades dos grupos celulares que se destacaram em quantitativo de potenciais interações tanto no *heatmap* individual quanto no heatmap entre pares, é possível que esses grupos celulares apresentem um perfil de receptores e ligantes relacionados a funcionalidades celulares contínuas e basais, presente em células que ocorram em diversos microambientes, como fibroblastos, células endoteliais, monócitos e células dendríticas, mesmo tendo sua localização em microambientes distintos.

Figura 13. Painel de interações entre grupos celulares: Câncer de mama com pulmão



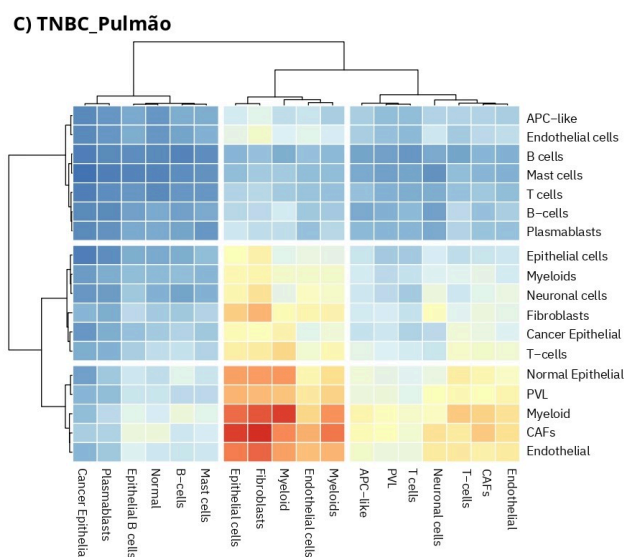


Figura 13. Interações entre os clusters: A) ER+_Pulmão, B) HER2+_Pulmão e C) TNBC_Pulmão. A escala de cores representa o grau da amplitude na rede de interação dos pares ligantes-receptores, sendo azul (menor grau) e vermelho (maior grau).

Ao analisar os *heatmaps* que abrangem os pares sistêmicos (ER+_Lung, HER2+_Lung, TNBC_Lung), observamos que os grupos celulares que se destacam em termos de interação em todos os três agrupamentos são os CAFs_Fibroblastos e CAFs_Epithelial. Essa proeminência da comunicação entre fibroblastos, tanto associados ao câncer quanto presentes em ambiente saudável, como o pulmonar, sugere que os fibroblastos nesses diferentes microambientes têm maior potencial de interações, seja entre CAFs_CAFs ou CAFs_Fibroblastos. O mesmo podemos considerar para células endoteliais, que apresentam maior potencial de interação entre si, mesmo proveniente de microambientes distintos, células endoteliais pulmonares com células endoteliais mamárias.

Ademais, considerando os perfis dos painéis de calor, tanto sistêmicos quanto locais, fica evidente que certos grupos celulares, como fibroblastos (associados ao câncer, não associados ao câncer), monócitos, células dendríticas e células endoteliais, apresentam maior potencial de interação.

Assim como foi enfatizado nas interações entre a medula óssea e os subtipos tumorais, os grupos celulares desempenham papéis cruciais e constantes na manutenção do tecido. Portanto, esse potencial de interações pode estar associado às funções celulares contínuas nos microambientes teciduais, em contraste com células mais especializadas, como linfócitos e

células mieloides, ou células em estágios de maturação, quando não apresentam mecanismos funcionais das suas respectivas células maduras.

Vale considerar que o *heatmap* é uma representação visual que prioriza principalmente a quantidade de interações entre grupos celulares e a coexpressão de ligantes e receptores envolvidos nessas interações. No entanto, é possível que grupos celulares com atividade dominante possam encobrir outros grupos relevantes. Com base na literatura e nos objetivos deste estudo, consideramos as interações cruzadas entre células CAFs, importante grupo celular frente a processos inflamatórios crônicos e composição do microambiente tumoral. Adicionalmente, também direcionamos as etapas subsequentes para os principais ligantes das células cancerígenas de mama, devido tanto a sua presença imperativa no tumor local quanto sua capacidade de se estabelecer em microambientes como medula óssea e pulmão em processos metastáticos.

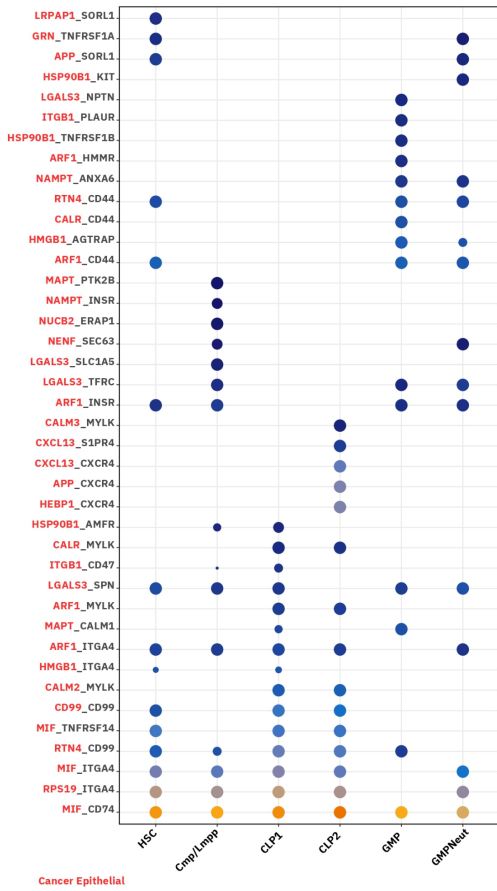
5.7. Interação ligante-receptor entre os grupos celulares sistêmicos

Com base na literatura e nas células de interesse deste projeto, foram identificados ligantes e receptores priorizados, com foco nos grupos de células cancerígenas epiteliais e células-tronco e progenitoras hematopoéticas. Os gráficos foram gerados utilizando as células cancerígenas, relacionando os ligantes aos respectivos receptores presentes em alguns grupos celulares da medula óssea e do pulmão, escolhidos separadamente (Figura 14).

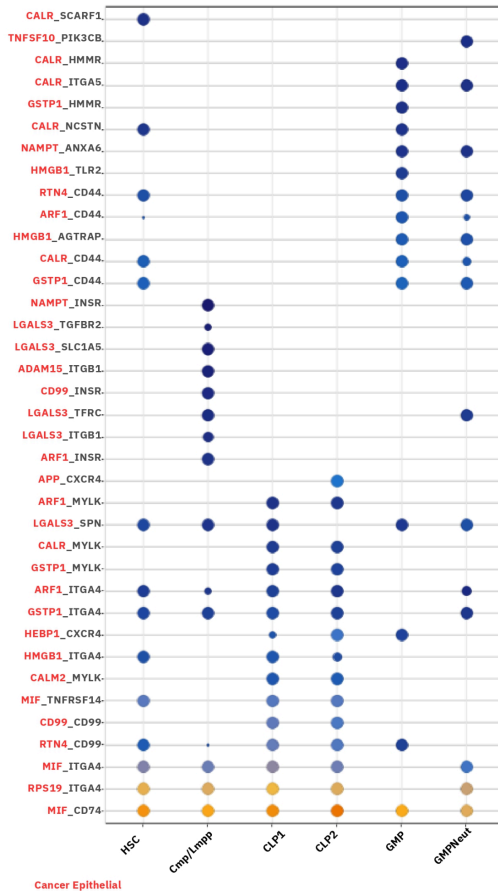
O algoritmo CellComm foi utilizado para inferir interações célula-célula originadas em distintos microambientes, para análises sistêmicas. Por meio da análise dos valores de coexpressão de pares ligante-receptor entre as diversas combinações de interações célula-célula, o algoritmo detecta potenciais redes de comunicação intercelular entre diferentes tipos de células. Neste estudo, o foco foi direcionado para essa etapa nos grupos celulares associados aos subtipos de câncer de mama ER+, HER2+ e TNBC (ligantes): as células epiteliais cancerígenas, devido ao seu potencial iniciador de tumores e capacidade de migração para os microambientes da medula óssea e do pulmão, e as células CAFs, um grupo celular conhecido por apresentar uma diversidade de interações no microambiente tumoral. Para os grupos "receptores", selecionamos as células-tronco e progenitoras hematopoéticas, dada a sua importância e as alterações observadas no processo hematopoiético em resposta a estímulos sistêmicos, conforme relatado na literatura (Figura 14).

Figura 14 - Interações priorizadas: Células cancerígenas dos subtipos de câncer de mama com HSPC.

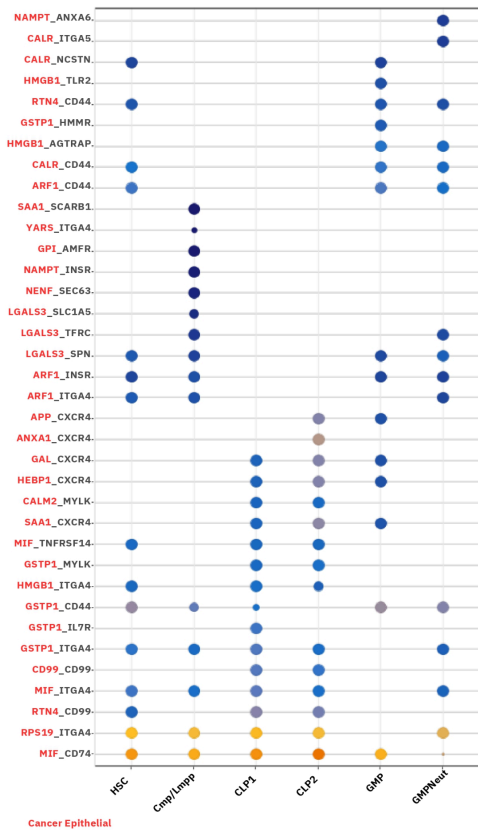
A)



B)



C)



- Célula emissora
- Célula receptora

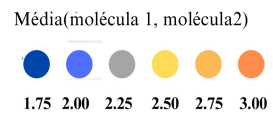
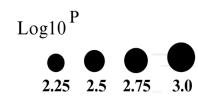


Figura 14. Interações priorizadas entre as células epiteliais cancerígenas (células emissoras) do microambiente tumoral com as células tronco e progenitoras da medula óssea (células receptoras): **A)** ER+_BM, **B)** HER2+_BM e **C)** TNBC_BM.

5.7.1. Ligantes comuns - Células Epiteliais cancerígenas

Os ligantes mais frequentes envolvidos nas potenciais interações dos três subtipos de câncer de mama foram; MIF, ARF1, LGALS3, CARL, APP, NAMPT, RNT4, RPS19 e HMGB1, expressos pelas células epiteliais cancerígenas, apresentaram potenciais interações com receptores expressos pelas células-tronco e progenitoras hematopoiéticas. Todos esses genes foram associados a funções biológicas relacionadas à progressão tumoral (Sumaiya et al., 2022; Ko et al., 2018; Boutas et al., 2019; Han et al., 2019; Lee et al., 2021).

O fator de inibição da migração (MIF) MIF é uma citocina expressa em vários tipos de células, incluindo células hematopoéticas, epiteliais, endoteliais, mesenquimais e neuronais (Jankauskas *et al.*, 2019). MIF atua de maneira autócrina e parácrina por meio da ligação e ativação dos receptores CD74/CD44, CXCR2, CXCR4 e CXCR7 (Alampour-Rajabi *et al.*, 2015; Amin *et al.*, 2006; Bernhagen *et al.*, 2007; Leng *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2016). O ligante MIF desempenha um papel fundamental na regulação da resposta imunológica e exibe polimorfismos em níveis genéticos e pós-transcricionais. Essa característica pode influenciar diversas interações e funções biológicas distintas, além de seu potencial alvo em imunoterapias (Kang; Bucala, 2019; Mora Barthelmess; Stijlemans; Van Ginderachter, 2023). O ligante MIF apresentou interações com os receptores CD74, ITGA4, TNFRSF14.

A proteína ARF (Inibidor de Quinase Dependente de Ciclina 2A) é uma proteína associada à regulação da proliferação celular, senescência e apoptose, portanto, correlacionada à atividade antitumoral. É frequente observar níveis reduzidos de ARF em tumores, o que pode estar correlacionado com processos pós-traducionais (Ko; Han; Song, 2018). Contrariamente, a superexpressão do mRNA de ARF, sem alteração do seu *locus*, foi descrita em diversos cânceres (Dominguez *et al.*, 2003; Ito *et al.*, 2004). Inesperadamente, pacientes com câncer de mama com aumento da expressão do ARF apresentaram alto risco de recorrência da doença, sem influência na taxa de sobrevivência (Davy *et al.*, 2009). As interações tendo ARF1 como ligante foram: ARF1_ITGA4, ARF1_MYLK, ARF1_INSR e ARF1_CD44.

O ligante LGALS3 (Glectin-3) está associado à proteção contra a apoptose, apresenta correlação com a progressão tumoral, crescimento celular, invasão e metástase (Boutas *et al.*, 2019). Em câncer de mama, galectin-3 possui a capacidade de heterodimerização com outras proteínas, como da família BCL-2, atuando fortemente em processos antiapoptóticos (Honjo *et al.* 2001; Boutas *et al.* 2019; Song *et al.* 2002). Houve maior interação entre LGALS3 com os receptores SPN, TFRC e SLC1A5, este último, associado a alterações metabólicas em cânceres (Nacheff *et al.*, 2021).

Calreticulina (CARL ou CRT) é uma proteína associada a adesão e sinalização de integrinas. Quando exposta a superfície celular, em células alteradas, promovem a fagocitose de corpos celulares. No entanto, níveis de expressão aumentados de Calreticulina estão associados a transformação celular, progressão tumoral em diversos tipos de malignidades (Han *et al.*, 2019). CARL apresentou potencial interação com os receptores MYLK, CD44, NCSTN.

Amyloid precursor protein (APP) é uma glicoproteína transmembrana que tem um importante papel na homeostase e desenvolvimento neuronal (Chen *et al.*, 2017). No entanto, também é expresso em diversos tecidos adultos e sua alta expressão concomitante com APLP, está presente em diversos cânceres, inclusive o câncer de mama e pulmão (Lee; Jeong; Jang, 2021). O ligante APP apresentou potencial interação com os receptores CXCR4, NOCTH1 E SORL1.

NAMPT (Nicotinamide Phosphoribosyltransferase) é uma enzima envolvida em processos de crescimento celular, apoptose e angiogênese, quando co-expresso com IL-7, aumenta a maturação de precursores de células B e fator de células tronco. NAMPT também está associado a diversos cânceres, onde seus inibidores são classificados como anticancerígenos na clínica, indicando que o NAMPT atua na progressão tumoral (Bi; Che, 2010). Esse ligante apresentou potencial interação sistêmica com os ligantes INSR e ANXA6.

Reticulon-4 (RTN4) é uma proteína que, em um contexto cancerígeno, a supressão ou redução de sua expressão retarda a proliferação das células cancerígenas. Associada a uma significativa melhora na sobrevida em pacientes com câncer de pulmão e mama. Por outro lado, a alta expressão de RTN4IP1 está correlacionada com um prognóstico desfavorável para pacientes com câncer de mama (Wang *et al.* 2023; Pathak *et al.* 2018). Este ligante apresentou potencial de interação com os receptores CD44, CD99, NTRK1.

RPS19 é uma proteína ribossomal, associada a funcionalidades imunossupressoras. O aumento de expressão de RPS19 foi demonstrado em câncer de mama e ovário humano (Nunez-Cruz *et al.*, 2012; Vadrevu *et al.*, 2014). Após a apoptose de células tumorais, essas proteínas alcançam o meio extracelular, interagem com receptores C5 (via complemento do sistema imune) expressos em mielóides infiltrados de natureza imunossupressora. Por tanto, a exposição da proteína em meio extracelular pode desencadear progressão tumoral em virtude de recrutamento de células imunossupressoras (Markiewski *et al.*, 2017). O ligante RPS19 apresentou potencial interação com os receptores C5AR1, CD4, ICAM1, ITGA4 E RPSA E VCAM1.

HMGB1 (High Mobility Group Box 1), é uma proteína presente em mamíferos, apresenta funções importantes em diversos tipos de doenças como autoimunes, inflamatórias e câncer. Inicialmente essa proteína foi associada a fator regulador da estrutura de moléculas de DNA, permitindo assim a modulação da expressão gênica celular. No entanto, outras funções biológicas são atribuídas a essa proteína, como por exemplo atuando como citocinas, ativando mecanismos relacionados à inflamação (Andersson; Tracey, 2011; Harris; Andersson; Pisetsky, 2012).

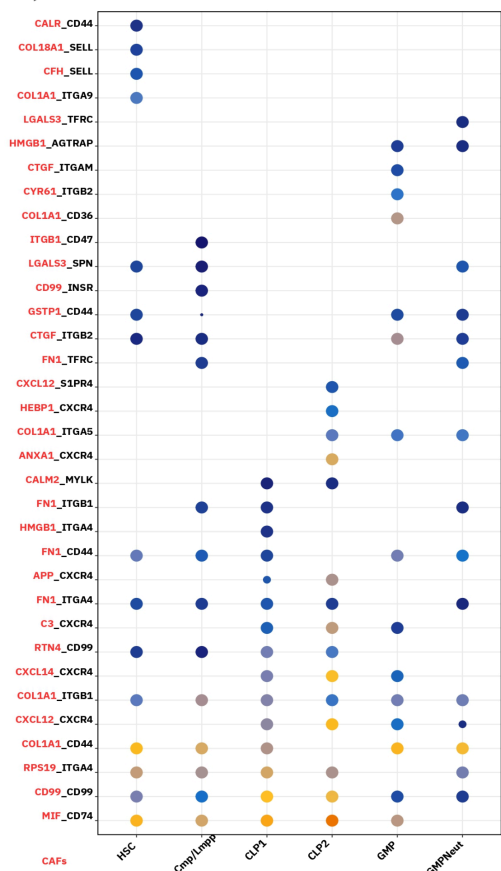
Além disso, quando são expostas no meio extracelular podem atuar como DAMP (padrão molecular associado a dano), inclusive associado a progressão tumoral (Jube *et al.*, 2012). HMGB1 possui a capacidade de se ligar a receptores Toll (TRLs), presentes em células do microambiente tumoral, tanto células imunes quanto células cancerígenas (Hreggvidsdóttir *et al.*, 2012). As interações identificadas foram: HMGB1_AGTRAP, HMGB1_FAS, HMGB1_ITGA4, HMGB1_LY96, HMGB1_NTRK1, HMGB1_TLR2, HMGB1_TLR4.

5.7.2. Ligantes comuns - CAFs

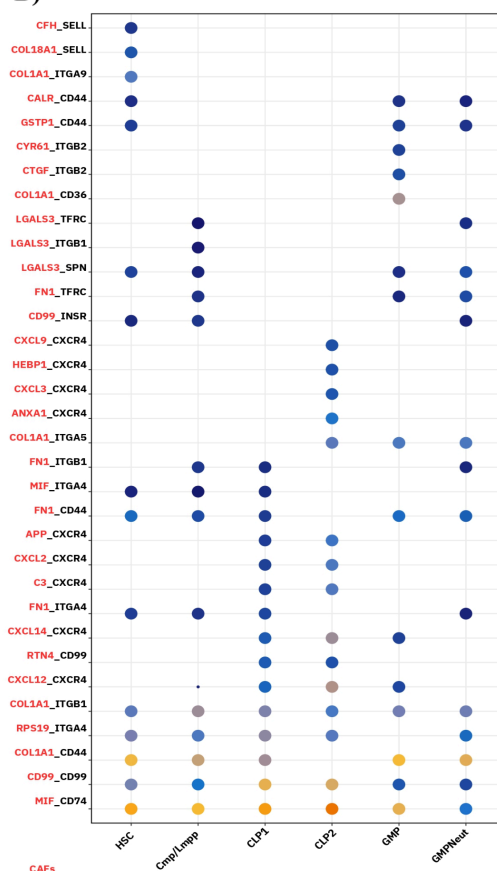
Quanto às interações priorizadas entre os Fibroblastos Associados ao Tumor (CAFs) e as células-tronco e progenitoras hematopoiéticas, além dos ligantes MIF, LGALS3 e RPS19, observou-se maior frequência de interações envolvendo os ligantes COL1A1, FN1, e CXCL12 (Figura 15).

Figura 15. Interações priorizadas: CAFs dos subtipos de câncer de mama com HSPC

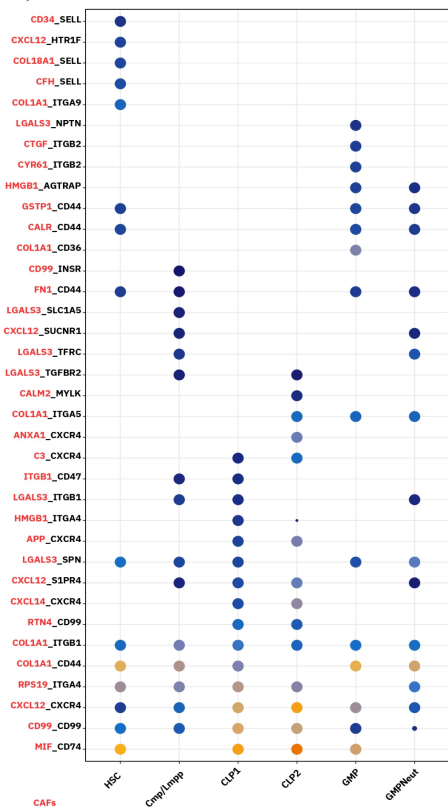
A)



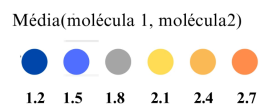
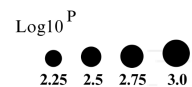
B)



C)



- Célula emissora
- Célula receptora



Legenda: Interações priorizadas entre CAFs (células emissoras) do microambiente tumoral com as células tronco e progenitoras da medula óssea (células receptoras): **A)** ER+_BM, **B)** HER2+_BM e **C)** TNBC_BM.

COL1A1 é um dos componentes do colágeno tipo I (cadeia alfa 1 do colágeno tipo I). O colágeno é o principal componente da matriz extracelular e é essencial para o funcionamento normal dos tecidos. O colágeno está associado principalmente à manutenção, estabilidade e integridade tecidual de diversos órgãos (Gelse; Pöschl; Aigner, 2003). A matriz extracelular é importante componente no microambiente tumoral, progressão e metástase. Ademais, no contexto do câncer, o colágeno regula fisicamente e quimicamente as características neoplásicas do microambiente tumoral, migração e sinalização de células cancerígenas, inclusive o câncer, facilitando o processo de metástase em câncer de mama (Liu *et al.*, 2018; Morjani *et al.*, 2021). Por ser um componente da matriz celular, esse ligante apresenta diversas interações com receptores celulares que permitem a estruturação tecidual assim como interações associadas à motilidade celular. COL1A1 apresentou potencial interação com as integrinas ITGA1, ITGA5, ITGA9, ITGAV, ITGB1, além dos receptores CD36, CD44 e SDC1.

Outro elemento crucial na matriz extracelular para a manutenção da arquitetura e homeostase tecidual é a fibronectina. Ela faz parte de uma família expressa por diversos tipos celulares, desempenhando papéis fundamentais em processos biológicos como crescimento, proliferação e diferenciação celular, adesão, migração, coagulação e cicatrização. FN1 é uma das glicoproteínas mais abundantes e amplamente distribuídas na matriz extracelular, apresentando propriedades únicas de auto-organização em fibrilas. Além de estar envolvida no desenvolvimento, crescimento, adesão e migração celular em tecidos saudáveis. No contexto do microambiente tumoral, FN1 demonstra expressão alterada, estando intimamente associada à atividade de subtipos de CAFs imunossupressores. Por estar correlacionada com a infiltração de células imunes, FN1 pode influenciar a progressão do câncer de mama por meio da regulação de vias envolvidas em processos inflamatórios. (Gao *et al.*, 2016; Geng *et al.*, 2021; Han; Roman, 2006; Pankov; Yamada, 2002; Spada *et al.*, 2021; Xu; Boudreau; Bissell, 2009).

As quimiocinas são um grande grupo de proteínas que possuem como função primária a regulação da migração de populações celulares alvos. Funcionalmente as quimiocinas são classificadas em quimiocinas inflamatórias, das quais são de natureza indutível e as quimiocinas homeostáticas de expressão constitutiva. A CXCL12 é uma quimiocina

importante na homeostase e, portanto, é continuamente produzida por diferentes tipos de células. Essa quimiocina demonstrou ser indispensável para processos como embriogênese e hematopoiese, no entanto, o aumento de expressão foi associado a processos como inflamação, reparo, angiogênese e a presença tumoral. A CXCL12 apresenta variantes humanas obtidas por meios de splicing alternativos. Essas variantes apresentam distintas distribuição, funcionalidade e temporalidade específicas, podendo alterar sua expressão inclusive em etapas de desenvolvimento embrionário ao adulto, ou em patologias.(Bachelierie *et al.*, 2014; Janssens; Struyf; Proost, 2018; Zlotnik; Yoshie, 2000).

Foi demonstrado que o estado de hipóxia está associado ao aumento na expressão de CXCL12, que por sua vez é necessário para processo de angiogênese e cicatrização tecidual. O aumento de expressão de CXCL12 em condição de hipóxia desencadeia processos de sinalização pelas células endoteliais, resultando em maior recrutamento de células progenitoras. Não raro, o estado de hipóxia é encontrado em tumores sólidos, que podem levar ao aumento na expressão de CXCL12, conseqüentemente o desencadeamento de angiogênese, como foi demonstrado em câncer de ovário. Por outro lado, foi demonstrado que a baixa expressão de CXCL12 em células tronco mesenquimais associadas ao tumor, mediado por fator de crescimento β (TGF- β), promovem metástase de câncer mamário (Ceradini *et al.*, 2004; De Falco *et al.*, 2004; Janssens; Struyf; Proost, 2018; Kryczek *et al.*, 2005; Santiago *et al.*, 2011).

5.7.3. Receptores comuns - células-tronco e progenitoras hematopoiéticas

Em relação aos receptores presente nas células tronco e progenitoras hematopoiéticas que mais apresentaram potenciais interações com os ligantes presente nas células epiteliais dos subtipos de câncer de mama, podemos destacar: **ITGA4, CD44, CD74, MYLK, CD99, INSR e CXCR4.**

Integrinas são moléculas de adesão que desempenham papel crucial nas interações célula-célula e célula-matriz extracelular, além de desempenharem função nos processos de vias de sinalização, inflamação, neovascularização, invasão e metástase (Arnaout; Goodman; Xiong, 2007; Huttenlocher; Horwitz, 2011; McIntyre *et al.*, 2003). Quando associado a hematopoiese, estudos sugerem que ITGA4 deve ter um importante papel no processo “educacional” de HSCs ainda em estágios fetais (Qian *et al.*, 2007). Ademais, no microambiente tumoral, ITGA4 pode estar relacionado ao processo de infiltração de

macrófagos (Fang *et al.*, 2022). Esse receptor apresentou potencial interação com os ligantes ARF1, HMGB1, MIF e RPSI9.

CD74 é um receptor de membrana inicialmente identificado em células do sistema imunológico, porém, também encontrado em diversos tumores. Este receptor está associado a funções como migração e sinalização celular (Ssadh; Abdulmonem, 2019). Já o CD44 é uma molécula de adesão celular, marcador de células tronco e células tronco cancerígenas, desempenhando um importante papel em interações com a matriz celular, como o ácido hialurônico e osteopontina, moléculas das quais podem atuar como fatores de crescimento, e bastante abundante em vários tumores sólidos, onde contribuem para manutenção e autorrenovação de células malignas (McFarlane *et al.*, 2015; Morath; Hartmann; Orian-Rousseau, 2016). O receptor CD44 apresentou interação potencial com os ligantes ARF1, CARL e RTN4, já o CD74, teve interação potencial com o ligante MIF.

O MYLK é um membro da superfamília de genes de imunoglobulinas que codifica o MYLK (Teng *et al.*, 2020). Estudos têm mostrado que o MYLK está relacionado com a proliferação, invasividade e metástase do câncer de bexiga (BC) através da via de sinalização regulada por sinais extracelulares cinase (ERK1/2) e via P38 (Luo; Xiang, 2021; Teng *et al.*, 2020). Funcionalmente, descobriu-se que a expressão ectópica de circRNA-MYLK acelerou a proliferação celular de células endoteliais da veia umbilical humana, migração, formação de tubo e rearranjo do citoesqueleto (Jin *et al.*, 2023). O receptor MYLK apresentou potencial de interação com os ligantes ARF, CALM2 e CARL.

O gene CD99 codifica uma proteína transmembranar que está envolvida na diferenciação celular, adesão, migração e tráfego de proteínas. O CD99 é expresso de forma diferencial na superfície das células hematopoéticas nas linhagens mieloides e linfocíticas (Ali; Vaikari; Alachkar, 2022). No entanto, também foi demonstrado que a desregulação de CD99 está presente em vários tipos de câncer, incluindo malignidades hematológicas (Ali; Vaikari; Alachkar, 2022). Outros estudos também relataram diferentes papéis para o CD99 no câncer de mama (Baccar *et al.*, 2013; Byun *et al.*, 2006). Neste trabalho, o receptor CD99 potencialmente se ligaria ao próprio receptor CD99 de outras células e no ligante RTN4.

O receptor de insulina (INSR) é uma proteína dímica que desempenha papéis importantes no controle da homeostase da glicose, regulando o metabolismo de lipídios,

proteínas e carboidratos. Porém, disfunções no INSR têm sido relatadas em vários carcinomas humanos, como os de cólon, pulmão, ovário, tireoide e mama, possivelmente como um preditor de baixa sobrevivência (Huang *et al.*, 2020). O INSR pode ser ativado pela insulina ou pelo fator de crescimento semelhante à insulina II, que desempenha um papel fundamental na regulação do crescimento e do metabolismo, bem como na iniciação e manutenção de tumores de mama (Yang; Chen; Ma, 2020).

O receptor quimiotático tipo 4 (CXCR4) desempenha um papel fundamental na regulação, migração e retenção de células hematopoiéticas e do sistema imunológico. Quando associado ao seu ligante CXCL12, que é abundantemente expresso em células estromais no microambiente hematopoiético, o CXCR4 promove a retenção celular e o processo de homing. Além disso, as células-tronco, que apresenta o receptor CXCR4 em sua superfície de membrana, são direcionadas para tecidos que expressam o ligante CXCL12, principalmente em situações de injúria tecidual. Nesse contexto, atuam como recrutadoras nos locais danificados, promovendo a migração celular, sua subsequente diferenciação e, por fim, o processo de reparo tecidual. Ademais, a interação entre linfócitos que expressam CXCR4 com o ligante CXCL12 (SDF-1) induz proliferação de células B e recrutamento de células T (Döring *et al.*, 2014; Imitola *et al.*, 2004; Kawaguchi; Zhang; Nakanishi, 2019; Nagasawa *et al.*, 1996; Pawig *et al.*, 2015; Zou *et al.*, 1998).

5.7.4. Interações sistêmicas preditas com potencial de alterar a hematopoiese

Com base na literatura e em nossas análises, identificamos interações potencialmente significativas entre células epiteliais cancerígenas e CAFs com células-tronco e progenitoras hematopoiéticas, originárias de tumores mamários e medula óssea, respectivamente. Porém, dentre as interações consideradas, foram excluídas aquelas associadas à matriz celular, como os genes FN1 e COL1A1 (fibronectina 1 e colágeno tipo I alfa 1, respectivamente), uma vez que nosso foco está nas interações em ligantes e receptores com potencial de comunicação celular sistêmica mais relevante, embora reconheçamos que alterações na matriz celular são cruciais para a reorganização e progressão tumoral. Também foram excluídas interações envolvendo os ligantes RPS19 e RTN4, cuja localização em células íntegras é nuclear ou intracelular, e, portanto, não são secretadas ativamente para o meio extracelular.

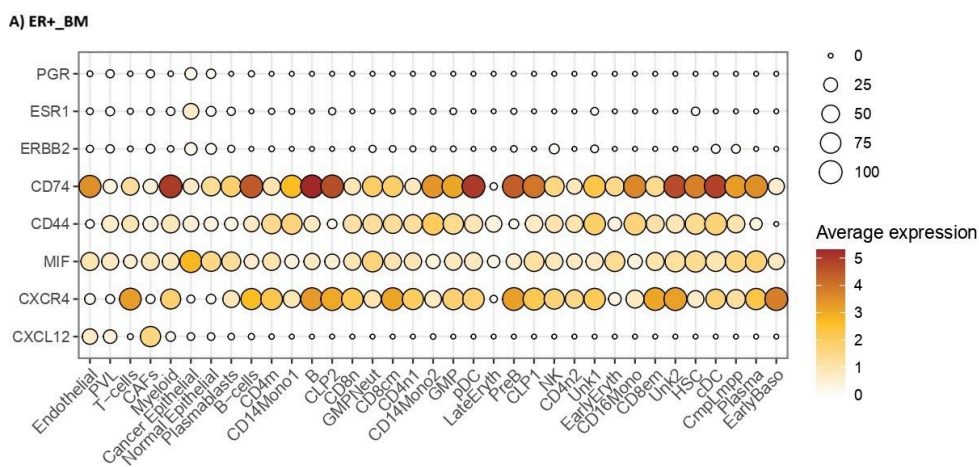
Através das informações apresentadas, duas interações foram consideradas destacáveis, tanto por estarem presente em nossas análises, quanto por informações

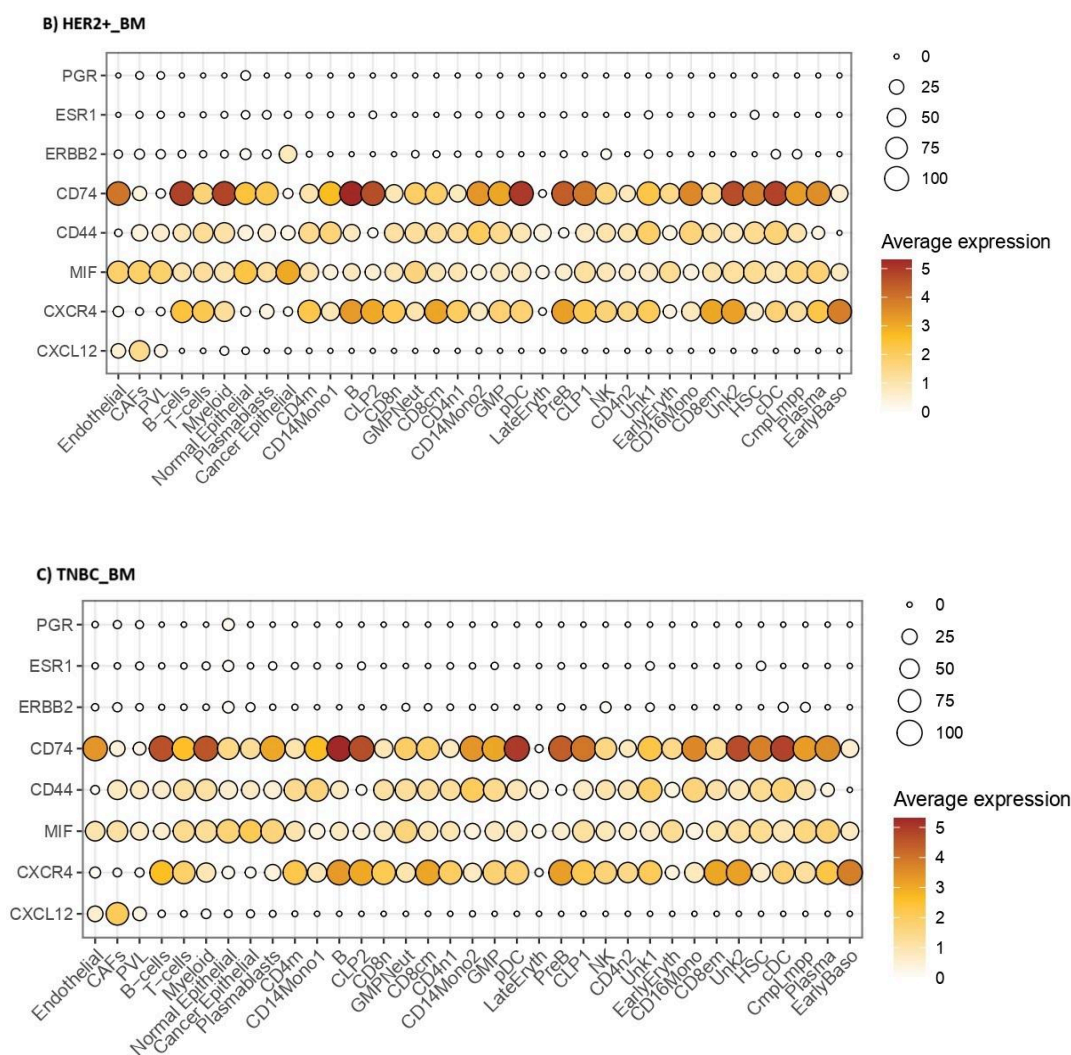
encontradas na literatura da área. A interação MIF_CD74/CD44, que ocorre tanto nas interações com células epiteliais cancerígenas quanto com CAFs, é uma interação entre um ligante associado a migração e comunicação celular, podendo ser secretado em meio extracelular, sendo seus receptores presente em diversas células em ambos microambientes (Bloom; Sun; Al-Abed, 2016; Jankauskas *et al.*, 2019).

Além disso, a interação entre CXCL12_CXCR4 entre as células CAFs e as células-tronco e progenitoras hematopoiéticas da medula óssea pode ter potencial de influência nos processos biológicos entre microambientes distantes. A interação entre a quimiocina CXCL12 com o receptor CXCR4, é vastamente explorada, seja associada ao sistema imunológico, processo hematopoiético ou condições como inflamações, infecções e câncer. Essas interações têm o potencial de desencadear alterações sistêmicas significativas entre o eixo do tumor mamário e a hematopoiese na medula óssea (Kawaguchi; Zhang; Nakanishi, 2019; Mortezaee, 2020).

É possível visualizar a expressão dos genes destacados nas duas principais interações MIF_CD74/CD44 e CXCL12_CXCR4, além de confirmar a expressão ou ausência dos marcadores de cada subtipo tumoral, ESR1 = receptor de estrogênio, PGR = receptor de progesterona e ERBB2 = humano do fator de crescimento epidérmico tipo 2 (HER2) por grupo celular em ambos os microambientes; tumoral e hematopoiético (Figura 16).

Figura 16. Expressão gênica por grupo celular.





Legenda: Expressão gênica dos marcadores específicos nos conjuntos de dados referente aos três subtipos de câncer de mama e os genes destacados nas interações sistêmica. A) ER+_BM, B) HER2+_BM e C) TNBC+_BM. O tamanho da circunferência do círculo representa a expressão percentual de cada gene; enquanto a coloração indica a intensidade de expressão dos genes em cada grupo celular

5.7.4.1. MIF_CD74 e CD44

O fator de inibição da migração de macrófagos (MIF) MIF é uma citocina expressa em vários tipos de células, incluindo células hematopoéticas, epiteliais, endoteliais, mesenquimais e neurais (Jankauskas *et al.*, 2019). Apesar de ser expressa constitutivamente em microambientes saudáveis, o aumento de sua expressão em ambientes tumorais frequentemente está associado a um pior prognóstico (Lee *et al.*, 2021; Mora Barthelmeß; Stijlemans; Van Ginderachter, 2023; Song *et al.*, 2022).

Além dos polimorfismos em nível genético, podem existir também distintas variantes pós-traducionais de MIF, chamadas de MIF oxidado e MIF reduzido (oxMIF e redMIF, respectivamente), dependentes do estado redox do microambiente. Mora Barthelmess e colaboradores (2023) levantaram a hipótese de que as variantes de MIF poderiam acarretar em diferentes afinidades e ativações diferenciais do receptor CD74, alterando de forma distinta as vias de sinalização biológicas (Mora Barthelmess; Stijlemans; Van Ginderachter, 2023). Apesar de ainda carecerem de estudos sobre as implicações da atuação das distintas formas deste ligante, redMIF foi encontrada de forma diferencial em plasma de indivíduos saudáveis, enquanto oxMIF apresentou maior presença em plasma de pacientes com doenças altamente inflamatórias, em tecidos tumorais e metástase (Thiele *et al.*, 2015).

MIF foi expresso em todos os grupos celulares analisados, incluindo os subtipos de câncer de mama e as células da medula óssea, com expressão significativamente menor em eritrócitos maduros. Conforme descrito na literatura, este gene pode ser expresso de forma constitutiva em tecidos saudáveis e na presença de tumores, no entanto, na medula óssea, os eritrócitos maduros não apresentaram expressão evidente. Os eritrócitos maduros, por sua peculiaridade de não possuírem mais núcleo, interrompem a expressão gênica, embora possa haver vestígios de RNA mensageiro residual nessas células durante estágios finais de maturação, antes de alcançarem a corrente sanguínea. Assim, expressão pouco evidente de MIF neste grupo celular pode estar relacionada à sua incapacidade de sintetizar novos RNA mensageiros e à redução do RNA mensageiro correspondente ao MIF em estágios anteriores da eritropoiese (Fader; Colombo, 2006; Merryweather-Clarke *et al.*, 2011).

MIF é capaz de interagir com receptores de quimiocinas como CXCR2, CXCR4 e CXCR7, presente em diferentes tipos de células (monócitos, neutrófilos, células dendríticas, células B, células cancerígenas além de células-tronco e progenitoras hematopoiéticas, promovendo assim, migração celular (Singh; Mohammad; Pelus, 2020; Tarnowski *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2017). No entanto seu principal receptor é o CD74, proteína de membrana expressa por diversos tipos celulares (Becker-Herman *et al.*, 2021). Embora inicialmente tenha sido descrita como um coadjuvante intracelular da classe II do MHC, uma pequena proporção de CD74 é modificada e ancorada na superfície celular, onde é passível de interagir com a citocina MIF (Leng *et al.*, 2003; Stumptner-Cuvelette; Benaroch, 2002).

O receptor CD74, desprovido de regiões intracelulares fosforiláveis essenciais para a transdução de sinais, requer um co-receptor, o CD44, um receptor transmembranar. Juntos, eles formam um complexo que pode ser ativado por quinases reguladas por sinais

extracelulares (Mora Barthelmess; Stijlemans; Van Ginderachter, 2023). O receptor CD74 é expresso em células-tronco e progenitoras hematopoiéticas, porém a funcionalidade mediante ao processo de hematopoiese permanece pouco estudada. Becker-Herman e colaboradores (2021) demonstraram que camundongos deficientes em CD74 apresentavam acúmulo de HSC na medula óssea. Em experimentos *in vitro*, o bloqueio de CD74 elevou o número de células-tronco e progenitoras hematopoiéticas, sugerindo assim que o CD74 desempenha um importante papel regulador na manutenção e sobrevivência das HSCs na medula óssea (Becker-Herman *et al.*, 2021).

No ambiente tumoral, o CD74 foi comumente expresso pelas células endoteliais, células B e mieloides, seguido por plasmoblastos. Nos subtipos ER e HER2, o CD74 foi menos expresso no câncer epitelial em comparação com as células epiteliais normais, sendo a expressão semelhante no TNBC. No entanto, tratando-se de ligantes no microambiente da medula óssea, o receptor foi expresso pela maioria dos grupos celulares, com destaque para células B, pré-B, CLP 1 e 2, células dendríticas e monócitos 16 e 14, além das células-tronco hematopoiéticas. Houve ausência de expressão em eritrócitos maduros. Quanto ao CD44, também foi expresso por quase todos os grupos da medula óssea, mas com expressão discreta ou ausente nos grupos celulares CLP2, pré-B e plasmoblastos, bem como nos grupos celulares de basófilos e eritrócitos em estágios imaturos.

No contexto do câncer, o MIF está correlacionado com a disseminação metastática e a progressão tumoral (Sumaiya *et al.*, 2022). Richard *et al.* sugeriram que a interação entre MIF e CD74 está associada ao prognóstico do câncer de mama (Richard *et al.*, 2014). Em outro estudo, foi demonstrado que a co-expressão dos receptores CD74 e CD44 no câncer de mama, ambos podendo ser modulados pelo ligante MIF, está associada à invasão e progressão tumoral (Liu *et al.*, 2016).

Estudos demonstraram que CD44 é expressos em células tumorais circulantes (CTCs) iniciadoras de metástase e aglomerados de CTCs em câncer de mama, promovendo tumorigênese e disseminação metastática (Koch *et al.*, 2020; Ssadh; Abdulmonem, 2019). Além disso, CD44 e CD74 desempenham funções cooperativas importantes. A plasticidade na expressão de CD44 e CD74 durante o tráfego de CTCs na circulação pode ser resultado de estratégias adaptativas (Loreth *et al.*, 2021). Além disto, a interação com o ligante MIF, desempenha um papel crucial na sinalização celular, formando um complexo com CD74/CD44, o que leva à ativação sustentada da via MAPK ERK1/2 e subsequente liberação

de citocinas pró-inflamatórias e proliferação celular. Além disso, ativa vias que inibem a apoptose, como a ativação da via Akt e a estabilização do HIF-1 α (O'Reilly *et al.*, 2016).

O microambiente tumoral é um ambiente hostil no qual são detectados altos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), possivelmente como consequência de alterações metabólicas, disfunção mitocondrial, aumento da atividade peroxissomal e enzimática no TME, juntamente com o estado de hipóxia (Kapara; Vannini; Peck, 2020; Mortezaee, 2021).

Em vista do exposto, é plausível sugerir que o microambiente tumoral pode influenciar a produção de formas distintas e alteradas de MIF, como oxMIF, que foi previamente observada em maior proporção no plasma de pacientes com estados inflamatórios ou tumores, conforme descrito por Thiele *et al.* (2015). Essa isoforma assim como o aumento de MIF sem alteração pode ser transportada pelo plasma até o microambiente da medula óssea, aumentando assim sua presença em um ambiente hematopoético saudável. O aumento ou acúmulo de oxMIF e outras formas distintas de MIF/oxMIF podem ativar vias relacionadas aos receptores CD74/CD44, levando ao comprometimento de células-tronco quiescentes e potencialmente perturbando os processos hematopoiéticos. Além disso, os estudos de Becker-Herman *et al.* (2021) destacaram a influência do receptor CD74 nesses processos.

O aumento na ativação de CD74/CD44 poderia desencadear vias de sinalização que afetam a diferenciação celular, limitando a permanência de células células-tronco e progenitoras hematopoiéticas em estados não comprometidos com linhagens celulares específicas. Além da via MIF-CD74/CD44, essa ativação aumentada também poderia promover a migração de células em estágios imaturos para a circulação, permitindo que essas células alcancem outros microambientes, o que poderia contribuir para a formação de metástases. No entanto, é importante ressaltar que essa hipótese complexa precisa ser testada experimentalmente para validação, viabilizar mensuração de quantidade e da estabilidade do ligante MIF durante sua passagem pelo sistema circulatório, além de certificar por meio de hibridização *in situ* ou marcação proteica a fim de averiguar o alcance e ativação de processo biológicos na medula óssea de ligantes produzidos no ambiente tumoral.

5.7.4.2. CXCL12_CXCR4

O desenvolvimento e a diferenciação dos precursores das células do sistema imunológico ocorrem principalmente na medula óssea, sendo regulados por quimiocinas

(Griffith; Sokol; Luster, 2014). A manutenção do processo hematopoiético, que envolve a retenção das células-tronco e progenitoras hematopoiéticas e células imunológicas imaturas e maduras na medula óssea, é crucial para a homeostase do organismo, especialmente para a reposição celular, tanto no sistema imunológico quanto no sanguíneo, em condições saudáveis e durante doenças, onde ocorre maior mobilização periférica (Comazzetto; Shen; Morrison, 2021).

Os processos de desenvolvimento hematopoiético e retenção de células imunes na medula óssea parecem ser amplamente dependentes das interações CXCL12/CXCR4 (Griffith; Sokol; Luster, 2014). Células reticuladas da medula óssea produzem CXCL12 que por sua vez se ligam aos receptores de CXCR4 nas células HSC, estabelecendo um gradiente que indiretamente retém as populações de HSC dentro da medula óssea (Ara *et al.*, 2003).

Além das HSC, as interações entre CXCL12 e CXCR4 são necessárias para o desenvolvimento normal de múltiplas linhagens de células imunológicas, tanto células mieloides quanto linfoides (Mercier; Ragu; Scadden, 2011). Essas interações promovem a retenção dentro da medula óssea tanto de células em desenvolvimento quanto células maduras (Karpova; Bonig, 2015). A diminuição normal de expressão de CXCR4 ou o uso de antagonista, promoveram maior migração de células imunes para periferia, confirmando o importante papel do CXCR4 na retenção na medula óssea, no entanto, outros componentes e receptores também podem estar envolvidos (Broxmeyer *et al.*, 2005; Gulino *et al.*, 2004; Hernandez *et al.*, 2003; Suratt *et al.*, 2004). Ademais, muitas perturbações da hematopoiese em modelos genéticos ou farmacológicos envolvem modulações na interação CXCL12/CXCR4, associando o fato do ligante CXCL12 ser um potente quimiotático para todos os subconjuntos de leucócitos maduros, bem como para HSCPs (Karpova; Bonig, 2015).

As quimiocinas controlam o movimento celular tanto durante a homeostase quanto na inflamação, e as células que expressam receptores específicos migram ao longo dos gradientes de quimiocinas (Zlotnik; Burkhardt; Homey, 2011). No câncer, as quimiocinas juntamente com seus receptores afetam a progressão tumoral, invasão celular, interações com a matriz extracelular, taxa de sobrevivências dentre outros mecanismos tumorais (Ali; Lazennec, 2007; Lazennec; Richmond, 2010; Mollica Poeta *et al.*, 2019).

Como citado anteriormente, a quimiocina CXCL12 apresenta variantes humanas obtidas por meios de splicing alternativos. Essas variantes apresentam distintas distribuição,

funcionalidade e temporalidade específicas, podendo alterar sua expressão inclusive em etapas de desenvolvimento embrionário ao adulto, ou em patologias (Bachelierie *et al.*, 2014; Janssens; Struyf; Proost, 2018; Zlotnik; Yoshie, 2000).

Citocinas estão intrinsecamente associadas ao processo inflamatório e podem apresentar diferentes funcionalidades em decorrência à progressão tumoral (Greten; Grivennikov, 2019; Singh *et al.*, 2019; Zielińska; Katanaev, 2020) (Xu *et al.*, 2023). A resposta inflamatória recruta células imunes durante a tumorigênese, que podem ter resposta eficiente frente a tumores primários e metastáticos. Por outro lado frente a tumorigênese, a resposta inflamatória desempenha um papel crucial na progressão tumoral, inibindo respostas antitumoral, além de favorecer processos como instabilidade genômica, modificações epigenética, angiogênese, proliferação celular e invasão (Greten; Grivennikov, 2019; Singh *et al.*, 2019; Zielińska; Katanaev, 2020). Ademais, o aumento de células derivadas da medula óssea na presença tumoral é relatada pela literatura (Chantrain *et al.*, 2008)

Nos estágios iniciais da tumorigênese, o microambiente exibe dinâmicas que predominantemente suprimem o desenvolvimento tumoral. No entanto, devido à heterogeneidade, seletividade e aumento das alterações no microambiente tumoral, o tumor "sequestra" os mecanismos dentro do nicho tumoral, promovendo assim a progressão da doença (Harbeck *et al.*, 2019; Zielińska; Katanaev, 2020).

O CXCL12 é liberado por diversas células no microambiente tumoral, principalmente por células estromais e por subconjuntos de fibroblastos imunossupressores. Este ligante atrai tanto células do sistema imune inato quanto adaptativo para o tumor, podendo influenciar sua progressão (Costa *et al.*, 2018; Greten; Grivennikov, 2019; Susek *et al.*, 2018). Em câncer de mama TNBC, o subconjunto de CAFs induziu maior recrutamento de células T reg imunossupressoras por meio de secreção de CXCL12 e redução de células T CD8+ (Costa *et al.*, 2018).

Em nossas análises o ligante CXCL12 foi expresso exclusivamente no microambiente tumoral dos três subtipos, com maior expressão desse ligante por células CAFs e menor expressão por células endoteliais e PVL. A presença de CXCL12 no microambiente tumoral pode estar associada ao processo de recrutamento de células imunológicas e à inflamação associada ao câncer. É interessante notar que o receptor CXCR4 foi expresso por diversos grupos celulares, tanto no microambiente tumoral quanto na medula óssea saudável. No entanto, nas células que expressaram CXCL12, houve ausência de expressão de CXCR4, além

da ausência de expressão deste receptor em eritrócitos (devido a sua especificidade já citada). Além disso, os grupos celulares não imunológicos, com exceção dos plasmócitos, como células epiteliais, endoteliais, PVL e fibroblastos, não apresentaram expressão de CXCR4. Esse padrão de expressão sugere que a interação CXCL12/CXCR4 não é utilizada entre células residentes e pertencentes à estrutura do tecido. Além disso, a ausência de expressão de CXCR4 quando CXCL12 está presente no mesmo grupo celular indica que essa interação também não ocorreu de forma autócrina em nossas análises.

Tendo em vista que as células imunológicas, tanto no microambiente tumoral quanto na medula óssea saudável, expressam o receptor CXCR4 e com base na literatura, esse receptor com o ligante CXCL12 é uma das principais interações entre células residentes e células do sistema imunológico com potencial de migração. No entanto, é descrito na literatura a expressão de CXCL12 por células estruturais do microambiente da medula óssea, sendo a interação CXCL12/CXCR4 importante na retenção das células com potencial de migração na medula óssea. Quando ocorre a diminuição da expressão de CXCR4, essas células podem adentrar a circulação ou estar envolvidas em processos não homeostáticos, como por exemplo a expressão de CXCL12 em microambientes fora da medula óssea, criando um gradiente quimiotático que recrutaria células imunológicas para o local de emissão do ligante.

Considerando as informações apresentadas, é plausível sugerir que as interações entre CXCL12/CXCR4 desempenham um papel crucial tanto no microambiente hematopoiético quanto no microambiente tumoral. É relevante observar que alterações sistêmicas podem ser moduladas à distância, resultando em mecanismos simultâneos na presença de tumores. Inicialmente, a expressão de CXCL12 devido à presença do câncer de mama e ao processo inflamatório associado, tenderia a recrutar células imunológicas, que, quando não eficientes, poderiam intensificar os processos tumorais.

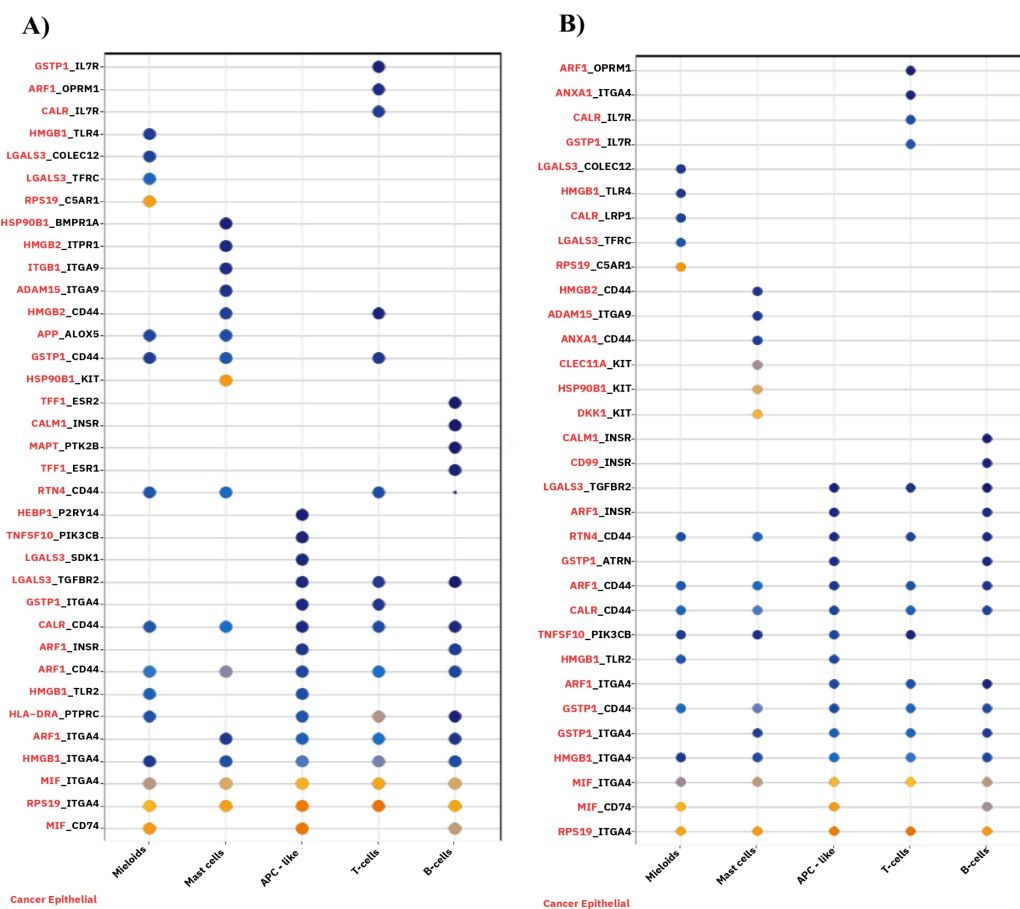
O aumento significativo de CXCL12 no ambiente extracelular e periférico durante processos inflamatórios crônicos, como observado no câncer, poderia agir como um gradiente cada vez mais predominante para as células que expressam o receptor CXCR4 presentes na medula óssea. À medida que a progressão tumoral avança, os sinais quimiotáticos presentes no tumor e a nível sistêmico poderiam superar os estímulos de CXCL12/CXCR4 presentes na medula óssea, intimamente ligados à retenção de células hematopoiéticas. Essa competição de estímulos poderia progressivamente alterar a hematopoiese, resultando na evasão da medula óssea por células não diferenciadas, em desenvolvimento ou imunossupressoras, que

podariam migrar não apenas para o tumor primário, mas também para microambientes distintos e processos metastáticos. Além disso, o ambiente estressante do microambiente tumoral poderia levar à modificação da expressão ou processos pós-transcricionais de isoformas de CXCL12, possivelmente desempenhando papéis distintos dos processos biológicos normais.

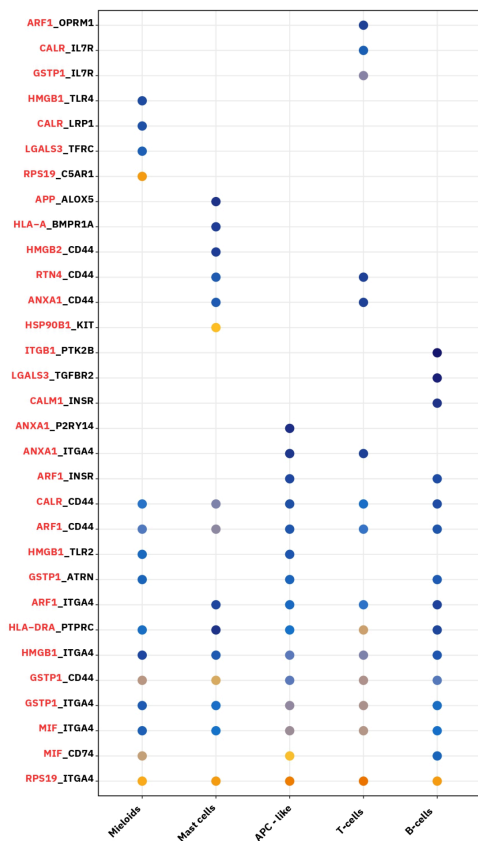
5.7.5. Pulmão

Para as análises entre os subtipos tumorais e o microambiente pulmonar foi feita a relação de interação entre as células cancerígenas do microambiente mamário e as células do microambiente pulmonar (Figura 17).

Figura 17. Interações priorizadas : Células cancerígenas com as células do microambiente pulmonar.

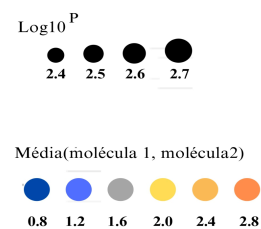


C)

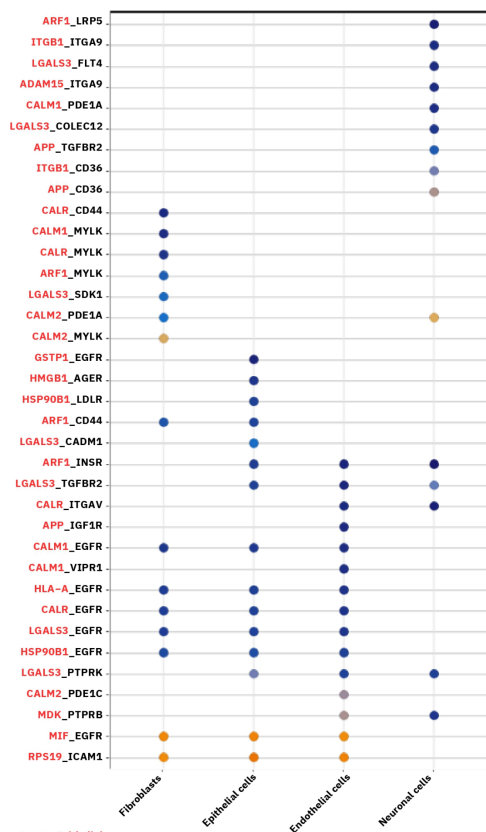


Cancer Epithelial

- Célula emissora
- Célula receptora

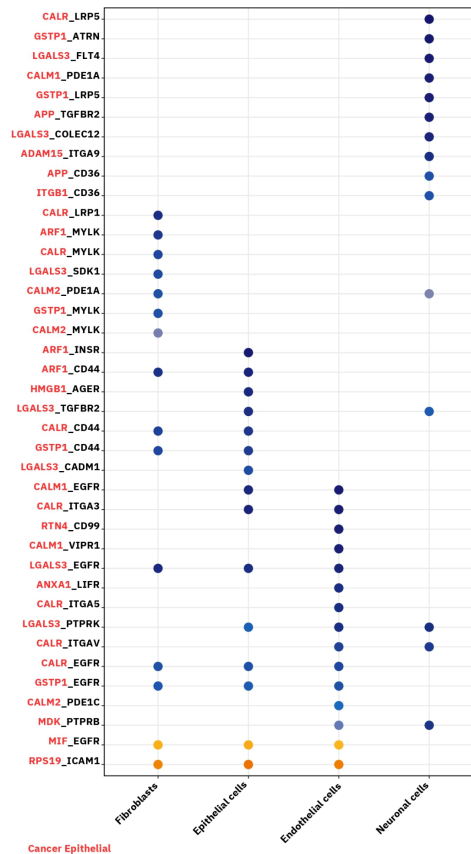


D)

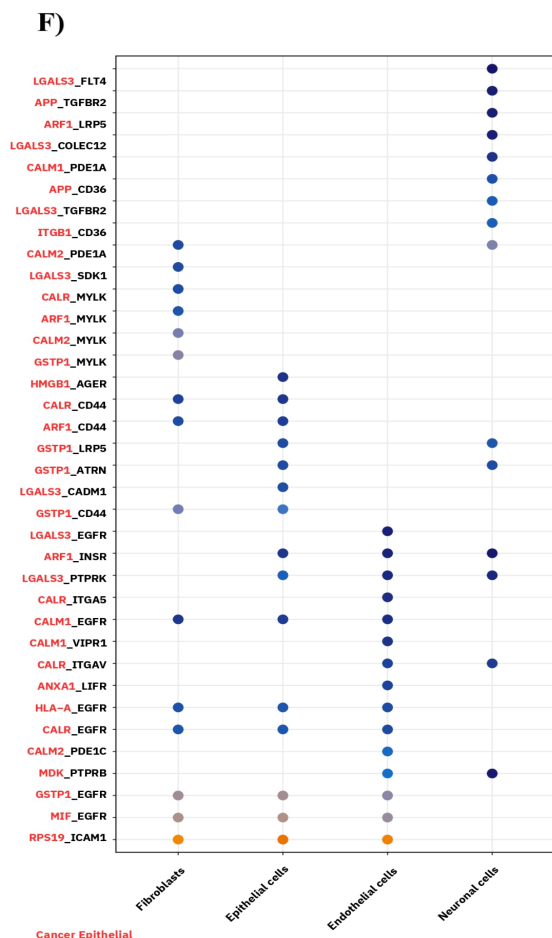


Cancer Epithelial

E)



Cancer Epithelial



Legenda: Interações priorizadas entre células epiteliais cancerígenas (células emissoras) do microambiente tumoral com as células do microambiente pulmonar (células receptoras): **A) e D)** ER+_BM, **B) e E)** HER2+_BM e **C) e F)** TNBC_BM.

5.7.5.1. Ligantes células cancerígenas

Dentre os ligantes comuns mais frequentes estão ARF1, HMGB1, MIF, CARL, RPS19, CALM, LGALS3 e GSTP1. Com exceção do GSTP1, todos os ligantes também foram priorizados nas interações entre células cancerígenas e o microambiente pulmonar assim como nas interações com a medula óssea, no entanto, alguns ligantes foram priorizados em interação com receptores distintos. Era esperado que os ligantes mais destacáveis provenientes dos mesmos dados de tumor mamário fossem semelhantes independente do microambiente. Pois, demonstra que grande parte das alterações locais e sistêmicas mediadas pelo tumor, são antes de tudo provenientes de interações já existentes, como citado por Dvorak “*tumores não utilizam novos mecanismos para interagir com os componentes do hospedeiro, mas empregam programas fisiológicos pré-existentes*”(Dvorak, 1986). Portanto,

a descrição dos ligantes priorizados em ambiente tumoral não será novamente desenvolvido, apenas o ligante GSTP1, não evidenciado em interações anteriormente mencionadas, foi individualmente descrito abaixo.

Glutathione S-transferase Pi (GSTP1), é uma isoenzima que desempenha um importante papel regulatório na desintoxicação, proteção contra danos oxidativos, sinalização celular e carcinogênese. GSTP1 também está envolvida na progressão de vários cânceres, desempenhando importante papel no metabolismo, desintoxicação e eliminação de potenciais genotóxicos, além de estar associado a resistência à apoptose e no metabolismo de diversos quimioterápicos. Esse gene é altamente expresso em vários tipos de câncer, incluindo o mamário e lesões pré-neoplásicas. Diferentes isoformas, resultados de metilações podem estar associados a tumores mamários mais agressivos (Cui *et al.*, 2020; Lee, 2007; Moyer *et al.*, 2008; Pljesa-Ercegovac *et al.*, 2018; Sau *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2019; Sunami *et al.*, 2008).

5.7.5.2. Receptores microambiente pulmonar

Em relação aos receptores mais frequentes e comuns no ambiente pulmonar quando em interação potencial com as células cancerígenas foram: ITGA4, CD44, CD74 nas interações com as células imunológicas e EGFR, CD44, ICAM1 em interações com células não imunológicas. Os receptores por sua vez serão descritos quando a sua função no ambiente pulmonar divergir das funcionalidades biológicas presentes na medula óssea.

Além de desempenhar funções biológicas em processos saudáveis, como interações célula-célula e célula-matriz extracelular, integrinas também apresentam associação com processos como inflamação, neovascularização, invasão e metástase (Arnaout; Goodman; Xiong, 2007; Huttenlocher; Horwitz, 2011; McIntyre *et al.*, 2003).

Em câncer de pulmão, a expressão de ITGA4 apresentou superexpressão em tumores primários com capacidade metastática, assim como em tumores secundários correspondentes (Shie *et al.*, 2023). ITGA4 também está implicada no aumento da tumorigenicidade e estabilização de aglomerados celulares (Xie *et al.*, 2020). Em outro estudo, foi descoberto aumento da expressão de ITGA4 nas proximidades das estruturas que mimetizam vasos (mimetismo vasculogênico), associando ITGA4 e sinalização mediada por Ca²⁺ com a formação dessas estruturas pseudo vasculares (Vartanian *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2020). Esse processo de mimetismo vasculogênico otimiza o estabelecimento de metástases, pois

desenvolve ou intensifica o aporte de nutrientes para novas colônias tumorais (Fu *et al.*, 2021; He *et al.*, 2021).

O Receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR), também conhecido como ErB1/HER1 é uma tirosina quinase. EGFR está associado a diversos processos como proliferação celular, inibidor de apoptose, angiogênese, motilidade celular e adesão, sendo assim muitas vezes considerado um pró-oncogênico. A família de genes ErbB humanos inclui EGFR/ERBB1/HER1, NEU/ERBB2/HER2, ERBB3/HER3 e ERBB4/HER4/EGFR. EGFR é uma proteína transmembranar, com um porção extracelular, sendo capaz de formar homodímeros ou heterodímeros dentro desta família de receptores (Cohen, 2004; Lemmon; Schlessinger, 2010; Pines; Köstler; Yarden, 2010). O ERBB2 não contém um domínio de ligação e nenhum ligante direto foi identificado, ligando com membros da própria família e capaz de estimular a expressão do próprio mRNA mediada por ETF (fator de transcrição específico do EGFR) (Graus-Porta *et al.*, 1997; Holbro *et al.*, 2003; Tzahar *et al.*, 1996).

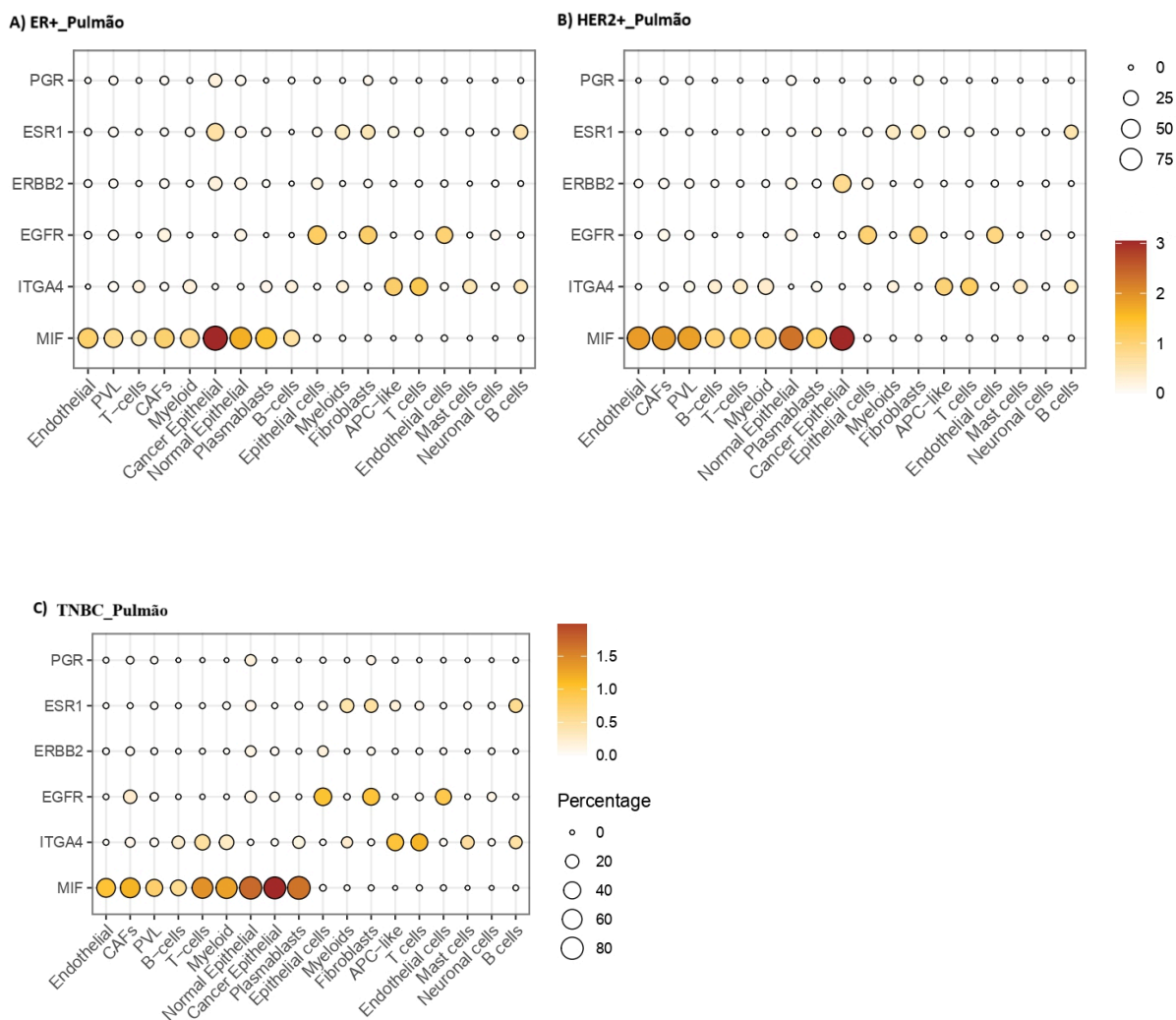
ICAM-1 é um membro da família de supergenes Ig, possui um domínio transmembrana e uma cauda citoplasmática curta com múltiplos resíduos de treonina (Staunton *et al.*, 1988). ICAM1 é expresso em leucócitos, células endoteliais, fibroblastos, células epiteliais, dentre outros. Porém em condições não inflamatórias, a expressão deste receptor permanece constitutivamente baixa (Lee and Benveniste 1999; Hubbard and Rothlein 2000; Koning *et al.* 2002; Tailor *et al.* 2005). ICAM-1 desempenha um papel importante no tráfico de leucócitos, na formação de interações imunológicas e em numerosas respostas imunes celulares (Ramos; Bullard; Barnum, 2014). Além de desempenhar importante papel em quadros inflamatórios, reparo de injúrias teciduais e tumorigenesis (Bui; Wiesolek; Sumagin, 2020).

5.7.5.3. Interações pulmonares

As interações mais notáveis entre as células cancerígenas do tumor mamário e as células imunológicas do microambiente pulmonar incluíam ARF1_CD44, CALR_CD44, HMGB1_ITGA4, MIF_ITGA4 e RPS19_ITGA4. Em relação às células pulmonares não imunológicas, as interações mais prevalentes foram CALR_EGFR, MIF_EGFR e RPS19_ICAM1, encontradas em todos os subtipos de tumor mamário. Embora não haja evidências diretas de interações entre **MIF_ITGA4** e **MIF_EGFR** na literatura, a análise teórica dessas interações foi realizada devido às funções biológicas conhecidas dos

componentes envolvidos nessas interações, como o ligante MIF e os receptores ITGA4 e EGFR (Figura 18).

Figura 18. Expressão gênica por grupo celular.



Legenda: Expressão gênica dos marcadores específicos nos conjuntos de dados referente aos três subtipos de câncer de mama e os genes destacados nas interações sistêmica.. A) ER+_Pulmão, B) HER2+_Pulmão e C) TNBC+_Pulmão. O tamanho da circunferência do círculo representa a expressão percentual de cada gene; enquanto a coloração indica a intensidade de expressão dos genes em cada grupo celular

5.7.5.4. MIF_ITGA4 e MIF_EGFR

No contexto da predição das interações entre o tumor primário de origem mamária e o microambiente pulmonar, observou-se a expressão de MIF exclusivamente nos grupos celulares do microambiente tumoral. Embora os potenciais receptores ITGA4 e EGFR estejam expressos em ambos os microambientes, sua expressão foi mais significativa no microambiente pulmonar. A integrina ITGA4 demonstrou maior expressão em células APC-like e células T, seguido de mastócitos, células B e mielóides. Distintamente, o fator de crescimento epidérmico, EGFR, foi expresso por células não imunológicas, como células epiteliais, fibroblastos e endoteliais.

Conforme mencionado anteriormente e documentado na literatura, o ligante MIF é capaz de se ligar aos receptores de quimiocinas CXCR2, CXCR4 e CXCR7, os quais estão presentes em uma variedade de tipos celulares (Singh; Mohammad; Pelus, 2020; Tarnowski *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2017). Entretanto, nossos achados sugerem que o MIF tem o potencial de interagir de forma preditiva com o EGFR, conhecido por seu envolvimento na proliferação celular, motilidade, angiogênese e inibição da apoptose. Além disso, o MIF também demonstrou potencial de interação com a integrina ITGA4, que está associada principalmente à adesão celular, motilidade celular e estabilização de aglomerados celulares (Xie *et al.*, 2020).

Neste cenário hipotético, em que o ligante MIF originado do microambiente tumoral interagisse com esses receptores no microambiente pulmonar e desencadeasse alterações nos processos homeostáticos, o tecido pulmonar poderia se tornar mais receptivo às células cancerígenas. Essa permissividade poderia se manifestar em diversas funcionalidades biológicas. Em primeiro lugar, a estimulação do fator de crescimento poderia induzir a desorganização tecidual devido à proliferação de células que expressam este receptor em sua membrana celular, como células epiteliais, fibroblastos e endoteliais.

Essas células desempenham papéis fundamentais na manutenção da matriz extracelular, na estrutura tecidual e na vascularização. Se forem alteradas de seu estado saudável, poderiam resultar em modificações na matriz extracelular devido ao estímulo do EGFR em fibroblastos, que são as principais células envolvidas nesse processo biológico. A estimulação das células epiteliais poderia provocar proliferação com capacidade de

desestruturar o tecido pulmonar, além do desenvolvimento anômalo de capilaridade pelas células endoteliais.

Com a ação simultânea da interação MIF_ITGA4, as estruturas de coesão tecidual, além de alterar a organização normal, poderiam permitir uma maior infiltração de células circulantes, sejam elas imunológicas ou células tumorais circulantes.

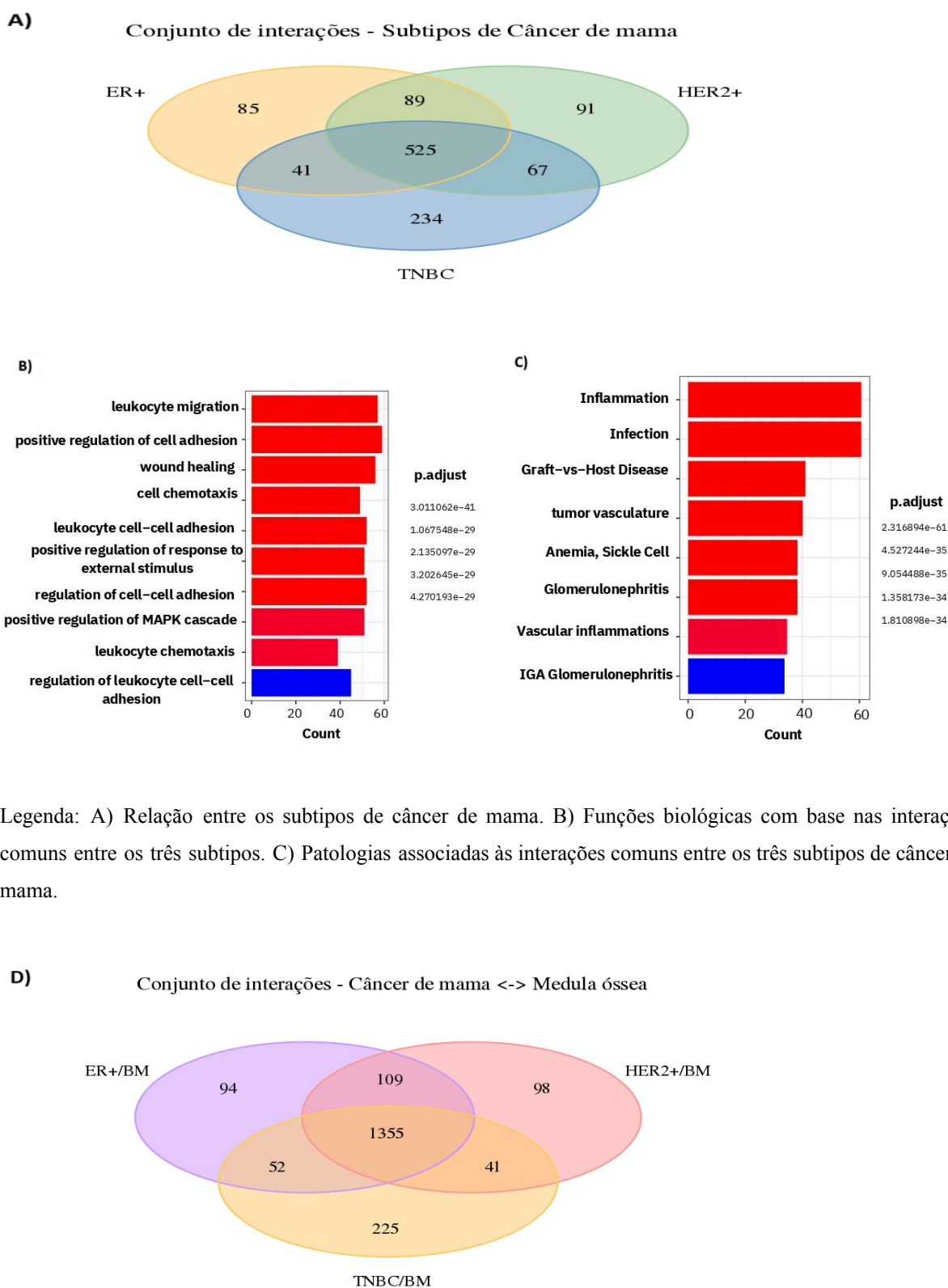
No entanto, é importante ressaltar que essa hipótese precisaria ser investigada e validada por meio de estudos experimentais para confirmar sua relevância e contribuição para a compreensão dos mecanismos envolvidos na disseminação tumoral. Essa abordagem experimental é fundamental para fornecer comprovação e insights sobre o papel específico do ligante MIF (oxMIF e redMIF) e seus potenciais receptores não clássicos no contexto das interações entre o tumor mamário primário e o microambiente pulmonar, assim como para identificar alvos terapêuticos potenciais.

5.8 Interações comuns e Enriquecimento funcional

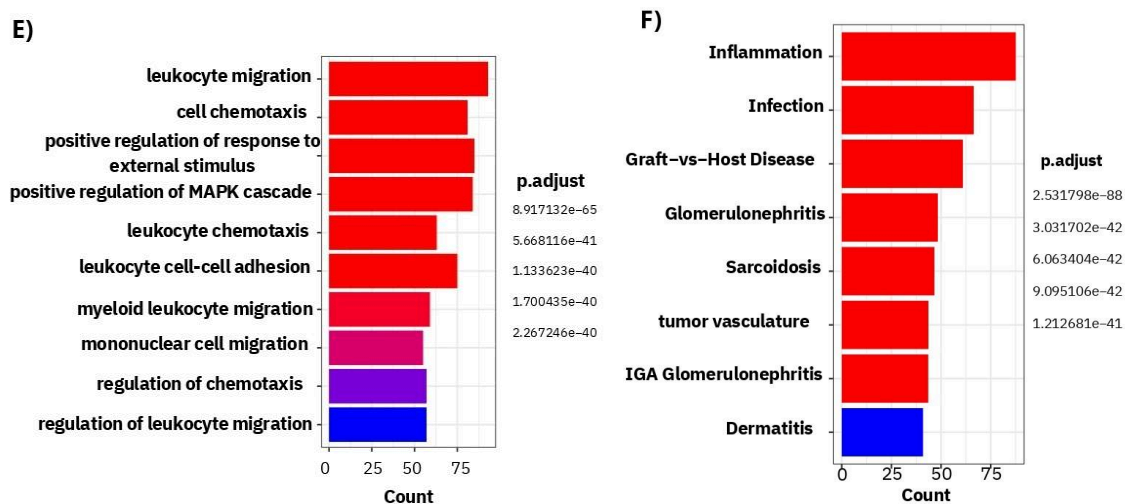
A partir das listas de interações para cada conjunto de dados, abrangendo os nichos isolados (ER, HER2, TNBC) e as interações sistêmicas entre os subtipos de câncer de mama e a medula óssea (ER_BM, HER2_BM, TNBC_BM) e entre os subtipos de câncer de mama e o pulmão (ER_lung, HER2_lung, TNBC_lung). A partir dessas listas de interações, foram realizadas operações de conjuntos para obter visualização quantitativa das relações entre os conjuntos de dados (Figura 19).

Finalmente, as interseções geradas entre os três grupos de cada relação acima citados, foram utilizadas para obter novas listas correspondentes. Essas listas foram utilizadas para confecção de dois painéis de enriquecimento funcional: um voltado para funções biológicas e outro para patologias, utilizando o mesmo conjunto de interações comuns (Figura 19).

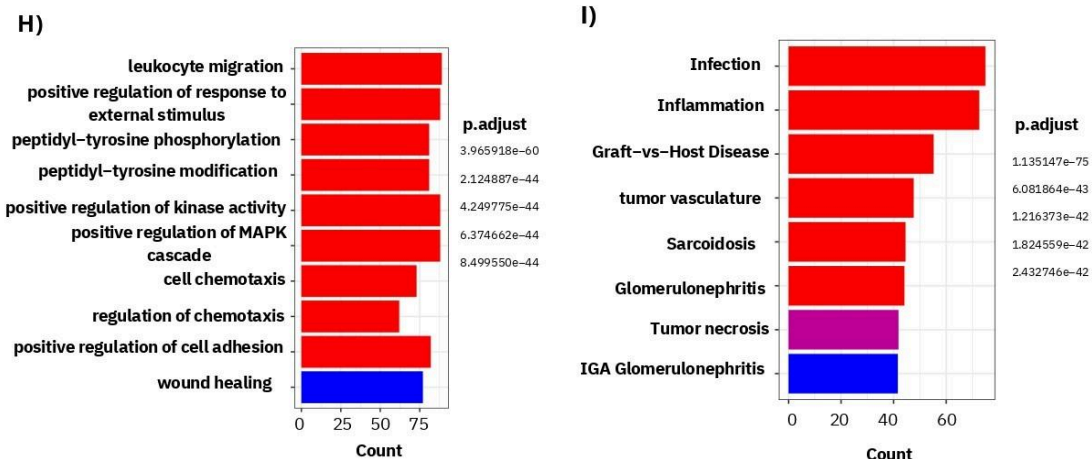
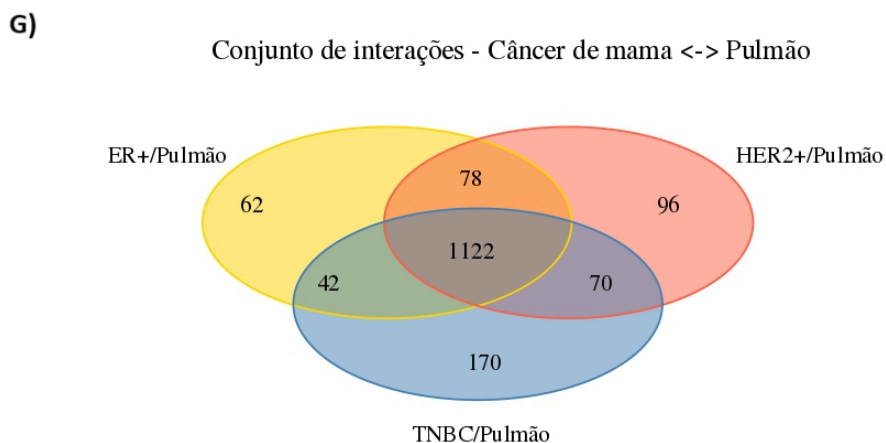
Figura 19. Relação de conjuntos e enriquecimento funcional.



Legenda: A) Relação entre os subtipos de câncer de mama. B) Funções biológicas com base nas interações comuns entre os três subtipos. C) Patologias associadas às interações comuns entre os três subtipos de câncer de mama.



Legenda: D) Relação entre os subtipos de câncer de mama e medula óssea. E) Funções biológicas com base nas interações comuns entre os três subtipos e a medula óssea. F) Patologias associadas às interações comuns entre os três subtipos de câncer de mama e a medula óssea.



Legenda: G) Relação entre os subtipos de câncer de mama e pulmão. H) Funções biológicas com base nas interações comuns entre os três subtipos e o pulmão. I) Patologias associadas às interações comuns entre os três subtipos de câncer de mama e o pulmão.

A partir das interações entre os conjuntos de dados, é possível extrair informações quantitativas e realizar uma revisão da literatura para buscar paralelos. Observou-se uma interseção mais proeminente entre os subtipos ER+ e HER2+ em comparação com o subtipo TNBC em todas as análises. Além disso, independentemente do microambiente, o subtipo TNBC demonstrou um conjunto maior de interações exclusivas em comparação com os outros subtipos de câncer de mama.

Em termos clínicos, os subtipos ER+ e HER2+ exibem maior similaridade devido à sua dependência de estímulos específicos, como os promovidos pelos receptores de estrogênio/progesterona e pelo fator de crescimento epidérmico humano 2. Por outro lado, o subtipo triplo negativo não apresenta essa dependência de estímulos hormonais alterados. Clinicamente, o TNBC é classificado como o subtipo mais agressivo, com maior capacidade metastática. Considerando o potencial preditivo e o número de interações exclusivas, seria interessante investigar se essas interações exclusivas estão relacionadas ou sustentam uma maior agressividade clínica. No entanto, é crucial considerar outras abordagens que integrem a área matemática abstrata com experimentos e análises biológicas. Apesar das limitações, a exploração de dados dessa maneira é uma abordagem viável.

Com relação às funções biológicas associadas às interseções, foram identificadas funções como recrutamento celular, migração celular, adesão celular e mecanismos de transmissão de sinais extracelulares, desencadeando modulação gênica associada à proliferação, sobrevivência e apoptose celular (Giltane; Balko, 2014; Hanahan, 2022). Ao considerar os processos patológicos, os painéis demonstraram atividades diretamente relacionadas aos processos tumorais, como inflamação, vascularização tumoral e necrose (Hanahan, 2022). Além disso, processos como infecção, rejeição de enxertos e anemia também podem apresentar mecanismos semelhantes no enfrentamento de processos tumorais (Busti *et al.*, 2018; Hotchkiss; Moldawer, 2014; Huo *et al.*, 2020).

Além disso, é importante considerar que o tumor, de forma sistêmica, pode ter interações preditivas que influenciam os processos biológicos, incluindo a hematopoiese. Essa

influência pode resultar em alterações na produção de células sanguíneas e imunológicas, além de afetar o recrutamento e retenção celular, tanto na medula óssea quanto em microambientes distintos, como o pulmonar. Conseqüentemente, devido a essas potenciais alterações sistêmicas, o tumor pode condicionar outros microambientes a se tornarem mais permissivos, criando um ambiente favorável para a progressão tumoral e metastática.

7. CONCLUSÕES

I – A análise computacional de dados de células individuais de diferentes microambientes ofereceu insights passíveis de investigação experimental, orientando assim futuras pesquisas empíricas.

II – A abordagem utilizada revelou que as células cancerígenas e as CAFs (Fibroblastos Associadas ao Câncer) presentes no microambiente tumoral dos três subtipos de câncer de mama demonstraram interações potenciais com as células-tronco e progenitoras hematopoiéticas (Células Progenitoras Hematopoiéticas), relacionadas a processos biológicos como recrutamento, migração e mobilidade celular.

III – A abordagem empregada revelou que as células cancerígenas presentes no microambiente tumoral dos três subtipos de câncer de mama demonstram interações potenciais com as células do microambiente pulmonar, destacando interações relacionadas a processos biológicos como a interação entre célula e matriz extracelular, associada à migração e mobilidade celular.

IV – As interações envolvendo o ligante MIF, como MIF-CD74/CD44, MIF-ITGA4 e MIF-EGFR, possuem o potencial de interagir tanto com a medula óssea (MIF-CD74/CD44) quanto com o microambiente pulmonar (MIF-ITGA4, MIF-EGFR).

V – As interações com o ligante MIF, que é significativamente expresso no microambiente tumoral, mostraram-se promissoras para uma investigação mais aprofundada em relação à modulação sistêmica, tanto no microambiente hematopoiético quanto no microambiente pulmonar.

VI – A interação entre CXCL12 e CXCR4 mostrou-se promissora para um aprofundamento dos estudos relacionados à modulação da interação entre o microambiente tumoral e os processos hematopoiéticos. Apesar de amplamente descrita na literatura, essa interação pode ser explorada em diferentes níveis, principalmente em relação às alterações pós-transcricionais e suas conseqüências nas funções biológicas.

8. PERSPECTIVAS

I - Incluir a integração de dados provenientes de diversos microambientes, adicionando dados celulares e solúveis da corrente sanguínea, bem como a análise temporal, visando mensurar alterações sistêmicas ao longo da progressão tumoral em uma escala de tempo.

II - Explorar os mesmos conjuntos de dados, porém, ao invés de buscar semelhanças, aprofundar nas diferenças entre os três subtipos para que os resultados sejam menos genéricos.

III - Utilizar dados da medula óssea que inclua células mesenquimais e estruturais do microambiente hematopoiético pode fornecer informações cruciais entre os processos entre sistêmicos.

REFERÊNCIAS

- ALAMPOUR-RAJABI, S. *et al.* MIF interacts with CXCR7 to promote receptor internalization, ERK1/2 and ZAP-70 signaling, and lymphocyte chemotaxis. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, [s. l.], v. 29, n. 11, p. 4497–4511, 2015.
- ALI, S.; LAZENNEC, G. Chemokines: novel targets for breast cancer metastasis. **Cancer metastasis reviews**, [s. l.], v. 26, n. 3-4, p. 401–420, 2007.
- ALI, A.; VAIKARI, V. P.; ALACHKAR, H. CD99 in malignant hematopoiesis. **Experimental hematology**, [s. l.], v. 106, p. 40–46, 2022.
- AMIN, M. A. *et al.* Migration inhibitory factor up-regulates vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 via Src, PI3 kinase, and NFkappaB. **Blood**, [s. l.], v. 107, n. 6, p. 2252–2261, 2006.
- ANDERSSON, U.; TRACEY, K. J. HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. **Annual review of immunology**, [s. l.], v. 29, p. 139–162, 2011.
- ARA, T. *et al.* Long-term hematopoietic stem cells require stromal cell-derived factor-1 for colonizing bone marrow during ontogeny. **Immunity**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 257–267, 2003.
- ARNAOUT, M. A.; GOODMAN, S. L.; XIONG, J.-P. Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. **Current opinion in cell biology**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 495–507, 2007.
- BACCAR, A. *et al.* CD99 and HLA-II immunostaining in breast cancer tissue and their correlation with lymph node metastasis. **Disease markers**, [s. l.], v. 34, n. 5, p. 363–371, 2013.
- BACCIN, C. *et al.* Combined single-cell and spatial transcriptomics reveal the molecular, cellular and spatial bone marrow niche organization. **Nature cell biology**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 38–48, 2020.
- BACHELERIE, F. *et al.* International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. **Pharmacological reviews**, [s. l.], v. 66, n. 1, p. 1–79, 2014.
- BAGHBAN, R. *et al.* **Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance**. [S. l.: s. n.], 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s12964-020-0530-4>.
- BALKWILL, F. R.; CAPASSO, M.; HAGEMANN, T. **The tumor microenvironment at a glance**. [S. l.: s. n.], 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.116392>.
- BALTA, E.; WABNITZ, G. H.; SAMSTAG, Y. Hijacked Immune Cells in the Tumor Microenvironment: Molecular Mechanisms of Immunosuppression and Cues to Improve T Cell-Based Immunotherapy of Solid Tumors. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 22, n. 11, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22115736>.
- BASSLER, K. *et al.* The Myeloid Cell Compartment-Cell by Cell. **Annual review of**

immunology, [s. l.], v. 37, p. 269–293, 2019.

BECKER-HERMAN, S. *et al.* CD74 is a regulator of hematopoietic stem cell maintenance. **PLoS biology**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. e3001121, 2021.

BELYAVSKY, A.; PETINATI, N.; DRIZE, N. Hematopoiesis during Ontogenesis, Adult Life, and Aging. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 22, n. 17, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22179231>.

BERNHAGEN, J. *et al.* MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. **Nature medicine**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 587–596, 2007.

BI, T.-Q.; CHE, X.-M. Nampt/PBEF/visfatin and cancer. **Cancer biology & therapy**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 119–125, 2010.

BLOOM, J.; SUN, S.; AL-ABED, Y. MIF, a controversial cytokine: a review of structural features, challenges, and opportunities for drug development. **Expert opinion on therapeutic targets**, [s. l.], v. 20, n. 12, p. 1463–1475, 2016.

BOUTAS, I. *et al.* The expression of galectin-3 in breast cancer and its association with chemoresistance: a systematic review of the literature. **Archives of gynecology and obstetrics**, [s. l.], v. 300, n. 5, p. 1113–1120, 2019.

BOUTRY, J. *et al.* **The evolution and ecology of benign tumors**. [S. l.: s. n.], 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188643>.

BREAST CANCER. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer#:~:text=In%202022%2C%20there%20were%202.3,increasing%20rates%20in%20later%20life>. Acesso em: 11 abr. 2024.

BROWAEYS, R.; SAELENS, W.; SAEYS, Y. NicheNet: modeling intercellular communication by linking ligands to target genes. **Nature methods**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 159–162, 2020a.

BROWAEYS, R.; SAELENS, W.; SAEYS, Y. NicheNet: modeling intercellular communication by linking ligands to target genes. **Nature methods**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 159–162, 2020b.

BROXMEYER, H. E. *et al.* Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. **The Journal of experimental medicine**, [s. l.], v. 201, n. 8, p. 1307–1318, 2005.

BUI, T. M.; WIESOLEK, H. L.; SUMAGIN, R. ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis. **Journal of leukocyte biology**, [s. l.], v. 108, n. 3, p. 787–799, 2020.

BUSTI, F. *et al.* Anemia and Iron Deficiency in Cancer Patients: Role of Iron Replacement Therapy. **Pharmaceuticals**, [s. l.], v. 11, n. 4, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/ph11040094>.

BYUN, H.-J. *et al.* A splice variant of CD99 increases motility and MMP-9 expression of

human breast cancer cells through the AKT-, ERK-, and JNK-dependent AP-1 activation signaling pathways. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 281, n. 46, p. 34833–34847, 2006.

CALCINOTTO, A. *et al.* Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury. **Physiological reviews**, [s. l.], v. 99, n. 2, p. 1047–1078, 2019.

CANÈ, S. *et al.* The Endless Saga of Monocyte Diversity. **Frontiers in immunology**, [s. l.], v. 10, p. 1786, 2019.

CAVALETTI, G. *et al.* Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity: A multifaceted, still unsolved issue. **Journal of the peripheral nervous system: JPNS**, [s. l.], v. 24 Suppl 2, p. S6–S12, 2019.

CERADINI, D. J. *et al.* Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. **Nature medicine**, [s. l.], v. 10, n. 8, p. 858–864, 2004.

CHA, Y. J.; KOO, J. S. Role of Tumor-Associated Myeloid Cells in Breast Cancer. **Cells**, [s. l.], v. 9, n. 8, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/cells9081785>.

CHANTRAIN, C. F. *et al.* Bone marrow microenvironment and tumor progression. **Cancer microenvironment: official journal of the International Cancer Microenvironment Society**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 23–35, 2008.

CHEN, G.-F. *et al.* Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. **Acta pharmacologica Sinica**, [s. l.], v. 38, n. 9, p. 1205–1235, 2017.

COHEN, S. Origins of growth factors: NGF and EGF. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s. l.], v. 1038, p. 98–102, 2004.

COLELLA, S. *et al.* Molecular signatures of metastasis in head and neck cancer. **Head & neck**, [s. l.], v. 30, n. 10, p. 1273–1283, 2008.

COMAZZETTO, S.; SHEN, B.; MORRISON, S. J. Niches that regulate stem cells and hematopoiesis in adult bone marrow. **Developmental cell**, [s. l.], v. 56, n. 13, p. 1848–1860, 2021.

COSTA, A. *et al.* Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer. **Cancer cell**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 463–479.e10, 2018.

CUI, J. *et al.* GSTP1 and cancer: Expression, methylation, polymorphisms and signaling (Review). **International journal of oncology**, [s. l.], v. 56, n. 4, p. 867–878, 2020.

CUSTÓDIO, M.; BIDDLE, A.; TAVASSOLI, M. Portrait of a CAF: The story of cancer-associated fibroblasts in head and neck cancer. **Oral oncology**, [s. l.], v. 110, p. 104972, 2020.

DASARI, K. *et al.* The somatic molecular evolution of cancer: Mutation, selection, and epistasis. **Progress in biophysics and molecular biology**, [s. l.], v. 165, p. 56–65, 2021.

DAVOODZADEH GHOLAMI, M. *et al.* Exhaustion of T lymphocytes in the tumor microenvironment: Significance and effective mechanisms. **Cellular immunology**, [s. l.], v.

322, p. 1–14, 2017.

DAVY, P. *et al.* Fetal growth restriction is associated with accelerated telomere shortening and increased expression of cell senescence markers in the placenta. **Placenta**, [s. l.], v. 30, n. 6, p. 539–542, 2009.

DE FALCO, E. *et al.* SDF-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induced recruitment of bone marrow progenitor cells. **Blood**, [s. l.], v. 104, n. 12, p. 3472–3482, 2004.

DENISENKO, T. V.; BUDKEVICH, I. N.; ZHIVOTOVSKY, B. Cell death-based treatment of lung adenocarcinoma. **Cell death & disease**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 117, 2018.

DOMINGUEZ, G. *et al.* Prevalence of aberrant methylation of p14ARF over p16INK4a in some human primary tumors. **Mutation research**, [s. l.], v. 530, n. 1-2, p. 9–17, 2003.

DÖRING, Y. *et al.* The CXCL12/CXCR4 chemokine ligand/receptor axis in cardiovascular disease. **Frontiers in physiology**, [s. l.], v. 5, p. 212, 2014.

DOULATOV, S. *et al.* **Hematopoiesis: A Human Perspective**. [S. l.: s. n.], 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2012.01.006>.

DVORAK, H. F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. **The New England journal of medicine**, [s. l.], v. 315, n. 26, p. 1650–1659, 1986.

ENGBLOM, C.; PFIRSCHKE, C.; PITTET, M. J. The role of myeloid cells in cancer therapies. **Nature reviews. Cancer**, [s. l.], v. 16, n. 7, p. 447–462, 2016.

FADER, C. M.; COLOMBO, M. I. Multivesicular bodies and autophagy in erythrocyte maturation. **Autophagy**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 122–125, 2006.

FANG, T. *et al.* Lymph Node Metastasis-Related Gene ITGA4 Promotes the Proliferation, Migration, and Invasion of Gastric Cancer Cells by Regulating Tumor Immune Microenvironment. **Journal of oncology**, [s. l.], v. 2022, p. 1315677, 2022.

FIDLER, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. **Nature reviews. Cancer**, [s. l.], v. 3, n. 6, p. 453–458, 2003.

FOUAD, Y. A.; AANEI, C. Revisiting the hallmarks of cancer. **American journal of cancer research**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 1016–1036, 2017.

FU, R. *et al.* HIF-1 α promoted vasculogenic mimicry formation in lung adenocarcinoma through NRP1 upregulation in the hypoxic tumor microenvironment. **Cell death & disease**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 394, 2021.

GABRILOVICH, D. I. Myeloid-Derived Suppressor Cells. **Cancer immunology research**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 3–8, 2017.

GABRILOVICH, D. I.; OSTRAND-ROSENBERG, S.; BRONTE, V. **Coordinated regulation of myeloid cells by tumours**. [S. l.: s. n.], 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3175>.

- GAO, W. *et al.* Silence of fibronectin 1 increases cisplatin sensitivity of non-small cell lung cancer cell line. **Biochemical and biophysical research communications**, [s. l.], v. 476, n. 1, p. 35–41, 2016.
- GASCARD, P.; TLSTY, T. D. Carcinoma-associated fibroblasts: orchestrating the composition of malignancy. **Genes & development**, [s. l.], v. 30, n. 9, p. 1002–1019, 2016.
- GELSE, K.; PÖSCHL, E.; AIGNER, T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. **Advanced drug delivery reviews**, [s. l.], v. 55, n. 12, p. 1531–1546, 2003.
- GENG, Q.-S. *et al.* Over-Expression and Prognostic Significance of FN1, Correlating With Immune Infiltrates in Thyroid Cancer. **Frontiers of medicine**, [s. l.], v. 8, p. 812278, 2021.
- GILES, A. J. *et al.* Activation of Hematopoietic Stem/Progenitor Cells Promotes Immunosuppression Within the Pre-metastatic Niche. **Cancer research**, [s. l.], v. 76, n. 6, p. 1335–1347, 2016.
- GILTNAME, J. M.; BALKO, J. M. Rationale for targeting the Ras/MAPK pathway in triple-negative breast cancer. **Discovery medicine**, [s. l.], v. 17, n. 95, p. 275–283, 2014.
- GRANJA, J. M. *et al.* Single-cell multiomic analysis identifies regulatory programs in mixed-phenotype acute leukemia. **Nature biotechnology**, [s. l.], v. 37, n. 12, p. 1458–1465, 2019.
- GRAUS-PORTA, D. *et al.* ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. **The EMBO journal**, [s. l.], v. 16, n. 7, p. 1647–1655, 1997.
- GRETEN, F. R.; GRIVENNIKOV, S. I. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. **Immunity**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 27–41, 2019.
- GRIFFITH, J. W.; SOKOL, C. L.; LUSTER, A. D. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. **Annual review of immunology**, [s. l.], v. 32, p. 659–702, 2014.
- GULINO, A. V. *et al.* Altered leukocyte response to CXCL12 in patients with warts hypogammaglobulinemia, infections, myelokathexis (WHIM) syndrome. **Blood**, [s. l.], v. 104, n. 2, p. 444–452, 2004.
- HAMMOND, M. E. H. *et al.* American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). **Archives of pathology & laboratory medicine**, [s. l.], v. 134, n. 7, p. e48–e72, 2010.
- HAN, A. *et al.* Calreticulin is a Critical Cell Survival Factor in Malignant Neoplasms. **PLoS biology**, [s. l.], v. 17, n. 9, p. e3000402, 2019.
- HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer discovery**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 31–46, 2022.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **Hallmarks of Cancer: The Next Generation**. [S. l.: s. n.], 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell*, [s. l.], v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.

HAN, S. W.; ROMAN, J. Fibronectin induces cell proliferation and inhibits apoptosis in human bronchial epithelial cells: pro-oncogenic effects mediated by PI3-kinase and NF-kappa B. *Oncogene*, [s. l.], v. 25, n. 31, p. 4341–4349, 2006.

HARBECK, N. *et al.* Breast cancer. *Nature reviews. Disease primers*, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 66, 2019.

HARRIS, H. E.; ANDERSSON, U.; PISETSKY, D. S. HMGB1: a multifunctional alarmin driving autoimmune and inflammatory disease. *Nature reviews. Rheumatology*, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 195–202, 2012.

HE, X. *et al.* Vasculogenic mimicry, a negative indicator for progression free survival of lung adenocarcinoma irrespective of first line treatment and epithelial growth factor receptor mutation status. *BMC cancer*, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 132, 2021.

HERNANDEZ, P. A. *et al.* Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nature genetics*, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 70–74, 2003.

HIAM-GALVEZ, K. J.; ALLEN, B. M.; SPITZER, M. H. **Systemic immunity in cancer**. [S. l.: s. n.], 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41568-021-00347-z>.

HOCHBERG, M. E. *et al.* Preventive evolutionary medicine of cancers. *Evolutionary applications*, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 134–143, 2013.

HOLBRO, T. *et al.* The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, [s. l.], v. 100, n. 15, p. 8933–8938, 2003.

HONJO, Y. *et al.* Down-regulation of galectin-3 suppresses tumorigenicity of human breast carcinoma cells. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 661–668, 2001.

HOTCHKISS, R. S.; MOLDAWER, L. L. Parallels between cancer and infectious disease. *The New England journal of medicine*, [s. l.], v. 371, n. 4, p. 380–383, 2014.

HREGGVIDSDÓTTIR, H. S. *et al.* High mobility group box protein 1 (HMGB1)-partner molecule complexes enhance cytokine production by signaling through the partner molecule receptor. *Molecular medicine*, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 224–230, 2012.

HUANG, G. *et al.* RNA-binding protein CUGBP1 controls the differential INSR splicing in molecular subtypes of breast cancer cells and affects cell aggressiveness. *Carcinogenesis*, [s. l.], v. 41, n. 9, p. 1294–1305, 2020.

HUBBARD, A. K.; ROTHLEIN, R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free radical biology & medicine*, [s. l.], v. 28, n. 9, p. 1379–1386, 2000.

HUO, Z. *et al.* Cancer Risks in Solid Organ Transplant Recipients: Results from a Comprehensive Analysis of 72 Cohort Studies. **Oncoimmunology**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1848068, 2020.

HUTTENLOCHER, A.; HORWITZ, A. R. Integrins in cell migration. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, [s. l.], v. 3, n. 9, p. a005074, 2011.

IMITOLA, J. *et al.* Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1alpha/CXC chemokine receptor 4 pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 101, n. 52, p. 18117–18122, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/instituto-nacional-de-cancer-31052023>. Acesso em: 11 abr. 2024.

ITO, T. *et al.* Alteration of the p14(ARF) gene and p53 status in human hepatocellular carcinomas. **Journal of gastroenterology**, [s. l.], v. 39, n. 4, p. 355–361, 2004.

JAHANBAN-ESFAHLAN, R. *et al.* Combination of nanotechnology with vascular targeting agents for effective cancer therapy. **Journal of cellular physiology**, [s. l.], v. 233, n. 4, p. 2982–2992, 2018.

JAHANBAN-ESFAHLAN, R. *et al.* RGD delivery of truncated coagulase to tumor vasculature affords local thrombotic activity to induce infarction of tumors in mice. **Scientific reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 8126, 2017.

JAILLON, S. *et al.* Neutrophil diversity and plasticity in tumour progression and therapy. **Nature reviews. Cancer**, [s. l.], v. 20, n. 9, p. 485–503, 2020.

JANKAUSKAS, S. S. *et al.* Evolving complexity of MIF signaling. **Cellular signalling**, [s. l.], v. 57, p. 76–88, 2019.

JANSSENS, R.; STRUYF, S.; PROOST, P. The unique structural and functional features of CXCL12. **Cellular & molecular immunology**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 299–311, 2018.

JANUŠKEVIČIENĖ, I.; PETRIKAITĖ, V. Heterogeneity of breast cancer: The importance of interaction between different tumor cell populations. **Life sciences**, [s. l.], v. 239, p. 117009, 2019.

JIN, H. *et al.* MYLK and CALD1 as molecular targets in bladder cancer. **Medicine**, [s. l.], v. 102, n. 47, p. e36302, 2023.

JOHN, A. E. *et al.* COVID-19 and pulmonary fibrosis: A potential role for lung epithelial cells and fibroblasts. **Immunological reviews**, [s. l.], v. 302, n. 1, p. 228–240, 2021.

JØRGENSEN, C. L. T. *et al.* PAM50 Intrinsic Subtype Profiles in Primary and Metastatic Breast Cancer Show a Significant Shift toward More Aggressive Subtypes with Prognostic Implications. **Cancers**, [s. l.], v. 13, n. 7, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers13071592>.

JUBE, S. *et al.* Cancer cell secretion of the DAMP protein HMGB1 supports progression in

malignant mesothelioma. **Cancer research**, [s. l.], v. 72, n. 13, p. 3290–3301, 2012.

KACZANOWSKA, S. *et al.* Genetically engineered myeloid cells rebalance the core immune suppression program in metastasis. **Cell**, [s. l.], v. 184, n. 8, p. 2033–2052.e21, 2021.

KAMB, A. **What's wrong with our cancer models?**. [S. l.: s. n.], 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd1635>.

KANG, I.; BUCALA, R. The immunobiology of MIF: function, genetics and prospects for precision medicine. **Nature reviews. Rheumatology**, [s. l.], v. 15, n. 7, p. 427–437, 2019.

KAPARA, A.; VANNINI, A.; PECK, B. A micronutrient with major effects on cancer cell viability. **Nature metabolism**, [s. l.], v. 2, n. 7, p. 564–565, 2020.

KAPLAN, R. N. *et al.* VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. **Nature**, [s. l.], v. 438, n. 7069, p. 820–827, 2005.

KARPOVA, D.; BONIG, H. Concise Review: CXCR4/CXCL12 Signaling in Immature Hematopoiesis--Lessons From Pharmacological and Genetic Models. **Stem cells**, [s. l.], v. 33, n. 8, p. 2391–2399, 2015.

KAWAGUCHI, N.; ZHANG, T.-T.; NAKANISHI, T. Involvement of CXCR4 in Normal and Abnormal Development. **Cells**, [s. l.], v. 8, n. 2, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/cells8020185>.

KINKER, G. S. *et al.* Pan-cancer single-cell RNA-seq identifies recurring programs of cellular heterogeneity. **Nature genetics**, [s. l.], v. 52, n. 11, p. 1208–1218, 2020.

KOCH, C. *et al.* Pre-analytical and analytical variables of label-independent enrichment and automated detection of circulating tumor cells in cancer patients. **Cancers**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 442, 2020.

KO, A.; HAN, S. Y.; SONG, J. Regulatory Network of ARF in Cancer Development. **Molecules and cells**, [s. l.], v. 41, n. 5, p. 381–389, 2018.

KONING, G. A.; SCHIFFELERS, R. M.; STORM, G. Endothelial cells at inflammatory sites as target for therapeutic intervention. **Endothelium: journal of endothelial cell research**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 161–171, 2002.

KOVACIC, N.; CROUCHER, P. I.; MCDONALD, M. M. **Signaling Between Tumor Cells and the Host Bone Marrow Microenvironment**. [S. l.: s. n.], 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00223-013-9794-7>.

KRYCZEK, I. *et al.* CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers. **Cancer research**, [s. l.], v. 65, n. 2, p. 465–472, 2005.

KUSMARTSEV, S.; GABRILOVICH, D. I. **Role Of Immature Myeloid Cells in Mechanisms of Immune Evasion In Cancer**. [S. l.: s. n.], 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00262-005-0048-z>.

LAZENNEC, G.; RICHMOND, A. Chemokines and chemokine receptors: new insights into

cancer-related inflammation. **Trends in molecular medicine**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 133–144, 2010.

LEE, J. S. GSTP1 promoter hypermethylation is an early event in breast carcinogenesis. **Virchows Archiv: an international journal of pathology**, [s. l.], v. 450, n. 6, p. 637–642, 2007.

LEE, S. H. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor (MIF) inhibitor 4-IPP downregulates stemness phenotype and mesenchymal trans-differentiation after irradiation in glioblastoma multiforme. **PloS one**, [s. l.], v. 16, n. 9, p. e0257375, 2021.

LEE, S. J.; BENVENISTE, E. N. Adhesion molecule expression and regulation on cells of the central nervous system. **Journal of neuroimmunology**, [s. l.], v. 98, n. 2, p. 77–88, 1999.

LEE, H. N.; JEONG, M. S.; JANG, S. B. Molecular Characteristics of Amyloid Precursor Protein (APP) and Its Effects in Cancer. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 22, n. 9, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22094999>.

LEI, X. *et al.* Immune cells within the tumor microenvironment: Biological functions and roles in cancer immunotherapy. **Cancer letters**, [s. l.], v. 470, p. 126–133, 2020.

LEMMON, M. A.; SCHLESSINGER, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell**, [s. l.], v. 141, n. 7, p. 1117–1134, 2010.

LENG, L. *et al.* MIF signal transduction initiated by binding to CD74. **The Journal of experimental medicine**, [s. l.], v. 197, n. 11, p. 1467–1476, 2003.

LIU, Z. *et al.* CD74 interacts with CD44 and enhances tumorigenesis and metastasis via RHOA-mediated cofilin phosphorylation in human breast cancer cells. **Oncotarget**, [s. l.], v. 7, n. 42, p. 68303–68313, 2016.

LIU, J. *et al.* Collagen 1A1 (COL1A1) promotes metastasis of breast cancer and is a potential therapeutic target. **Discovery medicine**, [s. l.], v. 25, n. 139, p. 211–223, 2018.

LIU, Y.; CAO, X. Immunosuppressive cells in tumor immune escape and metastasis. **Journal of molecular medicine**, [s. l.], v. 94, n. 5, p. 509–522, 2016.

LI, Y.; ZHU, B. **Metabolism of Cancer Cells and Immune Cells in the Tumor Microenvironment**. [S. l.]: Frontiers Media SA, 2019.

LORETH, D. *et al.* CD74 and CD44 Expression on CTCs in Cancer Patients with Brain Metastasis. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 22, n. 13, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22136993>.

LUMMERTZ DA ROCHA, E. *et al.* CellComm infers cellular crosstalk that drives haematopoietic stem and progenitor cell development. **Nature cell biology**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 579–589, 2022.

LUMMERTZ DA ROCHA, E. *et al.* Reconstruction of complex single-cell trajectories using CellRouter. **Nature communications**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 892, 2018.

LUO, J.; XIANG, H. LncRNA MYLK-AS1 acts as an oncogene by epigenetically silencing

large tumor suppressor 2 (LATS2) in gastric cancer. **Bioengineered**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 3101–3112, 2021.

MAGIDEY-KLEIN, K. *et al.* IL-6 contributes to metastatic switch via the differentiation of monocytic-dendritic progenitors into prometastatic immune cells. **Journal for immunotherapy of cancer**, [s. l.], v. 9, n. 6, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1136/jitc-2021-002856>.

MARKIEWSKI, M. M. *et al.* The Ribosomal Protein S19 Suppresses Antitumor Immune Responses via the Complement C5a Receptor 1. **Journal of immunology**, [s. l.], v. 198, n. 7, p. 2989–2999, 2017.

MCFARLANE, S. *et al.* CD44 increases the efficiency of distant metastasis of breast cancer. **Oncotarget**, [s. l.], v. 6, n. 13, p. 11465–11476, 2015.

MCINTYRE, T. M. *et al.* Cell-cell interactions: leukocyte-endothelial interactions. **Current opinion in hematology**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 150–158, 2003.

MEDAGLIA, C. *et al.* Spatial reconstruction of immune niches by combining photoactivatable reporters and scRNA-seq. **Science**, [s. l.], v. 358, n. 6370, p. 1622–1626, 2017.

MELMS, J. C. *et al.* Author Correction: A molecular single-cell lung atlas of lethal COVID-19. **Nature**, [s. l.], v. 598, n. 7882, p. E2, 2021.

MERCIER, F. E.; RAGU, C.; SCADDEN, D. T. The bone marrow at the crossroads of blood and immunity. **Nature reviews. Immunology**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 49–60, 2011.

MERRYWEATHER-CLARKE, A. T. *et al.* Global gene expression analysis of human erythroid progenitors. **Blood**, [s. l.], v. 117, n. 13, p. e96–e108, 2011.

MOLLICA POETA, V. *et al.* Chemokines and Chemokine Receptors: New Targets for Cancer Immunotherapy. **Frontiers in immunology**, [s. l.], v. 10, p. 379, 2019.

MORA BARTHELMESS, R.; STIJLEMANS, B.; VAN GINDERACHTER, J. A. Hallmarks of Cancer Affected by the MIF Cytokine Family. **Cancers**, [s. l.], v. 15, n. 2, 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers15020395>.

MORATH, I.; HARTMANN, T. N.; ORIAN-ROUSSEAU, V. CD44: More than a mere stem cell marker. **The international journal of biochemistry & cell biology**, [s. l.], v. 81, n. Pt A, p. 166–173, 2016.

MORJANI, H. *et al.* **The Impact of Tumor Extracellular Matrix Cross-Talk on Cancer Hallmarks**. [S. l.]: Frontiers Media SA, 2021.

MORTEZAEI, K. CXCL12/CXCR4 axis in the microenvironment of solid tumors: A critical mediator of metastasis. **Life sciences**, [s. l.], v. 249, p. 117534, 2020.

MORTEZAEI, K. Redox tolerance and metabolic reprogramming in solid tumors. **Cell biology international**, [s. l.], v. 45, n. 2, p. 273–286, 2021.

MOYER, A. M. *et al.* Glutathione s-transferase p1: gene sequence variation and functional

genomic studies. **Cancer research**, [s. l.], v. 68, n. 12, p. 4791–4801, 2008.

NACHEF, M. *et al.* Targeting SLC1A5 and SLC3A2/SLC7A5 as a Potential Strategy to Strengthen Anti-Tumor Immunity in the Tumor Microenvironment. **Frontiers in immunology**, [s. l.], v. 12, p. 624324, 2021.

NAGASAWA, T. *et al.* Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. **Nature**, [s. l.], v. 382, n. 6592, p. 635–638, 1996.

NAKAMURA, K.; SMYTH, M. J. Myeloid immunosuppression and immune checkpoints in the tumor microenvironment. **Cellular & molecular immunology**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 1–12, 2020.

NOBRE, A. R. *et al.* Bone marrow NG2/Nestin mesenchymal stem cells drive DTC dormancy TGF β 2. **Nature cancer**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 327–339, 2021.

NUNEZ-CRUZ, S. *et al.* Genetic and pharmacologic inhibition of complement impairs endothelial cell function and ablates ovarian cancer neovascularization. **Neoplasia**, [s. l.], v. 14, n. 11, p. 994–1004, 2012.

O'REILLY, C. *et al.* Targeting MIF in Cancer: Therapeutic Strategies, Current Developments, and Future Opportunities. **Medicinal research reviews**, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 440–460, 2016.

PANKOV, R.; YAMADA, K. M. Fibronectin at a glance. **Journal of cell science**, [s. l.], v. 115, n. Pt 20, p. 3861–3863, 2002.

PATHAK, G. P. *et al.* RTN4 Knockdown Dysregulates the AKT Pathway, Destabilizes the Cytoskeleton, and Enhances Paclitaxel-Induced Cytotoxicity in Cancers. **Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy**, [s. l.], v. 26, n. 8, p. 2019–2033, 2018.

PAWIG, L. *et al.* Diversity and Inter-Connections in the CXCR4 Chemokine Receptor/Ligand Family: Molecular Perspectives. **Frontiers in immunology**, [s. l.], v. 6, p. 429, 2015.

PEINADO, H. *et al.* Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases. **Nature reviews. Cancer**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 302–317, 2017.

PINES, G.; KÖSTLER, W. J.; YARDEN, Y. Oncogenic mutant forms of EGFR: lessons in signal transduction and targets for cancer therapy. **FEBS letters**, [s. l.], v. 584, n. 12, p. 2699–2706, 2010.

PLIKUS, M. V. *et al.* Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease. **Cell**, [s. l.], v. 184, n. 15, p. 3852–3872, 2021.

PLJESA-ERCEGOVAC, M. *et al.* Glutathione Transferases: Potential Targets to Overcome Chemoresistance in Solid Tumors. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 19, n. 12, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19123785>.

POTENTE, M.; MÄKINEN, T. Vascular heterogeneity and specialization in development and disease. **Nature reviews. Molecular cell biology**, [s. l.], v. 18, n. 8, p. 477–494, 2017.

PRAT, A. *et al.* Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast cancer research: BCR**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. R68, 2010.

PROIA, T. A. *et al.* Genetic predisposition directs breast cancer phenotype by dictating progenitor cell fate. **Cell stem cell**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 149–163, 2011.

QIAN, H. *et al.* Distinct roles of integrins alpha6 and alpha4 in homing of fetal liver hematopoietic stem and progenitor cells. **Blood**, [s. l.], v. 110, n. 7, p. 2399–2407, 2007.

RAHMA, O. E.; HODI, F. S. The Intersection between Tumor Angiogenesis and Immune Suppression. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, [s. l.], v. 25, n. 18, p. 5449–5457, 2019.

RAMOS, T. N.; BULLARD, D. C.; BARNUM, S. R. ICAM-1: isoforms and phenotypes. **Journal of immunology**, [s. l.], v. 192, n. 10, p. 4469–4474, 2014.

RASKOV, H. *et al.* Cytotoxic CD8 T cells in cancer and cancer immunotherapy. **British journal of cancer**, [s. l.], v. 124, n. 2, p. 359–367, 2021.

RICHARD, V. *et al.* Involvement of macrophage migration inhibitory factor and its receptor (CD74) in human breast cancer. **Oncology reports**, [s. l.], v. 32, n. 2, p. 523–529, 2014.

ROZENBLATT-ROSEN, O. *et al.* The Human Tumor Atlas Network: Charting Tumor Transitions across Space and Time at Single-Cell Resolution. **Cell**, [s. l.], v. 181, n. 2, p. 236–249, 2020.

SACHS, N.; CLEVERS, H. Organoid cultures for the analysis of cancer phenotypes. **Current opinion in genetics & development**, [s. l.], v. 24, p. 68–73, 2014.

SANTIAGO, B. *et al.* CXCL12 gene expression is upregulated by hypoxia and growth arrest but not by inflammatory cytokines in rheumatoid synovial fibroblasts. **Cytokine**, [s. l.], v. 53, n. 2, p. 184–190, 2011.

SAU, A. *et al.* Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance. **Archives of biochemistry and biophysics**, [s. l.], v. 500, n. 2, p. 116–122, 2010.

SCHÜTZ, F. *et al.* PD-1/PD-L1 Pathway in Breast Cancer. **Oncology research and treatment**, [s. l.], v. 40, n. 5, p. 294–297, 2017.

SHIE, W.-Y. *et al.* Acidosis promotes the metastatic colonization of lung cancer via remodeling of the extracellular matrix and vasculogenic mimicry. **International journal of oncology**, [s. l.], v. 63, n. 6, 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3892/ijo.2023.5584>.

SINGH, N. *et al.* Inflammation and cancer. **Annals of African medicine**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 121–126, 2019.

SINGH, P.; MOHAMMAD, K. S.; PELUS, L. M. CXCR4 expression in the bone marrow microenvironment is required for hematopoietic stem and progenitor cell maintenance and early hematopoietic regeneration after myeloablation. **Stem cells**, [s. l.], v. 38, n. 7, p. 849–859, 2020.

SONG, B. *et al.* Combined Detection of HER2, Ki67, and GSTP1 Genes on the Diagnosis

and Prognosis of Breast Cancer. **Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 85–90, 2019.

SONG, S. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor family proteins are multitasking cytokines in tissue injury. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, [s. l.], v. 79, n. 2, p. 105, 2022.

SONG, Y. K.; BILLIAR, T. R.; LEE, Y. J. Role of galectin-3 in breast cancer metastasis: involvement of nitric oxide. **The American journal of pathology**, [s. l.], v. 160, n. 3, p. 1069–1075, 2002.

SONG, E.; HU, H. **Translational Research in Breast Cancer: Biomarker Diagnosis, Targeted Therapies and Approaches to Precision Medicine**. [S. l.]: Springer, 2017.

SPADA, S. *et al.* Fibronectin as a multiregulatory molecule crucial in tumor matrix: from structural and functional features to clinical practice in oncology. **Journal of experimental & clinical cancer research: CR**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 102, 2021.

SSADH, H. A.; ABDULMONEM, W. A. Immunophenotyping of the cluster of differentiation 74, migration inhibitory factor, and cluster of differentiation 44 expression on human breast cancer-derived cell lines. **International journal of health sciences**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 17–24, 2019.

STAUNTON, D. E. *et al.* Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. **Cell**, [s. l.], v. 52, n. 6, p. 925–933, 1988.

STUMPTNER-CUVELETTE, P.; BENAROCH, P. Multiple roles of the invariant chain in MHC class II function. **Biochimica et biophysica acta**, [s. l.], v. 1542, n. 1-3, p. 1–13, 2002.

SUNAMI, E. *et al.* Estrogen receptor and HER2/neu status affect epigenetic differences of tumor-related genes in primary breast tumors. **Breast cancer research: BCR**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. R46, 2008.

SURATT, B. T. *et al.* Role of the CXCR4/SDF-1 chemokine axis in circulating neutrophil homeostasis. **Blood**, [s. l.], v. 104, n. 2, p. 565–571, 2004.

SUSEK, K. H. *et al.* The Role of CXC Chemokine Receptors 1-4 on Immune Cells in the Tumor Microenvironment. **Frontiers in immunology**, [s. l.], v. 9, p. 2159, 2018.

TAILOR, A.; COOPER, D.; GRANGER, D. N. Platelet-vessel wall interactions in the microcirculation. **Microcirculation**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 275–285, 2005.

TANG, H.; LI, H.; SUN, Z. Targeting myeloid-derived suppressor cells for cancer therapy. **Cancer biology & medicine**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 992–1009, 2021.

TARABORRELLI, S. Physiology, production and action of progesterone. **Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica**, [s. l.], v. 94 Suppl 161, p. 8–16, 2015.

TARNOWSKI, M. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor is secreted by rhabdomyosarcoma cells, modulates tumor metastasis by binding to CXCR4 and CXCR7 receptors and inhibits recruitment of cancer-associated fibroblasts. **Molecular cancer**

research: MCR, [s. l.], v. 8, n. 10, p. 1328–1343, 2010.

TENG, F. *et al.* Correction to: LncRNA MYLK-AS1 facilitates tumor progression and angiogenesis by targeting miR-424-5p/E2F7 axis and activating VEGFR-2 signaling pathway in hepatocellular carcinoma. **Journal of experimental & clinical cancer research: CR**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 277, 2020.

THIELE, M. *et al.* Selective Targeting of a Disease-Related Conformational Isoform of Macrophage Migration Inhibitory Factor Ameliorates Inflammatory Conditions. **Journal of immunology**, [s. l.], v. 195, n. 5, p. 2343–2352, 2015.

TOPALIAN, S. L.; DRAKE, C. G.; PARDOLL, D. M. Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. **Current opinion in immunology**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 207–212, 2012.

TRIMM, E.; RED-HORSE, K. Vascular endothelial cell development and diversity. **Nature reviews. Cardiology**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 197–210, 2023.

TSANG, J. Y. S.; TSE, G. M. Molecular Classification of Breast Cancer. **Advances in anatomic pathology**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 27–35, 2020.

TZAHAR, E. *et al.* A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. **Molecular and cellular biology**, [s. l.], v. 16, n. 10, p. 5276–5287, 1996.

VADREVU, S. K. *et al.* Complement c5a receptor facilitates cancer metastasis by altering T-cell responses in the metastatic niche. **Cancer research**, [s. l.], v. 74, n. 13, p. 3454–3465, 2014.

VAN VLERKEN-YSLA, L. *et al.* Functional states of myeloid cells in cancer. **Cancer cell**, [s. l.], v. 41, n. 3, p. 490–504, 2023.

VARTANIAN, A. *et al.* Melanoma vasculogenic mimicry capillary-like structure formation depends on integrin and calcium signaling. **Microcirculation**, [s. l.], v. 18, n. 5, p. 390–399, 2011.

WANG, X.; LI, X.; JIANG, W. High expression of RTN4IP1 predicts adverse prognosis for patients with breast cancer. **Translational cancer research**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 859–872, 2023.

WEBSITE. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://doi.org/10.36255/exon-publications-breast-cancer>.

WHITE, E. S. Lung extracellular matrix and fibroblast function. **Annals of the American Thoracic Society**, [s. l.], v. 12 Suppl 1, n. Suppl 1, p. S30–S33, 2015.

WU, S. Z. *et al.* A single-cell and spatially resolved atlas of human breast cancers. **Nature genetics**, [s. l.], v. 53, n. 9, p. 1334–1347, 2021.

XIE, J. *et al.* Integrin $\alpha 4$ up-regulation activates the hedgehog pathway to promote arsenic and benzo[*a*]pyrene co-exposure-induced cancer stem cell-like property and tumorigenesis. **Cancer letters**, [s. l.], v. 493, p. 143–155, 2020.

XIE, J. *et al.* Macrophage Migration Inhibitor Factor Upregulates MCP-1 Expression in an Autocrine Manner in Hepatocytes during Acute Mouse Liver Injury. **Scientific reports**, [s. l.], v. 6, p. 27665, 2016.

XU, Z. *et al.* **The Roles of Immune Cell Homeostasis in Cancer Research and Therapeutic Response**. [S. l.]: Frontiers Media SA, 2023.

XU, R.; BOUDREAU, A.; BISSELL, M. J. Tissue architecture and function: dynamic reciprocity via extra- and intra-cellular matrices. **Cancer metastasis reviews**, [s. l.], v. 28, n. 1-2, p. 167–176, 2009.

YANG, Y.; CHEN, X.; MA, C. Insulin receptor is implicated in triple-negative breast cancer by decreasing cell mobility. **Journal of biomedical research**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 189–196, 2020.

YAŞAR, P. *et al.* Molecular mechanism of estrogen-estrogen receptor signaling. **Reproductive medicine and biology**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 4–20, 2017.

YASUDA, T.; BABA, H.; ISHIMOTO, T. Cellular senescence in the tumor microenvironment and context-specific cancer treatment strategies. **The FEBS journal**, [s. l.], v. 290, n. 5, p. 1290–1302, 2023.

YATES, L. R.; CAMPBELL, P. J. Evolution of the cancer genome. **Nature reviews. Genetics**, [s. l.], v. 13, n. 11, p. 795–806, 2012.

YEUNG, T.-L. *et al.* Abstract 2096: Multicellular modeling and identification of protein ligand-mediated and exosome-mediated crosstalk signaling cascades in the heterogeneous ovarian tumor microenvironment. **Cancer research**, [s. l.], v. 78, n. 13_Supplement, p. 2096–2096, 2018.

ZHANG, H. *et al.* CXCL2/MIF-CXCR2 signaling promotes the recruitment of myeloid-derived suppressor cells and is correlated with prognosis in bladder cancer. **Oncogene**, [s. l.], v. 36, n. 15, p. 2095–2104, 2017.

ZHANG, W. *et al.* Endothelial cells promote triple-negative breast cancer cell metastasis PAI-1 and CCL5 signaling. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 276–288, 2018.

ZIELIŃSKA, K. A.; KATANAEV, V. L. The Signaling Duo CXCL12 and CXCR4: Chemokine Fuel for Breast Cancer Tumorigenesis. **Cancers**, [s. l.], v. 12, n. 10, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers12103071>.

ZLOTNIK, A.; BURKHARDT, A. M.; HOMEY, B. Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis. **Nature reviews. Immunology**, [s. l.], v. 11, n. 9, p. 597–606, 2011.

ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. **Immunity**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 121–127, 2000.

ZOU, Y. R. *et al.* Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. **Nature**, [s. l.], v. 393, n. 6685, p. 595–599, 1998.

INCA - Instituto Nacional do Câncer - Ministério da Saúde: **Atlas de Mortalidade do**

Câncer. 2020- acesso - 12/09/2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all. Geneva: **World Health Organization**; 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Cancer: Fact Sheet. **World Health Organization**; 2022.