



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO
DESENVOLVIMENTO

Isadora Campanha Dias

**Investigando a influência das células tumorais disseminadas na medula óssea
na hematopoiese: uma análise computacional de sc-RNAseq**

Florianópolis

2024

Isadora Campanha Dias

**Investigando a influência das células tumorais disseminadas na medula óssea
na hematopoiese: uma análise computacional de sc-RNAseq**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Biologia Celular e do Desenvolvimento

Orientador(a): Prof. Dr. Geisson Marcos Nardi
Coorientador: Prof. Dr. Edroaldo Lummertz da Rocha

Florianópolis

2024

Campanha Dias, Isadora

Investigando a influência das células tumorais disseminadas na medula óssea na hematopoiese : uma análise computacional de sc-RNAseq / Isadora Campanha Dias ; orientador, Geisson Marcos Nardi, coorientador, Edroaldo Lummertz da Rocha, 2024.

56 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Single Cell RNA seq. 3. Metástase óssea. 4. Interações celulares. 5. Biologia computacional. I. Marcos Nardi, Geisson. II. Lummertz da Rocha, Edroaldo. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. IV. Título.

Isadora Campanha Dias

**Investigando a influência das células tumorais disseminadas na medula óssea
na hematopoiese: uma análise computacional de sc-RNAseq**

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 29 de fevereiro de 2024, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Alfeu Zanotto Filho
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Ricardo Castilho Garcez
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 Mestra em Biologia Celular e do Desenvolvimento

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Geisson Marcos Nardi
Orientador

Florianópolis, 2024

Dedico essa obra a todos aqueles que contribuíram para ciência, mas não tiveram seu valor reconhecido: às mulheres, aos povos negros e indígenas, com a medicina da floresta, e a todos que foram silenciados. Nossa voz ecoa.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, expresso minha gratidão à minha família, especialmente aos meus pais, Celene Saraiva e Antonio Gomes, pelo imensurável apoio e incentivo ao longo de toda minha jornada como eterna estudante.

Agradeço ao Professor Dr. Geisson Marcos Nardi, meu orientador por suas contribuições, e ao Professor Dr. Edroaldo Lummertz da Rocha, meu co-orientador, dedico especial apreço, por acreditar em mim, e me apoiar nas decisões tomadas neste trabalho, sua paciência e a parceria foi fundamental. É um exemplo de orientador, cientista e ser humano.

Ao laboratório de biologia de sistemas, expresso meus agradecimentos pelo suporte e pela oportunidade de aprendizado em biologia computacional e biologia de sistemas.

Aos colegas de laboratório e do CCB que tornaram este trabalho mais leve, em particular à Dra. Gabriela Luiz, agradeço pela partilha de conhecimentos como bioinformata, pelo tempo dedicado e amizade.

À Adriana Russo, minha gratidão pelo acolhimento durante todo o processo de mestrado. Sem a sua presença e apoio, eu não teria conseguido prosseguir nessa trajetória desafiadora.

Ao programa de pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, bem como aos seus professores, por semear o conhecimento que gerou tantos frutos, sendo este projeto um deles.

Às agências de fomento Serrapilheira e CAPES, por tornarem possível o desenvolvimento desta pesquisa.

Por isso que os nossos velhos dizem: "Você não pode se esquecer de onde você é e nem de onde você veio, porque assim você sabe quem você é e para onde você vai". Isso não é importante só para a pessoa do indivíduo, é importante para o coletivo, é importante para uma comunidade humana saber quem ela é, saber para onde ela está indo. (Krenak, 2009)

RESUMO

Este estudo investigou as alterações hematopoiéticas decorrentes da presença de células tumorais circulantes (CTCs) na medula óssea, analisando interações celulares e moleculares no microambiente metastático. Identificou-se uma rede de comunicações celulares e vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento metastático do câncer de próstata. Ao isolar as células progenitoras hematopoiéticas, observaram-se modificações no ciclo celular e na expressão gênica associada à ativação imunológica. Isso sugere um impacto direto das CTCs na hematopoiese medular, comprometendo a homeostase. Os resultados destacaram genes com expressão significativa nas amostras tumorais, indicando seu potencial papel na regulação gênica e metabólica. A análise das vias de sinalização revelou o envolvimento do fator de transcrição NFκB, fundamental na resposta inflamatória e imunológica, sugerindo sua influência na hematopoiese e no desenvolvimento tumoral. A interação entre CTCs e células do microambiente ósseo, como osteoblastos e macrófagos, foi evidenciada. Essa interação é mediada por moléculas de adesão, como VCAM-1, promovendo a adesão das células tumorais aos osteoblastos e influenciando a colonização e proliferação metastática no tecido ósseo. Além disso, foram identificados genes associados à alteração hematopoiética, como CCL4 e CD79, indicando o impacto das CTCs na dinâmica celular na medula óssea. Esses achados fornecem insights sobre os mecanismos subjacentes à disseminação do CaP para o tecido ósseo, destacando a importância das interações celulares e moleculares no microambiente metastático. Essa compreensão é fundamental para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionadas e o avanço no tratamento do câncer de próstata metastático.

Palavras-chave: câncer de próstata, metástase óssea, RNA de célula única, nicho metastático, hematopoiese.

ABSTRACT

This study investigated hematopoietic changes resulting from the presence of circulating tumor cells (CTCs) in the bone marrow, analyzing cellular and molecular interactions in the metastatic microenvironment. A network of cellular communications and signaling pathways involved in the metastatic development of prostate cancer (PCa) was identified. Isolating hematopoietic progenitor cells revealed modifications in the cell cycle and gene expression associated with immune activation, suggesting a direct impact of CTCs on bone marrow hematopoiesis, compromising homeostasis. The results highlighted genes with significant expression in tumor samples, indicating their potential role in gene regulation and metabolism. Pathway analysis revealed the involvement of the transcription factor NFκB, crucial in the inflammatory and immune response, suggesting its influence on hematopoiesis and tumor development. The interaction between CTCs and cells in the bone microenvironment, such as osteoblasts and macrophages, was evident. This interaction is mediated by adhesion molecules like VCAM-1, promoting the adhesion of tumor cells to osteoblasts and influencing metastatic colonization and proliferation in bone tissue. Additionally, genes associated with hematopoietic alteration, such as CCL4 and CD79, were identified, indicating the impact of CTCs on cellular dynamics in the bone marrow. These findings provide insights into the mechanisms underlying the spread of PCa to bone tissue, emphasizing the importance of cellular and molecular interactions in the metastatic microenvironment. This understanding is crucial for the development of targeted therapeutic strategies and advancements in the treatment of metastatic prostate cancer.

Keywords: prostate cancer; bone metastasis; single-cell RNA; metastatic niche; hematopoiesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas do processo de disseminação metastática	20
Figura 2. Fluxo de Trabalho na Análise de Dados de sc-RNAseq	27
Figura 3 Perfil celular tumoral	34
Figura 4 Gráfico de proporções celulares	35
Figura 5 Gráfico de proporções celulares detalhado	36
Figura 6 Força de interações entre grupos celulares.	38
Figura 7 Vias enriquecidas em progenitores	39
Figura 8 Ontologia gênica em progenitores	40
Figura 9 Genes expressos em progenitores	41
Figura 10 Vias enriquecidas em Macrófagos	43
Figura 11 Vias enriquecidas em Pró-B	44
Figura 12 Ligantes e receptores entre células endoteliais e tumorais	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CTC	Célula Tumoral Circulante
CTD	Célula Tumoral Disseminada
FoxO	Forkhead box O
FUSCA	Framework For Unified Single-Cell Analysis
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
HSC	Hematopoietic Stem Cells
KEGG	Kyoto Encyclopedia Of Genes And Genomes
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MEC	Matriz Extra Celular
MO	Medula Óssea
NF_Kappa B	Nuclear factor-κB
NK	Natural Killers
PCa	Prostate Cancer
PCA	Principal Component Analysis
sc-RNAseq	Single Cell RNA Sequencing
TAM	Tumor Associated Macrophages
TNF	Tumor Necrose Factor
IL-17	Interleucina 17
UMAP	Uniform Manifold Approximation And Projection

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 CÂNCER DE PRÓSTATA	16
1.2 FORMAÇÃO DO NICHOS PRÉ-METASTÁTICO	17
1.3 METÁSTASE ÓSSEA NO CÂNCER DE PRÓSTATA E INTERAÇÕES CELULARES	19
1.4 INTERAÇÕES MOLECULARES NO MICROAMBIENTE ÓSSEO	21
1.5 IMUNOSSUPRESSÃO, DORMÊNCIA CELULAR E NOVAS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS	22
1.6 SEQUENCIAMENTO DE RNA DE CÉLULA ÚNICA NA INTERFACE TUMOR-MEDULA ÓSSEA	23
1.7 PERSPECTIVAS E DESAFIOS FUTUROS NA BIOLOGIA DE SISTEMAS DO CÂNCER	24
1.8 CONSIDERAÇÕES SOBRE ESTE ESTUDO	25
2. OBJETIVO	26
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
2.1.1 Analisar as interações realizadas entre as células imunes e tumerais	26
2.1.2 Prever redes de interação dos pares de ligantes e receptores entre tipos celulares e células progenitoras hematopoiéticas	26
2.1.3 Compreender vias de regulação hematopoiética neste contexto	27
3 METODOLOGIA	27
3.1 ORIGEM DOS DADOS	27
3.2 PROCESSAMENTO DE DADOS	29
3.3 CONTROLE DE QUALIDADE	29
3.4 REDUÇÃO DIMENSIONAL	30
3.5 ANÁLISE DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS	31
3.6 INTERAÇÕES LIGANTES-RECEPTOR	32

3.7 VIAS DE ENRIQUECIMENTO DE GENES	32
4 RESULTADOS	33
4.1 GRUPOS CELULARES	33
4.2 REDES DE INTERAÇÕES E COMUNICAÇÃO CELULAR	37
4.3 VIAS DE ENRIQUECIMENTO DE GENES	38
4.3 EXPRESSÃO GÊNICA	40
4.4 VIAS DE SINALIZAÇÃO	42
4.4.1 Macrófagos	42
4.4.2 Pró- B	43
4.5 RELAÇÃO LIGANTE-RECEPTOR	44
DISCUSSÃO	47
CONCLUSÃO	52

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE PRÓSTATA

O câncer de próstata (do inglês, prostate cancer - PCa), uma das neoplasias mais prevalentes em homens, continua a ser um desafio significativo para a saúde global. Com uma incidência considerável, a progressão da doença para estágios avançados muitas vezes resulta em complicações graves, destacando a necessidade premente de uma compreensão aprofundada dos mecanismos que envolvem a disseminação do tumor. Este cenário é agravado pelo fato de o PCa ser o segundo diagnóstico de câncer mais frequente em homens e a quinta principal causa de morte em todo o mundo (RAWLA, 2019; REBELLO et al., 2021)

Com base nas estimativas do GLOBOCAN 2018, foram relatados 1.276.106 novos casos de PCa ao redor do mundo naquele ano, com uma prevalência mais elevada em países desenvolvidos. As diferenças nas taxas de incidência global refletem disparidades no uso de testes diagnósticos, e as taxas de incidência e mortalidade por PCa estão fortemente relacionadas à idade, com a incidência mais alta observada em homens acima dos 65 anos de idade (BRAY et al., 2018)

Acredita-se que o PCa esteja fortemente associado à acumulação de mutações somáticas no genoma das células epiteliais da próstata ao longo da vida de um paciente. Essas modificações genéticas específicas, tais como a fusão do gene TMRSS2 com genes da família ETS, a amplificação do oncogene MYC, e a deleção e/ou mutação do PTEN e TP53, são observadas (AHMED; EELES, 2016). Em estágios avançados da doença, ocorre ainda a amplificação e/ou mutação do receptor de androgênio. Essas alterações podem afetar oncogenes ou genes supressores de tumores, resultando em mudanças na transcrição e/ou tradução genética e defeitos funcionais, o que, por sua vez, leva a uma desregulação na homeostase celular (AHMADIYEH et al., 2010; REBELLO et al., 2021).

Uma das características distintivas do PCa avançado é a propensão para metastatizar, frequentemente manifestando-se por meio de metástases ósseas. A medula óssea emerge como um ambiente propício para a disseminação dessas células tumorais, apresentando implicações clínicas significativas na medida em que compromete não apenas a saúde óssea, mas também desencadeia alterações

complexas no microambiente circundante (BUBENDORF et al., 2000; SHIAO; CHU; CHUNG, 2016).

No câncer de próstata, a metástase ocorre quando as células cancerígenas se disseminam do tumor primário na próstata para outras partes do corpo, como os ossos, pulmões ou fígado. É um processo complexo que envolve várias etapas, incluindo a invasão das células cancerígenas nos vasos sanguíneos ou linfáticos, a circulação das células cancerígenas pelo corpo e a colonização das células cancerígenas em um novo local (JIN; DAYYANI; GALLICK, 2011; VAN ZIJL; KRUPITZA; MIKULITS, 2011)

1.2 FORMAÇÃO DO NICHOS PRÉ-METASTÁTICO

Embora a metástase seja um processo complexo, acredita-se que a colonização metastática bem-sucedida ocorra apenas em determinados órgãos. Anteriormente, acreditava-se que as propriedades mecânicas do fluxo sanguíneo fossem importantes para a disseminação das células tumorais, as quais poderiam colonizar o corpo de forma aleatória (LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2017).

No entanto, no final do século XIX, Stephen Paget, postulou a teoria chamada "the soil and seeds", que sugere que as células tumorais não colonizam o corpo de forma aleatória, mas sim que a disseminação depende de uma interação específica entre as células tumorais ("sementes") e o ambiente do órgão alvo ("o solo"). Essa teoria destaca a importância do microambiente do órgão alvo na metástase e tem implicações significativas para fundamentação de diversos estudos posteriores que visam prevenir ou tratar a metástase (MATHOT; STENNINGER, 2012)

Foi apenas em 1970 que surgiram novas pesquisas que demonstraram a existência de uma rede de comunicações entre o tumor primário e o local de metástase que é estabelecida antes mesmo da chegada das células tumorais disseminadas (CTD) no órgão sólido (KAPLAN; PSAILA; LYDEN, 2006; LIU; CAO, 2016).

As células cancerígenas migram para o ambiente ósseo, que fornece fatores de crescimento e citocinas que promovem o crescimento e a sobrevivência das células cancerígenas. Os locais permissivos para a alocação das células são chamados de nicho pré-metastático, um ambiente propício para a colonização das

CTD. Ele é formado por uma série de alterações no microambiente do órgão específico, incluindo a liberação de fatores de crescimento e citocinas, a ativação de células estromais e a remodelação da matriz extracelular (KAPLAN; PSAILA; LYDEN, 2006)

Essas alterações são induzidas pelo tumor primário e preparam o nicho para a chegada das CTD. A comunicação entre o tumor primário e o nicho pré-metastático é mediada por várias moléculas, incluindo fatores de crescimento, citocinas e exossomos. (LIU et al., 2023). Essas moléculas são liberadas pelo tumor primário e viajam pela corrente sanguínea até o órgão onde ocorrerá a metástase, onde ativam as células estromais e induzem as alterações no microambiente (FARES et al., 2020).

As características físicas dos tecidos primários encontrados no tumor e nos órgãos distantes para onde ele se espalha podem, em certa medida, justificar a preferência de alguns tumores por determinados órgãos. No entanto, pesquisas recentes sobre as complexas interações entre as células tumorais circulantes e os órgãos onde se estabelecem preferencialmente mostram que certas moléculas sinalizadoras desempenham um papel crucial nesse processo de preferência por órgãos específicos. A jornada das CTCs nos vasos sanguíneos apresenta desafios significativos, uma vez que essas células detectam e respondem às complexidades da mecânica tecidual, desencadeando alterações temporárias ou duradouras, como enrijecimento, compressão e deformação da matriz extracelular (MEC), desdobramento de proteínas, remodelação proteolítica e transições de bloqueio. (PEREA PAIZAL; AU; BAKAL, 2021)

Em pacientes com câncer, um grande número de CTD são liberadas frequentemente na circulação. No entanto, estudos sugerem que menos de 0,1% das CTD metastatizam com sucesso. Isso aponta que a maioria das CTD é eliminada pelo sistema imunológico ou não é capaz de se adaptar ao ambiente do órgão alvo (LUZZI et al., 1998)

O processo de metástase à distância é influenciado pela interação das CTCs com as pressões mecânicas, particularmente durante a paragem em locais distantes e o subsequente extravasamento, além do crescimento metastático. A eficácia do alojamento das CTCs em locais distantes e os regimes de fluxo permissivos em regiões vasculares desempenham papéis cruciais nesse contexto. Em regiões de baixo fluxo hemodinâmico, as CTCs estabilizam-se, formando aglomerados

intravasculares ao interagir com células endoteliais. A fixação na microvasculatura é seguida pela fragmentação das CTCs pelo fluxo sanguíneo, gerando moléculas intermediárias que, ao interagirem com o sistema imunológico, promovem o extravasamento e o desenvolvimento de metástases a partir das CTCs sobreviventes (LUZZI et al., 1998).

A validação dessa hipótese pode ser vista em pacientes com metástases cerebrais, que se formaram em regiões de baixo fluxo sanguíneo cerebral, mas se alocam em um sítio distante, destacando a rede de diversos fatores que ocorrem para a determinação do local final de parada das CTCs. (FOLLAIN et al., 2018)

1.3 METÁSTASE ÓSSEA NO CÂNCER DE PRÓSTATA E INTERAÇÕES CELULARES

No caso do PCa, a metástase mais comum é para os ossos, especialmente para a coluna vertebral, pelve e costelas. Além disso, as células cancerígenas da próstata podem interagir com as células do sistema imunológico e escapar da vigilância imunológica na medula óssea (JIN; DAYYANI; GALLICK, 2011). Além de poder levar a complicações graves, incluindo dor óssea, fraturas patológicas e compressão medular (ITKIN et al., 2016). A metástase conforme representada na figura 1, é um processo que envolve a disseminação de células tumorais do tumor primário para locais secundários através do fluxo sanguíneo ou linfático (LEONG et al., 2021) onde ocorre uma cascata de eventos que envolve a invasão das células tumorais no tecido circundante, a intravasação no sistema circulatório, a sobrevivência na corrente sanguínea, a extravasação em um novo tecido e a colonização em órgãos secundários (FARES et al., 2020; VAN ZIJL; KRUPITZA; MIKULITS, 2011). Esse processo é influenciado por vários fatores, incluindo a capacidade das células tumorais de se adaptarem ao ambiente do órgão metastático, a interação com células do sistema imunológico e a presença de fatores de crescimento e citocinas.

A medula óssea é um local com alta vascularização e rica em células estromais, e células progenitoras hematopoiéticas. Essas células estromais desempenham um papel importante na regulação do crescimento e diferenciação celular, bem como na manutenção do microambiente da medula óssea (CRIPPA;

BERNARDO, 2018). Isso significa que é um local onde as células tumorais podem interagir com as células do sistema imunológico, sendo este também é um local de produção de fatores de crescimento e citocinas que podem promover o crescimento e a sobrevivência das células tumorais (KANDARAKOV; BELYAVSKY; SEMENOVA,2022).

Figura 1. Etapas do processo de disseminação metastática

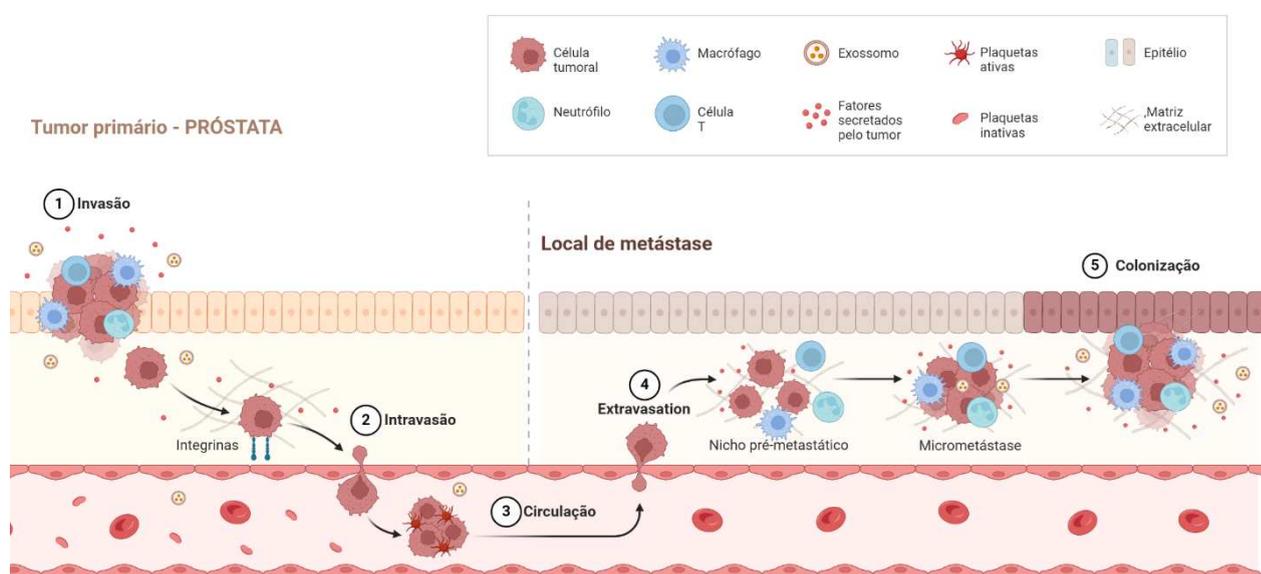


Figura 1. Representação esquemática das Células Tumorais Circulantes. (1) Início do processo de invasão celular, destacando o papel crucial das integrinas na facilitação da separação das CTCs do tumor primário. (2) Intravasão celular: As CTCs rompem barreiras teciduais, atravessam a membrana basal e infiltram-se nos vasos sanguíneos, permitindo sua entrada na corrente sanguínea. (3) Circulação das CTCs: Na corrente sanguínea, as CTCs enfrentam condições adversas e resistem às defesas do organismo enquanto viajam pelo sistema circulatório. (4) Extravasation celular no nicho pré-metastático: Após circular no sangue, as CTCs extravasam nos tecidos adjacentes ao local de origem, estabelecendo-se no como nicho pré-metastático. iniciando a formação de micro metástases, frequentemente envolvidas por células mieloides. (5) Colonização em locais distantes. As CTCs estabelecidas no nicho pré-metastático desenvolvem micro metástases, colonizando áreas distantes do local original. Esse processo envolve interações complexas com as células do microambiente circundante, influenciando a resposta imunológica e o desenvolvimento das metástases. Fonte: Elaborado pela autora

Há muito se sabe que este é um órgão primariamente hematopoiético e representa um reservatório único para vários tipos de células imunes, como células dendríticas ou células supressoras derivadas de mieloides, que têm a capacidade de influenciar dramaticamente a trajetória da doença maligna. As células mieloides são

um componente importante do sistema imunológico inato e desempenham um papel crítico no microambiente tumoral. Essas são capazes de influenciar a resposta imune adaptativa do tumor, bem como a resposta ao tratamento desta neoplasia.

Estudos indicam que as células mieloides podem suprimir a resposta imune adaptativa do tumor, tornando as células tumorais menos suscetíveis à destruição pelo próprio sistema imunológico (NEOPHYTOU et al., 2020; VINAY et al., 2015). Além disso, influenciam na angiogênese, o crescimento tumoral e a metástase, através da secreção de fatores de crescimento e citocinas, influenciando de diversas formas na formação, homing e evolução do quadro metastático (KANDARAKOV; BELYAVSKY; SEMENOVA, 2022)

1.4 INTERAÇÕES MOLECULARES NO MICROAMBIENTE ÓSSEO

A expressão de moléculas na superfície celular desempenha um papel crucial no desenvolvimento do microambiente favorável à proliferação celular no osso durante a metástase óssea. Moléculas como as quimiocinas da família CXC, o complexo das integrinas $\alpha\beta3$ /RANK, o receptor de adesão celular CD 44 e os receptores de anexina possibilitam a ligação das células tumorais às células endoteliais (HOFBAUER; SCHOPPET, 2004; LIU; WANG; CHEN, 2008; SENBANJO; CHELLAIAH, 2017).

Essa interação promove um ambiente propício para o desenvolvimento das células metastáticas no osso (HENSEL; THALMANN, 2016). Adicionalmente, a secreção de substâncias pró-inflamatórias pelas células tumorais estimula a osteólise óssea, favorecendo ainda mais o crescimento das células metastáticas no ambiente ósseo. (GENANT et al., 1996).

A literatura destaca que essa interação entre células tumorais e o microambiente ósseo não apenas favorece a progressão tumoral (HIRAGA, 2019; KINGSLEY et al., 2007a), mas também perturba as interações normais entre osteoclastos e osteoblastos, resultando em um desequilíbrio no remodelamento ósseo (POLASCIK, 2009). Essa perturbação, por sua vez, pode levar à evolução da resistência aos quimioterápicos e à capacidade das células tumorais de manipular a biologia óssea para sua própria sobrevivência (BUENROSTRO et al., 2016; ZHANG, 2019).

Em condições fisiológicas normais, o remodelamento ósseo é mantido por um equilíbrio entre a atividade dos osteoblastos, responsáveis pela síntese de osso novo, e dos osteoclastos, responsáveis pela reabsorção óssea (ZHANG, 2019). Contudo, a neoplasia óssea metastática altera esse processo, resultando em estruturação óssea osteolítica e formação óssea anormal pelos osteoblastos, desbalanceando a homeostase óssea (POLASCİK, 2009).

Células tumorais provenientes de cânceres de mama e próstata têm afinidade pelo tecido ósseo. Embora a maioria das células tumorais não sobreviva nesse ambiente, ele pode servir como um reservatório para células malignas, especialmente as células-tronco hematopoiéticas, que favorecem as células tumorais dormentes, manifestando-se muitos anos após o diagnóstico, caracterizando uma evolução lenta (COLEMAN et al., 2014).

1.5 IMUNOSSUPRESSÃO, DORMÊNCIA CELULAR E NOVAS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS

A imunossupressão desempenha um papel crucial no contexto da metástase óssea, onde as CTD encontram um ambiente propício para se estabelecerem e proliferarem. A utilização de técnicas avançadas, como a análise de single cells, tem proporcionado uma compreensão mais profunda da heterogeneidade celular presente no microambiente metastático. (GIANCOTTI, 2013; REINSTEIN et al., 2017) Nesse cenário, a presença das CTD exerce uma influência significativa na dinâmica do microambiente, particularmente na indução de dormência e quiescência celular.

Podemos ver a relação complexa e intrínseca que ocorre entre o microambiente medular com as células tumorais, como no caso da dormência celular, um estado de latência no qual as células tumorais permanecem inativas por períodos prolongados, o fenômeno da dormência metastática ocorre principalmente devido à adaptação tardia das células cancerosas disseminadas aos seus ambientes secundários específicos (GIANCOTTI, 2013). A imunossupressão na metástase óssea cria um ambiente imunologicamente tolerante, permitindo que as células tumorais evitem a detecção e a resposta imune do organismo hospedeiro, além da alteração das atividades celulares (ITKIN et al., 2016). Isso contribui para a

manutenção das CTD no tecido ósseo, aumentando a resistência aos tratamentos convencionais.

A dormência celular é um estado dinâmico, e as análises computacionais produzem importantes indicadores sobre as mudanças na progressão do ciclo celular das células tumorais ao longo do tempo. Essas análises não apenas indicam resultados promissores relacionados à dormência celular, mas também identificam alterações hematopoiéticas que desempenham um papel fundamental na promoção ou supressão da metástase óssea (GIANCOTTI, 2013)

As CTD que conseguem se fixar nos vasos sanguíneos do órgão alvo podem adotar diferentes comportamentos. Elas podem retomar seu crescimento, permanecer em um estado de dormência, onde ficam inativas por longos períodos, ou formar pequenas lesões metastáticas que permanecem inativas e não detectadas. Esses diferentes destinos podem ser influenciados por mecanismos como a vigilância do sistema imunológico e a limitação do suprimento de sangue, que restringem a capacidade das CTCs de se proliferarem e de formarem metástases em larga escala. Estudos indicam que a interação entre as CTCs e o ambiente do órgão é crucial para determinar se as CTCs entram em dormência ou se tornam metastáticas, e também para regular a transição entre esses estados. Um ponto importante é que a capacidade das CTCs de permanecerem dormentes está ligada à ausência de mudanças genéticas que as tornam capazes de crescer de forma independente ou de responder aos sinais de crescimento do ambiente do órgão. (Aguirre-Ghiso, 2007; Kauffman et al., 2003; Pantel & Brakenhoff, 2004).

Estudos que abordam o tema são potenciais para novas abordagens terapêuticas. Desenvolver estratégias direcionadas para modular as respostas hematopoiéticas no microambiente metastático pode abrir caminho para tratamentos mais eficazes e personalizados. Portanto, as pesquisas que exploram esses aspectos são fundamentais para avançar no entendimento da metástase óssea e para desenvolver abordagens inovadoras que visem interromper a disseminação e o crescimento das células tumorais no tecido ósseo.

1.6 SEQUENCIAMENTO DE RNA DE CÉLULA ÚNICA NA INTERFACE TUMOR-MEDULA ÓSSEA

A análise computacional de sequenciamento de RNA de célula única (sc-RNAseq) emergiu como uma ferramenta revolucionária na pesquisa biológica, permitindo a avaliação do transcriptoma a nível de célula individual (HEUMOS et al., 2023a, 2023b). Nos estudos oncológicos, essa abordagem tem proporcionado análises aprofundadas sobre a heterogeneidade tumoral, a dinâmica da progressão do câncer e as interações entre células tumorais e seu microambiente.

A técnica de sc-RNAseq possibilita a caracterização de populações celulares heterogêneas identificando subpopulações celulares, estados transicionais e marcadores moleculares específicos que podem orientar avanços na medicina personalizada. A análise computacional de sc-RNAseq permite a investigação das interações complexas entre células tumorais e o microambiente circundante. A identificação de vias de sinalização e fenômenos de imunomodulação que são cruciais para compreender a dinâmica tumoral (REINSTEIN et al., 2017)

Estudos oncológicos têm utilizado a análise de sc-RNAseq para identificar biomarcadores, prognósticos e preditivos, discernir subtipos tumorais e caracterizar a plasticidade celular (COCHAIN et al., 2018; KIM; XU; MARIGNANI, 2021; MIN et al., 2015; PATEL et al., 2014; XU et al., 2020), pois a compreensão do comportamento dos tumores é crucial para avanços significativos no tratamento dessa neoplasia. Nesse contexto, uma hipótese intrigante emerge: a de que os tumores buscam estabelecer interações específicas com a medula óssea, uma região essencial para a produção de células do sangue. Essa relação entre os tumores e a medula óssea sugere uma estratégia evolutiva por parte das células cancerígenas, visando reprogramar as células hematopoiéticas.

A reprogramação das células hematopoiéticas pela influência dos tumores na medula óssea levanta questões fundamentais sobre como essa manipulação afeta a saúde do paciente. Pode resultar em alterações no sistema imunológico e na produção anormal de células sanguíneas, comprometendo a capacidade do organismo de se defender contra doenças e infecções secundárias. Além disso, a hipótese destaca a complexidade do câncer como uma doença não isolada, mas como um sistema dinâmico que interage com outros componentes do organismo. Essa abordagem é essencial para avançar na compreensão do câncer e na identificação de alvos terapêuticos, além de tentar compreender a interação entre tumores e medula óssea visando não apenas a eliminação das células

cancerígenas, mas também a restauração da homeostase do sistema hematopoiético.

1.7 PERSPECTIVAS E DESAFIOS FUTUROS NOS ESTUDOS DE BIOLOGIA DE SISTEMAS DO CÂNCER

No contexto da biologia do câncer, parte das análises se concentram na compreensão molecular, uma área de destaque é a compreensão do papel das células tumorais na medula óssea. Esse enfoque visa desvendar as complexas interações entre as células tumorais e o microambiente ósseo (KOUTSI; VERVESOU, 2018). Entre os desafios atuais, destaca-se a heterogeneidade intrínseca das células tumorais e a dinâmica das interações com as células da medula óssea. A compreensão dessas complexidades é fundamental para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficazes.

O uso de técnicas avançadas, como o sc-RNAseq, tem revolucionado a forma de pesquisa na biologia de sistemas. Essas técnicas proporcionam uma visão mais detalhada das características moleculares das células tumorais na medula óssea (OLSEN; BARYAWNO, 2018).

Há diversos desafios na compreensão e na modulação do microambiente ósseo. Estratégias que visam restaurar a homeostase óssea enquanto combatem as células tumorais exigem uma abordagem integrada e multidisciplinar.

Os avanços na compreensão das influências moleculares das células tumorais na medula óssea têm implicações clínicas significativas. A identificação de alvos moleculares específicos nas células tumorais da medula óssea pode abrir portas para tratamentos mais eficazes. A superação desses desafios e a realização de progressos dependem da colaboração interdisciplinar entre a biologia, a computação e a medicina. A busca por uma compreensão profunda desses processos complexos é um esforço conjunto para melhorar a abordagem clínica e a qualidade de vida dos pacientes.

1.8 CONSIDERAÇÕES SOBRE ESTE ESTUDO

A contribuição deste estudo reside na sua aspiração de proporcionar uma compreensão mais profunda de uma fase crucial na progressão tumoral. Ao compreender mais sobre os mecanismos moleculares subjacentes à interação entre as CTD e as células progenitoras hematopoiéticas, contribui para a literatura no fundamento do desenvolvimento de estratégias terapêuticas.

Além disso, a escolha de adotar uma perspectiva computacional destaca a importância da tecnologia na pesquisa em oncologia. O sc-RNAseq, como ferramenta analítica, permite uma visão mais detalhada e abrangente do transcriptoma.

A partir deste amplo cenário, o presente estudo concentra-se na influência das células tumorais na medula óssea em pacientes com PCa metastático, utilizando uma abordagem computacional de sequenciamento de RNA de célula única, para desvendar os mecanismos moleculares da interação complexa entre as CTD, e as células progenitoras hematopoiéticas, visando contribuir para uma compreensão mais profunda dessa etapa crucial na progressão tumoral.

À medida que avançamos neste campo, espera-se que os resultados aqui apresentados não apenas enriqueçam o conhecimento existente, mas também inspirem pesquisas futuras e, mais crucialmente, impactem positivamente a abordagem clínica e terapêutica para pacientes com câncer de próstata metastático

2. OBJETIVO

Analisar as alterações hematopoiéticas que ocorrem no microambiente medular metastático na presença de células tumorais disseminadas.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1.1 Analisar as interações realizadas entre as células imunes e tumorais

- Identificar os tipos específicos de células imunes e tumorais envolvidos na interação.
- Investigar os mediadores moleculares e sinalizações envolvidas nessas interações.

2.1.2 Prever redes de interação dos pares de ligantes e receptores entre tipos celulares e células progenitoras hematopoiéticas

- Identificar os ligantes e receptores expressos pelas células imunes e tumorais relevantes.
- Utilizar modelagem computacional para prever as interações potenciais entre ligantes e receptores.

2.1.3 Compreender vias de regulação hematopoiética neste contexto

- Analisar as vias de regulação hematopoiética associadas às células imunes e tumorais.
- Identificar os fatores regulatórios que influenciam a diferenciação e função das células hematopoiéticas
- Investigar como a regulação hematopoiética pode impactar a resposta imune antitumoral.

3 METODOLOGIA

3.1 ORIGEM DOS DADOS

Neste estudo, foram utilizados dados de scRNA-seq provenientes de amostras de medula óssea (MO) de dois grupos distintos. O primeiro grupo consistiu em pacientes com câncer de próstata que passaram por cirurgias emergenciais clinicamente indicadas devido a casos raros de compressão da medula espinhal causada pela extensão epidural de um tumor ou fratura patológica de um corpo vertebral. O segundo grupo foi composto por pacientes submetidos a cirurgias de substituição do quadril benigno. O fluxo do trabalho desta dissertação está representado na figura 2.

Figura 2. Fluxo de Trabalho na Análise de Dados de sc-RNAseq

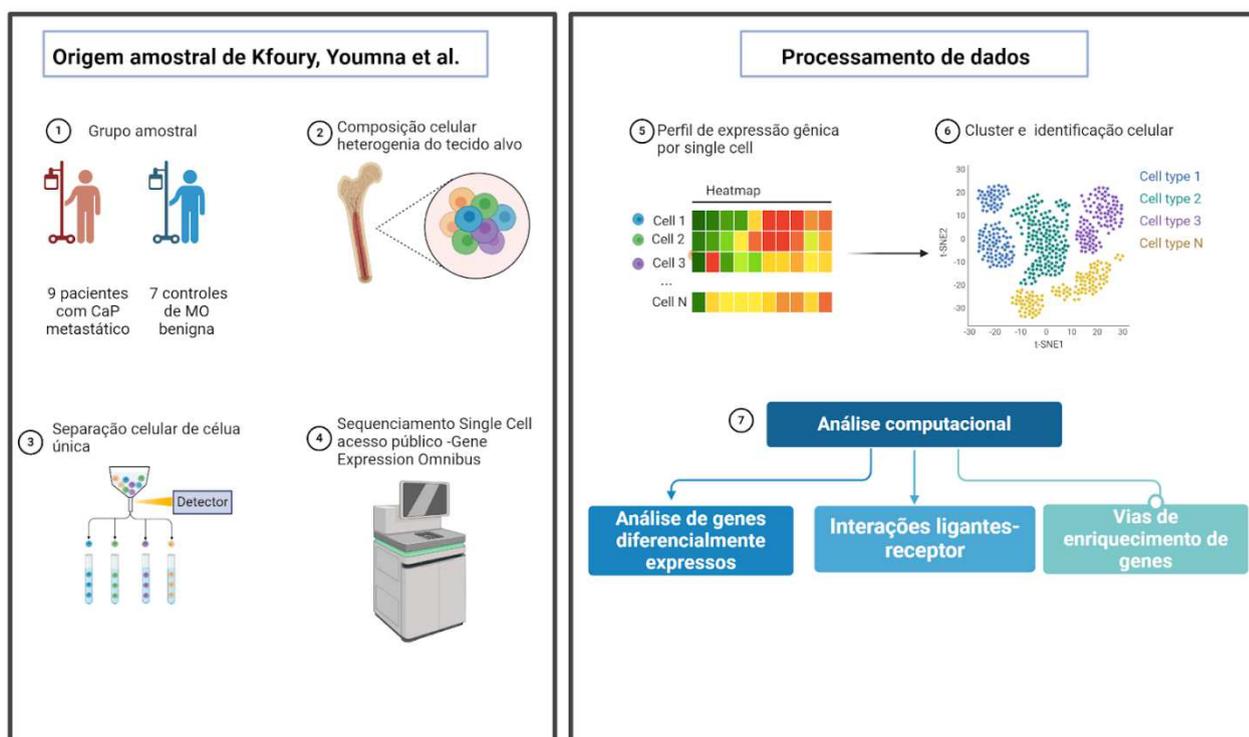


Figura 2. Ilustração do Fluxo de Trabalho: À esquerda, destacam-se os dados biológicos de domínio público, originados do trabalho de Kfoury, Youmna et al. À direita, apresenta-se um esquema detalhado do processamento dos dados de sc-RNAseq conduzido nesta dissertação. Fonte: Desenvolvido pela autora.

As amostras de MO foram selecionadas com o propósito de estabelecer um grupo de controle não maligno para permitir comparações com o grupo de pacientes com condições patológicas. Os pacientes do estudo são estadunidenses, o RNA-seq foi realizado e os dados mencionados foram disponibilizados em um banco de dados público. Estudos envolvendo seres humanos requerem aprovação ética, e na publicação original (KFOURY et al., 2021) os autores descrevem os procedimentos do comitê de ética a qual foi submetido.

Após a obtenção dos dados, para realizar as análises deste presente trabalho, foi utilizada a técnica de análise computacional de scRNA-seq, que permite examinar o perfil de expressão gênica em nível de célula individual. Cada amostra de MO continha, em média, 2.490 células que foram submetidas à análise, os resultados revelaram um número médio de 3.952 moléculas detectadas por célula. Essa informação é importante, pois indica a quantidade de atividade molecular que

pode ser observada em cada célula individualmente. Esses dados fornecem uma visão abrangente da expressão gênica presente nas amostras de MO.

Além disso, a presença de células tumorais foi avaliada com base na expressão de marcadores-chave relacionados ao câncer de próstata. Esses marcadores incluíram KLK4, KLK2 e AR, que são conhecidos por desempenhar um papel significativo no desenvolvimento e progressão do câncer de próstata. A detecção desses marcadores nas amostras de MO confirma a presença de células tumorais nos pacientes com câncer.

3.2 PROCESSAMENTO DOS DADOS

Os dados de scRNA-seq foram analisados no RStudio, utilizando a linguagem R versão através dos algoritmos de biologia de sistemas: o CellRouter e o CellComm. Esses algoritmos foram obtidos através do pacote Framework for unified single-cell analysis (FUSCA, versão 1.3.1), disponível em <https://github.com/edroaldo/fusca>. O FUSCA é um software essencial para a análise de dados de células únicas, pois integra várias etapas analíticas em um único pacote. Com ele, foi possível realizar as análises propostas neste trabalho.

O CellRouter e o CellComm representam duas ferramentas fundamentais no contexto da análise de dados de single-cell RNA sequencing (scRNA-seq), desempenhando papéis distintos e complementares na extração de informações valiosas a partir de dados complexos e heterogêneos (LUMMERTZ DA ROCHA et al., 2018)

O CellRouter destaca-se como uma ferramenta especializada na identificação de trajetórias celulares, oferecendo uma abordagem avançada para mapear e compreender o desenvolvimento e a diferenciação celular. Ao analisar os dados de scRNA-seq, o CellRouter destaca genes diferencialmente expressos, contribuindo para uma análise mais aprofundada das variações genéticas e funcionais entre as células. Por outro lado, o CellComm concentra-se na análise da comunicação intercelular, oferecendo uma perspectiva crucial sobre as interações entre as células em um ambiente complexo. Essa ferramenta permite a identificação e a caracterização das vias de comunicação entre diferentes tipos celulares, proporcionando insights sobre os sinais molecularmente mediados que desempenham um papel essencial na regulação do microambiente celular. Ao

destacar os aspectos comunicativos entre as células, o CellComm contribui para uma compreensão mais abrangente das redes celulares e seus papéis na homeostase e em processos patológicos (Lummertz Da Rocha et al., 2018).

Essas capacidades analíticas avançadas são essenciais para desvendar a complexidade dos sistemas biológicos em nível celular, proporcionando uma visão mais completa e detalhada das dinâmicas celulares em diferentes contextos fisiológicos e patológicos.

3.3 CONTROLE DE QUALIDADE

Para realizar a análise de dados de scRNA-seq, é fundamental garantir que os dados utilizados sejam de alta qualidade e que apenas as células de interesse sejam incluídas na análise. Para isso, os datasets em formato matriz foram utilizados para criar um objeto CellRouter, que é criado com base nos parâmetros da análise transcriptômica (RNA), o número mínimo de genes expressos por célula (neste trabalho foi incluído 200 genes/célula) e o mínimo de três células por matriz. Além disso, é considerado o valor de expressão mínimo igual a 0.

Esses parâmetros garantem a qualidade das células analisadas e a confiabilidade dos resultados. A análise transcriptômica identifica os genes expressos em cada célula, enquanto o número mínimo de genes expressos por célula assegura a inclusão apenas das células com expressão gênica relevante. O mínimo de três células por matriz fornece dados suficientes para análise, e o valor mínimo de expressão igual a zero assegura a inclusão de todas as células, independentemente do nível de expressão gênica.

3.4 REDUÇÃO DIMENSIONAL

Para observar os grupos celulares das amostras, foi gerado um gráfico UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection), essa representação é empregada para preservar a estrutura local dos dados, permitindo a visualização da heterogeneidade celular e a identificação de subpopulações celulares com

características moleculares distintas. Essa técnica é frequentemente utilizada em conjunto com outras técnicas de análise de dados genômicos para obter uma compreensão mais completa dos dados.

Foi utilizada a função `ComputePCA` é empregada para realizar a Análise de Componentes Principais (PCA, Principal Component Analysis), uma função que tem como objetivo identificar as direções de maior variabilidade nos dados e projetar os pontos de dados em um espaço de menor dimensão, mantendo o máximo de informação possível. Essa técnica é alcançada através da identificação dos componentes principais, que são combinações lineares das variáveis originais, permitindo visualizar a estrutura dos dados em um espaço reduzido.

A função `ComputeUMAP` por sua vez, é utilizada para realizar a projeção UMAP, um algoritmo de redução de dimensionalidade não linear amplamente utilizado na análise de dados de alta dimensionalidade.

`ComputePCA` e `ComputeUMAP` são ferramentas importantes para análise de dados genômicos, permitindo redução de dimensionalidade e visualização em espaço menor. PCA identifica fontes de variabilidade, enquanto UMAP preserva relações de proximidade entre células, auxiliando na identificação de subgrupos celulares e compreensão da heterogeneidade. Essas técnicas são amplamente utilizadas para obter compreensão completa dos dados e facilitar interpretação dos resultados.

3.5 ANÁLISE DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS

Para identificar os genes com expressão diferencial entre os grupos benigno e tumor, utilizou-se a função `compareTwoGroups` do FUSCA, que permite analisar as diferenças na expressão gênica. Essa função compara os dados de expressão gênica de cada célula nos dois grupos e aplica testes estatísticos, como o teste t de Student ou Mann-Whitney, para avaliar a significância das diferenças.

Para visualizar as informações de expressão gênica, os dados são representados em mapas de calor (heatmaps). Esses heatmaps são gerados usando a função `findSignatures` para identificar padrões de expressão gênica distintos em cada grupo. Em seguida, a função `PlotSignaturesHeatmap` foi utilizada para exibir visualmente os dados.

As anotações atribuídas a cada grupo celular foram determinadas com base na análise dos genes expressos, utilizando as anotações pré-estabelecidas obtidas pela função *findClusters*. Isso permite identificar e caracterizar os grupos celulares com base nas informações dos genes expressos.

3.6 INTERAÇÕES LIGANTES-RECEPTOR

A análise das interações ligante-receptor na biologia computacional representa um campo crucial dedicado a desvendar os intrincados laços moleculares entre moléculas de ligante e seus receptores biológicos correspondentes. No âmbito dessa investigação, o FUSCA emerge como uma ferramenta fundamental, aplicando uma abordagem avançada para analisar a expressão gênica e discernir os genes responsáveis pela codificação de ligantes e receptores biologicamente relevantes. A metodologia adotada pelo envolve a utilização de bancos de dados de anotação funcional, que fornecem informações cruciais sobre a função biológica específica de genes individuais. Esse enfoque permite uma análise aprofundada das características genéticas associadas às interações ligante-receptor

O uso de bancos de dados de anotação permite correlações entre a expressão gênica e as funções biológicas específicas das moléculas envolvidas. Esse contexto é fundamental para discernir as nuances das interações ligante-receptor em diversos contextos biológicos, desde processos fisiológicos normais até desregulações associadas a condições patológicas.

3.7 VIAS DE ENRIQUECIMENTO DE GENES

As vias de enriquecimento de genes no software FUSCA correspondem à identificação e análise das vias biológicas ou processos celulares que são aprimorados com genes expressos diferencialmente em grupos de células específicas. No FUSCA, esse tipo de análise é conduzido por meio de métodos de enriquecimento de genes, como a Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) ou análises de sobreposição de genes com conjuntos de genes previamente estabelecidos.

Essas análises de enriquecimento de genes possibilitam uma compreensão mais abrangente das funções biológicas e vias de sinalização envolvidas nos grupos de células estudados. Elas podem revelar quais vias estão ativas ou desreguladas em determinadas condições ou tipos celulares, fornecendo informações valiosas sobre os processos biológicos subjacentes.

Ao identificar as vias de enriquecimento de genes, o FUSCA auxilia na interpretação dos dados de expressão gênica em nível de célula única, oferecendo perspectivas sobre as funções biológicas e interações moleculares relevantes para os grupos de células analisadas.

4 RESULTADOS

4.1 GRUPOS CELULARES

As amostras utilizadas neste estudo foram submetidas à análise pelo software FUSCA permitiu a identificação de duas frações amostrais distintas: tumor, e benigno, conforme descrito na metodologia. Cada uma dessas frações foi analisada separadamente, posteriormente, os conjuntos de dados foram integrados para gerar uma análise integrada e anotação dos resultados obtidos. Essa abordagem permitiu uma análise mais abrangente e detalhada dos tipos celulares presentes em cada fração amostral, bem como das diferenças quantitativas entre elas.

Através do algoritmo utilizado foi possível observar um extenso repertório celular na análise de sc-RNAseq. Os 20 tipos celulares foram representados por um gráfico UMAP na Figura 3, que mostra a distribuição dos 20 tipos celulares em células estromais, tumorais e imunológicas. O UMAP é uma técnica de redução de dimensionalidade que permite visualizar dados complexos em um espaço bidimensional. Cada ponto no gráfico representa uma célula, e a cor indica o tipo celular. A distribuição dos pontos no gráfico mostra como os diferentes tipos celulares estão agrupados e separados uns dos outros. Por exemplo, podemos ver que os tipos celulares imunológicos estão agrupados em uma região específica do gráfico, enquanto os tipos celulares estromais e tumorais estão mais espalhados.

Nessa figura é possível observar, uma subpopulação imunológica composta por células B, macrófagos, monócitos, natural killers (NK), progenitores, células T (Naive T, helper T, CD8+ T) com o cluster um pouco mais distante dos demais, por ser formada fora do tecido medular. E células estromais, que estão presentes principalmente na parte interna da poção tumoral, incluem pericitos, células endoteliais, osteoblastos, osteoclastos, e também as próprias células tumorais.

Figura 3 – Perfil celular tumoral

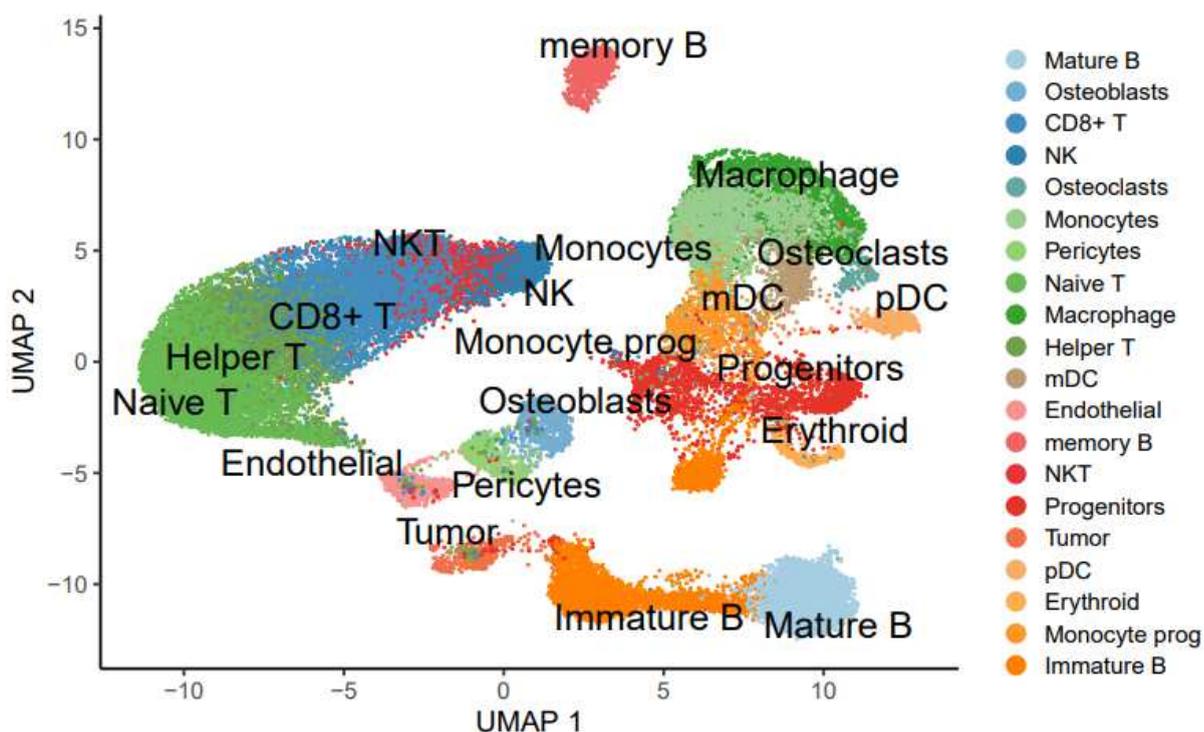


Figura 3. UMAP dos 20 tipos celulares, distribuídos entre células estromais, tumorais e imunológicas. A integração de todas as amostras revelou a presença de células imunes e hematopoiese em curso, com células progenitoras HSC dando origem a células B, monócitos e eritróides. Adicionalmente, subpopulações estromais foram identificadas, tais como endotélio, pericitos, osteoblastos, osteoclastos e células tumorais.

Foram contabilizadas em média 2.490 células por amostra, e 3.952 moléculas por célula. Além disso, foi realizada uma análise comparativa entre os grupos celulares, separando as proporções dos grupos tumoral e benigno como visto na Figura 4 que apresenta os 20 tipos celulares presentes nas amostras medulares. Os resultados obtidos demonstraram uma diminuição acentuada nas proporções celular de células B (madura e imatura) na porção benigna, enquanto houve um aumento crítico nas proporções de macrófagos, osteoclastos, osteoblastos, células endoteliais e pericitos. Essas diferenças quantitativas entre os grupos tumoral e benigno podem fornecer informações importantes, portanto foi realizada uma comparação detalhada das proporções entre os grupos mais distintos para uma melhor compreensão das diferenças quantitativas, conforme a Figura 5 apresenta, nela há uma comparação detalhada das proporções entre os grupos celulares distintos nas amostras benignas e tumorais. Cada barra representa a proporção de um tipo celular específico em cada amostra. As cores das barras indicam se o tipo celular é predominante na

amostra benigna (laranja) ou na amostra tumoral (azul). A comparação entre as proporções dos grupos celulares nas amostras benignas e tumorais fornece informações importantes sobre as diferenças quantitativas entre esses grupos em cada tipo de amostra.

A análise permitiu observar que as células B imaturas, maduras e Pró-B compõem as maiores porções na amostra benigna, enquanto na amostra tumoral a maior quantidade de células é encontrada são os macrófagos associados ao tumor (TAM - tumor associated macrophages). Para investigar a relação entre estes tipos celulares e o tumor foi feita uma análise de enriquecimentos de ambos os grupos.

Figura 4 - Gráfico de proporções celulares

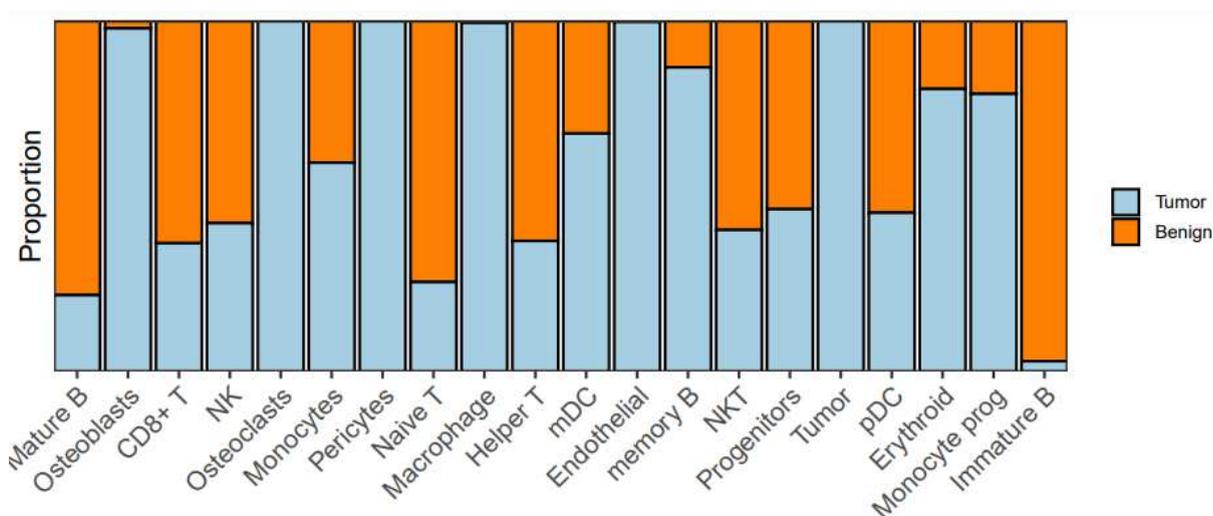


Figura 4. Proporções dos grupos celulares nas amostras medulares tumorais e benignas. Nessa figura, são apresentados os 20 tipos celulares mais representativos em cada tipo de amostra. Destaca-se os osteoblastos e osteoclastos, células endoteliais, macrófagos e células B.

Figura 5 - Gráfico de proporções celulares detalhado



Figura 5. Proporções celulares do grupo tumoral detalhada das proporções entre os grupos celulares mais distintos nas amostras benignas e tumorais. Cada barra representa a proporção de um tipo celular específico, sendo as cores das barras indicativas de predominância na amostra tumoral (azul claro) e na amostra benigna (azul escuro).

4.2 REDES DE INTERAÇÕES E COMUNICAÇÃO CELULAR

Para compreender a proximidade e interação entre os grupos celulares, foi gerado um heatmap de força de interação entre eles (Figura 6). Esse gráfico analisa a intensidade das interações ou associações entre diferentes grupos celulares no contexto biológico do ambiente metastático medular. Construído a partir de uma matriz de dados, cada célula no heatmap é preenchida com uma cor representando a força ou intensidade da interação entre os grupos celulares correspondentes. As linhas e colunas do heatmap representam os diversos tipos celulares identificados na análise de sc-RNAseq. As cores indicam a força da interação entre os tipos celulares; quanto mais forte a interação, ou seja, o maior número de interações entre os grupos celulares, mais escura é a cor da célula correspondente, e quanto mais fraca ou seja, menos interações, mais clara. Esse heatmap facilita a identificação de interações mais fortes ou mais fracas entre tipos celulares, fornecendo informações valiosas sobre a biologia do câncer e o ambiente metastático medular.

O gráfico revela que osteoblastos, macrófagos, células endoteliais e pericitos apresentam interações mais intensas entre si. A análise do gráfico de comunicação célula-célula permitiu avançar para a avaliação da intensidade de interação dos pares de ligantes e receptores dessas células com as células tumorais. Essa abordagem visa aprofundar a compreensão da comunicação entre as células do tumor e as células imunológicas mais interativas. Esses resultados proporcionam uma visão mais detalhada das dinâmicas celulares no contexto do ambiente metastático, contribuindo para o entendimento mais amplo dos mecanismos biológicos envolvidos no câncer.

Figura 6 - Força de interações entre grupos celulares

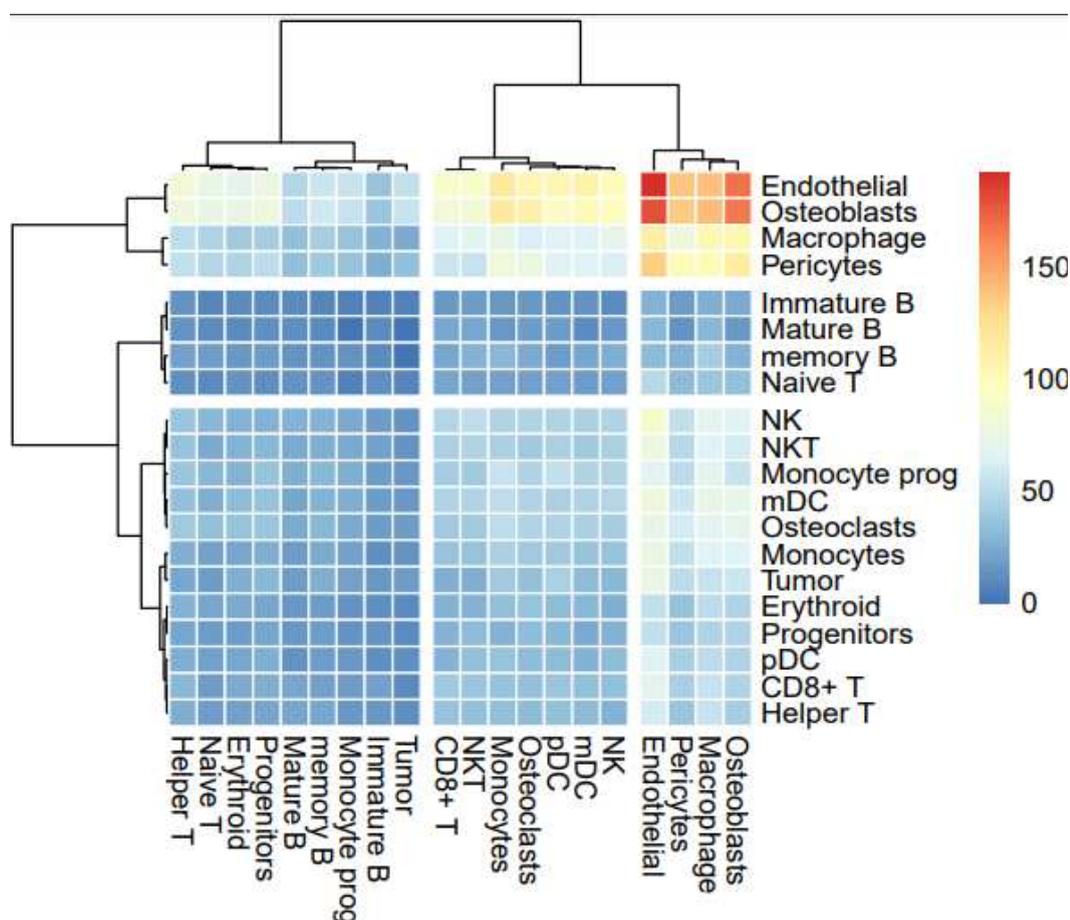


Figura 6. Heatmap das interações entre os clusters da amostra tumoral, sendo representadas por uma escala de cores que reflete a amplitude da rede de interação dos pares ligantes-receptores. Nessa escala, o azul indica um menor grau de interação, enquanto o vermelho indica um maior grau. As interações mais significativas são observadas entre as células endoteliais, osteoblastos e macrófagos.

4.3 VIAS DE ENRIQUECIMENTO DE GENES

Na análise anterior, que comparou as proporções dos grupos celulares nas amostras benignas e tumorais, observamos diferenças quantitativas nas células B, osteoclastos, osteoblastos e macrófagos, para investigar a relação entre esses tipos celulares e o tumor, foi feita uma análise de enriquecimento de genes de ambos os

grupos. Essa análise permitiu identificar quais os principais genes estavam enriquecidos no tumor em relação à amostra benigna e vice-versa.

Para isso, foi feita a comparação do conjunto de genes de interesse com um conjunto de genes de referência. Aqui a ferramenta e métodos utilizados para essa análise, avaliam a ocorrência dos genes de interesse em relação ao que seria esperado ao acaso no grupo benigno e tumor. As vias metabólicas conhecidas, como os presentes no banco de dados Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), foram visualizadas para auxiliar na análise (Figuras 7 e 8).

Na análise da amostra tumoral, observou-se a expressão de reguladores associados ao ciclo celular e à respiração celular. Esse resultado sugere uma intrincada interação entre processos celulares fundamentais e a progressão tumoral. Reguladores do ciclo celular desempenham um papel crucial na modulação da divisão celular, e sua expressão alterada pode contribuir para a rápida proliferação característica das células cancerígenas.

Além disso, a expressão de genes relacionados à respiração celular na amostra tumoral destaca a complexidade do metabolismo celular durante a carcinogênese. Alterações nesses reguladores podem influenciar o equilíbrio energético da célula, fornecendo um ambiente propício para o crescimento descontrolado e a sobrevivência celular.

A análise das vias de enriquecimento genético revelou discrepâncias notáveis entre a amostra benigna (à esquerda) e a amostra tumoral (à direita). Na amostra tumoral, destacam-se indicações significativas de vias associadas ao óxido-redução e atividades mitocondriais. Essas descobertas sugerem alterações metabólicas e bioenergéticas que ocorrem durante a carcinogênese.

Essas vias expressas indicam uma potencial influência direta na homeostase do microambiente, sugerindo que as células tumorais estão reprogramando suas atividades metabólicas para promover seu crescimento descontrolado. A compreensão dessas vias específicas abre novas perspectivas para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionadas, visando modular esses processos metabólicos e restaurar a homeostase prejudicada no microambiente tumoral.

A via de sinalização SLIT/ROBO envolve uma família de proteínas, incluindo os ligantes SLIT e seus receptores transmembranares, ROBO. (Debnath et al., 2022). Pesquisas recentes destacaram o envolvimento específico da via SLIT/ROBO

na promoção da migração das células tumorais, um aspecto crucial do processo metastático. A ativação dos receptores ROBO pelos ligantes SLIT pode desencadear vias de sinalização subsequentes que regulam a dinâmica do citoesqueleto, a adesão celular e a motilidade. Observou-se que a disfunção dessa via está associada a uma maior capacidade de migração e invasão das células tumorais em vários tipos de câncer. Além disso, foi sugerido que a regulação da migração mediada pelo complexo SLIT/ROBO pode ser influenciada por mecanismos que afetam diretamente a função da cadeia respiratória. Durante a transição epitelial-mesenquimal, que é um processo-chave na disseminação do câncer, é plausível que ocorram alterações na regulação da cadeia respiratória para fornecer energia necessária para a migração celular aumentada. Essas mudanças podem estar interligadas com os mecanismos que regulam a migração mediada pelo complexo SLIT/ROBO, sugerindo uma interação complexa entre esses dois sistemas durante processos fisiológicos e patológicos, incluindo a progressão do câncer. (Debnath et al., 2022; Jiang et al., 2019)

Figura 7 - Vias enriquecidas em progenitores

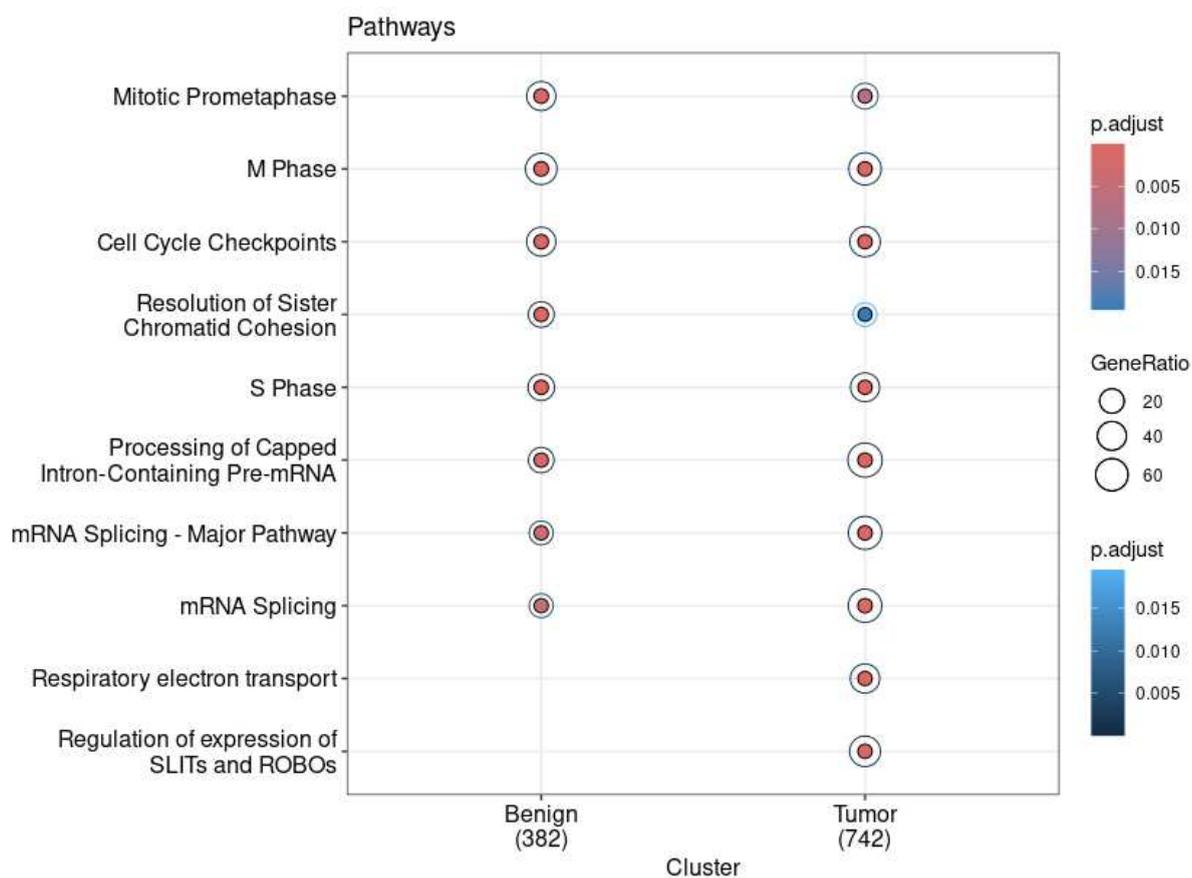


Figura 7. Vias de enriquecimento de genes da amostra benigna (à esquerda) e da amostra tumoral (à direita). Na amostra tumoral está sendo expresso reguladores de expressão associados ao ciclo e respiração celular.

Figura 8 - Ontologia gênica em progenitores

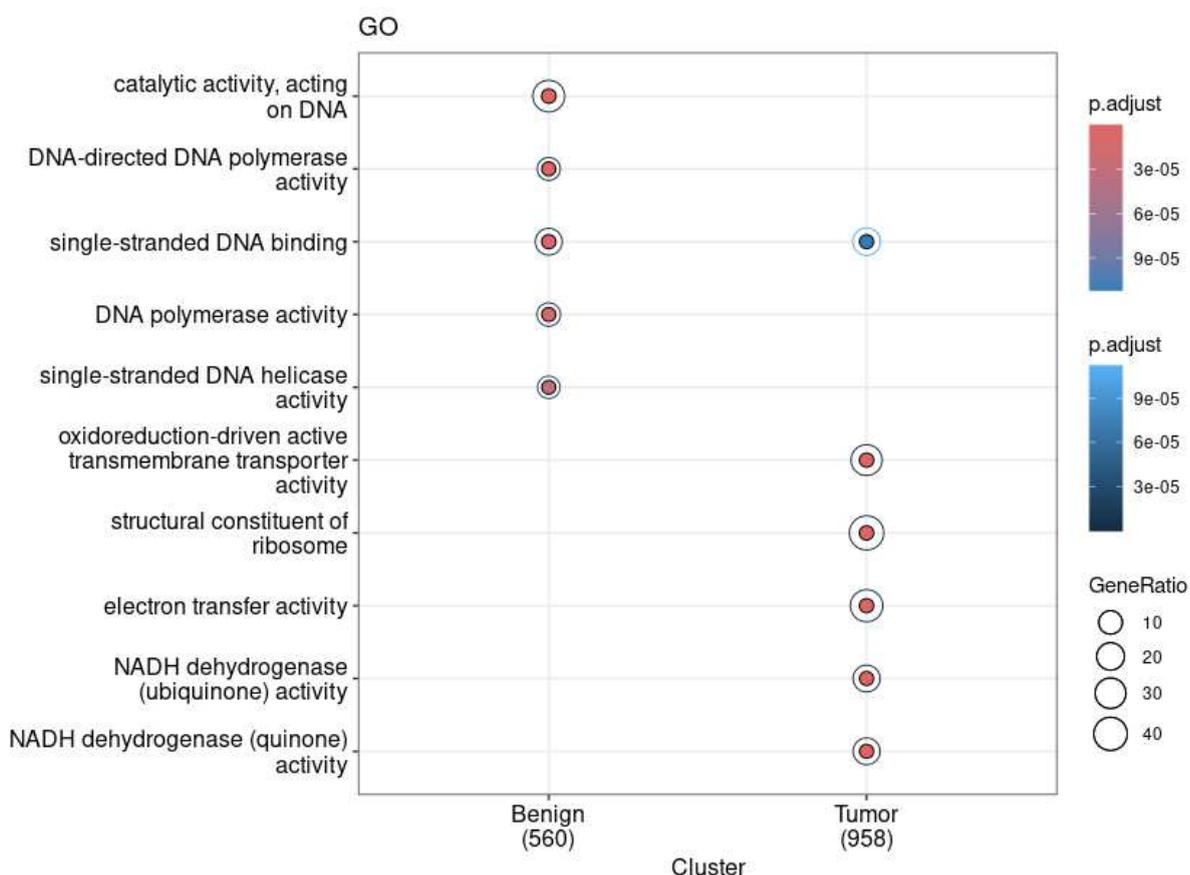


Figura.8 - Vias de enriquecimento de genes da amostra benigna (à esquerda) e da amostra tumoral (à direita). Na amostra tumoral está sendo indicado vias a partir do gene ontology expressas associadas a óxido redução, e atividades mitocondriais que influenciam diretamente na homeostase do microambiente.

4.3 EXPRESSÃO GÊNICA

Para podermos compreender as diferenças transcriptômicas, foi realizada a análise do Fold Change, que nos permite compreender como os genes estão sendo regulados em diferentes condições, neste caso, comparando amostras tumorais e benignas. Esse tipo de análise apresenta uma métrica que indica a magnitude da mudança na expressão gênica entre dois grupos de amostras. Neste contexto, ele

nos ajuda a identificar quais genes estão sendo regulados de forma positiva (aumento na expressão) ou negativa (diminuição na expressão) nas células tumorais em comparação com as células benígnas.

A análise está representada na Figura 9 e identifica os genes mais expressos em ambas as amostras, para compreender quais podem aqui estar associados a alterações hematopoiéticas.

Figura 9 - Genes expressos em progenitores

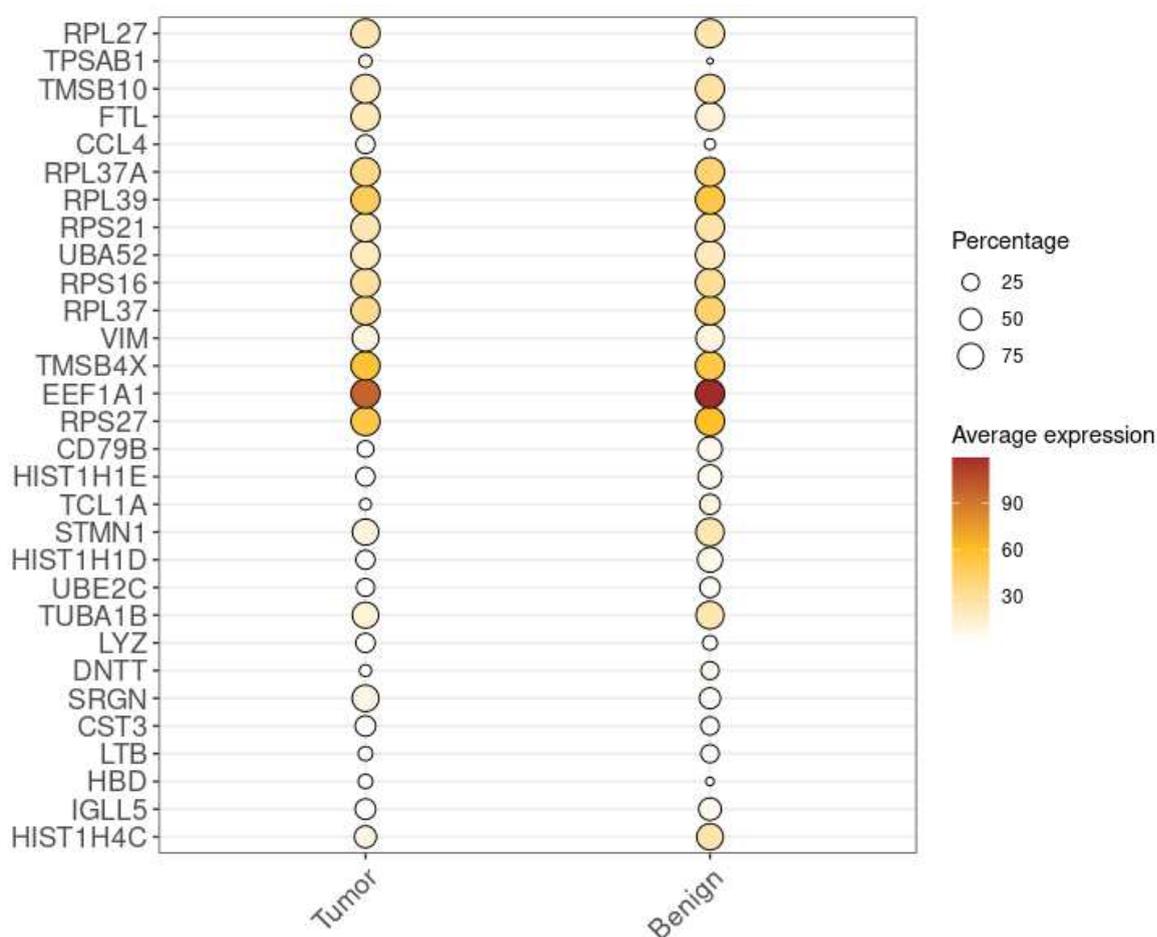


Figura 9. A análise de Fold Change, os genes que estão sendo regulados positivamente (aumento na expressão) ou negativamente (diminuição na expressão) na amostra tumoral e na benigna.

Quando observamos um Fold Change positivo, isso significa que a expressão de um gene está aumentando nas células tumorais em relação às células benígnas. Isso pode indicar a ativação ou super expressão de certos genes, o que pode estar

associado a processos patológicos ou características específicas das células cancerosas. Por outro lado, um Fold Change negativo aponta para uma diminuição na expressão gênica nas células tumorais em comparação com as benignas. Isso pode sugerir uma supressão ou inibição da expressão de certos genes, o que também pode ser significativo na compreensão das características do câncer.

A partir disso podemos compreender melhor as vias de sinalização, os processos metabólicos e as interações gênicas que estavam nas amostras analisadas, obtivemos 22 genes e sua atividade (regulação positiva/negativa) genética em cada amostra. Destacamos aqui os genes CCL4, CD79, DNNT, LTB e TCL1A. de interesse que apresentaram funções influentes dentro do contexto hematopoiético e destacamos suas funções celulares e dos mecanismos subjacentes. Essa análise sugere um desequilíbrio no processo de diferenciação hematopoiética.

4.4 VIAS DE SINALIZAÇÃO

4.4.1 Macrófagos

A Figura 10 apresenta as vias de enriquecimento de genes da amostra benigna e da amostra tumoral, onde se destacam as vias de sinalização FoxO e MAPK. Essas vias de sinalização são importantes para a regulação de processos celulares como a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular. A via de sinalização FoxO é uma via de sinalização intracelular que regula a expressão de genes envolvidos na proliferação celular, apoptose e resposta ao estresse celular. A ativação dessa via de sinalização pode levar à inibição da proliferação celular e à indução da apoptose, o que pode ser importante para a prevenção do desenvolvimento tumoral. A via de sinalização MAPK é uma via de sinalização intracelular que regula a proliferação celular, a diferenciação e a sobrevivência celular. Essa via de sinalização é ativada por uma variedade de estímulos, incluindo fatores de crescimento e estresse celular.

A ativação dessa via de sinalização pode levar à proliferação celular e à sobrevivência celular, o que pode ser importante para o desenvolvimento tumoral. A presença dessas vias de sinalização em maior quantidade na amostra tumoral pode

indicar uma relação com o desenvolvimento do tumor. A análise de enriquecimento de genes permite identificar quais os principais genes estão enriquecidos no tumor em relação à amostra benigna e vice-versa, o que pode fornecer informações importantes para a compreensão dos mecanismos envolvidos na relação entre o tumor e as células presentes na medula óssea.

4.4.2 Pró- B

A Figura 11 apresenta as vias de enriquecimento de genes da amostra benigna e da amostra tumoral, onde se destacam as vias de sinalização TNF, IL-17, diferenciação osteoclástica, NF kappa B e linhagem hematopoética. Essa via de sinalização é importante para a manutenção da homeostase óssea. O fator de transcrição NF-kappaB é um regulador chave da resposta inflamatória e imunológica do organismo. Ele é ativado por uma variedade de estímulos, incluindo citocinas inflamatórias como o TNF e a IL-17. A linhagem hematopoiética é a linhagem celular que dá origem às células sanguíneas, incluindo glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas. A presença dessa via de sinalização na amostra tumoral pode indicar uma relação com a proliferação celular e o desenvolvimento do tumor.

Figura 10 - Vias enriquecidas em Macrófagos

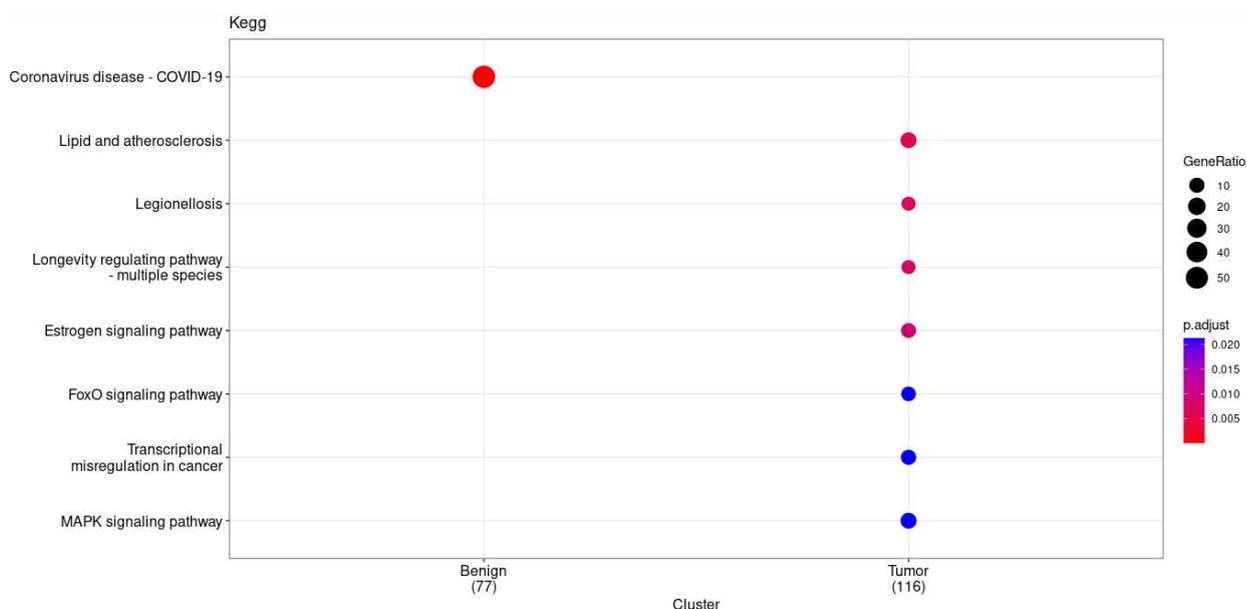


Figura 10 - Vias de enriquecimento de genes da amostra benigna (à esquerda) e da amostra tumoral (à direita), onde se destacam as vias de sinalização FoxO, e MAPK

Figura 11 - Vias enriquecidas em Pró-B

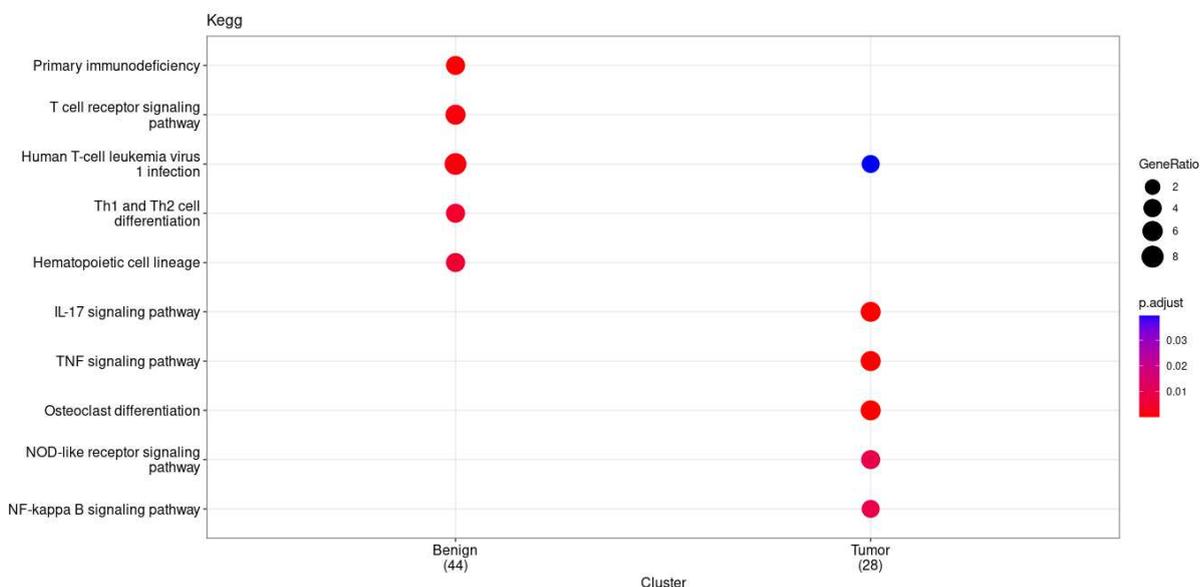


Figura 11. Vias de enriquecimento de genes da amostra benigna (à esquerda) e da amostra tumoral (à direita), onde se destacam as vias TNF, IL-17, diferenciação osteoclástica, NF kappa B e linhagem hematopoética.

4.5 RELAÇÃO LIGANTE-RECEPTOR

Após a geração do heatmap foi possível observar que as interações mais fortes ocorreram entre as células endoteliais e osteoblastos, para investigar a relação de comunicação celular entre esses grupos e as células tumorais foi realizada uma análise através da identificação do número de pares ligante-receptor co-expressos entre diversas combinações de interações célula-célula, o algoritmo realiza a identificação de possíveis redes de comunicação intercelular nos conjuntos de dados.

Na Figura 12, é apresentada uma representação visual da interação entre ligantes e receptores em diferentes tipos celulares. Na coluna da esquerda estão listados os ligantes e os receptores respectivamente. Na linha inferior estão os diferentes tipos celulares, incluindo células endoteliais e tumorais, bem como osteoblastos e células tumorais. A figura também indica que essa interação ocorre

nos dois sentidos, ou seja, os ligantes podem se ligar a receptores nas células endoteliais e tumorais, e também nas células de osteoblastos e tumorais.

A intensidade da interação entre os pares de ligantes e receptores é indicado por cores diferentes, onde uma cor mais intensa indica uma interação mais forte. Essa representação visual ajuda a identificar quais ligantes estão interagindo com os receptores em diferentes tipos celulares.

O valor estatístico é utilizado para avaliar a significância das interações observadas. No contexto da figura, $-\log_{10}(\text{valor } P) = 2.399$ indica que a interação entre os ligantes e receptores mostrados é estatisticamente significativa, ou seja, é improvável que ocorra ao acaso.

Observamos em nosso resultado a interação da molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1), esta é uma proteína transmembranar expressa em células endoteliais, que revestem os vasos sanguíneos, e em alguns tipos de células do tecido conjuntivo. Ela desempenha um papel crucial na regulação da adesão e migração de células imunes, como leucócitos, durante processos inflamatórios e imunológicos.

A VCAM-1 emerge como um elemento relevante no contexto do câncer, desempenhando papéis cruciais na progressão tumoral e nas interações entre células cancerígenas e o microambiente tumoral. A expressão elevada de VCAM-1 pode estar associada à capacidade de invasão e metástase em alguns tipos de câncer, facilitando a adesão das células cancerígenas aos vasos sanguíneos e promovendo sua disseminação para outros tecidos. Além disso, a VCAM-1 parece desempenhar um papel na promoção da angiogênese, um processo vital para o fornecimento de nutrientes aos tumores em crescimento. A influência da VCAM-1 no microambiente tumoral também é evidente, aumentando a interação entre células tumorais e células imunes, o que pode afetar a resposta imunológica antitumoral. Assim, a compreensão do papel da VCAM-1 no câncer pode ter implicações significativas no desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionadas, visando inibir a disseminação e crescimento tumoral (PINHO; FRENETTE, 2019; SHARMA et al., 2017)

Figura 12 - Ligantes e receptores entre células endoteliais e tumorais

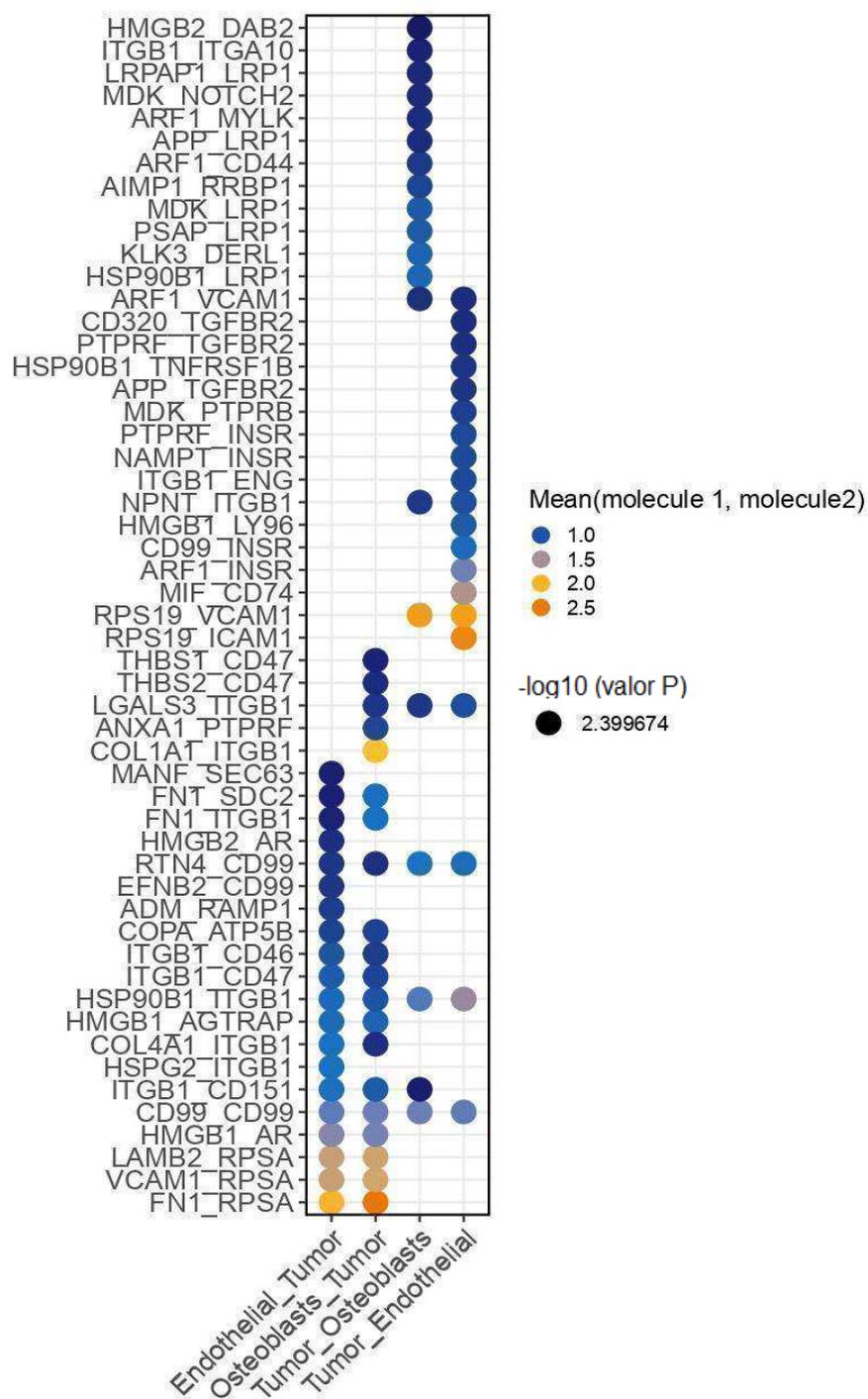


Figura 12. Ligantes e receptores estão presentes na coluna da esquerda, enquanto na linha inferior estão os tipos celulares, endotelial e tumor, osteoblastos e tumor e vice-verso. Intensidade de interação dos pares de ligantes e receptores valor estatístico significativo $-\log_{10}(\text{valor P}) = 2.399$

DISCUSSÃO

Neste estudo, observamos alterações hematopoiéticas resultantes da perturbação do ambiente medular causada pela presença de CTCs. Identificamos cinco genes relacionados à alteração hematopoiética: CCL4, CD79, DNMT, LTB e TCL1A, identificamos o enriquecimento das vias de TNF, IL-17 e NF Kappa B, confirmando nossa hipótese inicial que a presença de CTCs no ambiente medular promove alterações na hematopoiese. E destacamos aspectos cruciais do processo de desenvolvimento metastático, incluindo imunossupressão, angiogênese e permeabilidade vascular.

Ao isolarmos a população de células progenitoras hematopoiéticas, observamos modificações na atividade do ciclo celular e alterações na expressão de genes associados à ativação imunológica e tradução. Essas adaptações no nicho metastático podem propiciar o crescimento e a sobrevivência das células cancerígenas, impactando diretamente a hematopoiese na medula óssea. A análise para identificação dos principais genes expressos nas amostras permitiu-nos explorar o perfil genético em um nível molecular, destacando genes com expressão mais acentuada e, conseqüentemente, desempenhando um papel potencialmente relevante na regulação gênica positiva e negativa. A partir disso podemos compreender melhor as vias de sinalização, os processos metabólicos e as interações gênicas que estavam nas amostras analisadas.

As adaptações no nicho metastático desempenham um papel crucial no suporte ao crescimento e à sobrevivência das células cancerígenas, influenciando diretamente a hematopoiese na medula óssea. As CTCs do PCa metastático competem diretamente com as HSCs pelo nicho na medula óssea, utilizando mecanismos fisiológicos semelhantes aos das células-tronco hematopoiéticas. Uma estratégia utilizada pelos CTCs é induzir mudanças no microambiente que afetam a maturidade e a função das HSCs. Um mecanismo que as células PCa podem usar na competição pelo nicho de HSC é impulsionar direta e indiretamente a maturidade do HSC para que desocupam o nicho. (KINGSLEY et al., 2007b).

A influência dos CTCs nas HSCs também se reflete na dinâmica da população celular. A competição resulta em uma menor presença de HSCs no nicho, pois os CTCs alteram a capacidade das HSCs de se auto-renovarem e aceleram a

taxa do ciclo celular, fazendo com que saiam do estado de dormência e deixem o nicho. Esse efeito direto nas HSCs é acompanhado pela mobilização de HPCs para a circulação periférica, evidenciada pelo aumento de HPCs no sangue periférico de pacientes com CaP metastático em comparação com aqueles com CaP localizado ou indivíduos saudáveis (DECKER et al., 2016).

Essas adaptações no nicho metastático não apenas favorecem o crescimento contínuo dos CTCs, mas também impactam a hematopoiese global na medula óssea. A alteração na dinâmica das HSCs e a mobilização aumentada de HPCs podem afetar a produção de células sanguíneas normais, comprometendo a homeostase hematopoiética.

Identificamos cinco genes relacionados à alteração hematopoiética: CCL4, CD79, DNNT, LTB e TCL1A. A quimiocina CCL4 (MIP-1 β), liberada por células osteoblásticas, desempenha um papel crucial na restauração da homeostase das células-tronco hematopoiéticas durante a ativação da medula óssea (LEE et al., 2018). O CD79, ou Ig-beta, um componente do complexo receptor de células B, está envolvido na formação e ativação de linfócitos B (CHU; ARBER, 2001). A expressão dos genes DNNT é específica para linfócitos em desenvolvimento, compartilhada pelas linhagens B e T, sendo essencial para a diversidade dos receptores imunológicos (ROTHENBERG, 2014). Já o LTB é uma proteína de membrana do tipo II pertencente à família TNF, desempenhando papel na indução da resposta inflamatória e no desenvolvimento saudável do tecido linfóide ("Linfotoxina beta LTB [Homo sapiens (humano)] - Gene - NCBI"). A expressão de TCL1A está estreitamente associada às células B precoces, antes de sua migração para os centros germinativos (BRINAS; DANGER; BROUARD, 2021).

Esses genes desempenham funções diretamente relacionadas aos tipos celulares B, macrófagos e osteoblastos. Desta forma, concentramos nossa atenção nesses grupos celulares no ambiente medular metastático. Estudos anteriores, indicaram níveis mais elevados de células B no câncer de próstata (DAI et al., 2005; KELLER; BROWN, 2004), em nossas análises observamos uma redução acentuada dessas células na medula. Investigamos essa diferença e, através dos principais genes expressos nas amostras tumorais de células B, identificamos o enriquecimento das vias de TNF, IL-17 e NF Kappa B, conforme demonstrado na figura 10.

A família de fatores de transcrição nuclear NFκB desempenha papel fundamental na regulação do desenvolvimento do sistema imunológico, nas respostas imunológicas, na inflamação e no câncer (MITCHELL; VARGAS; HOFFMANN, 2016). Estudos evidenciaram que o NF-κB promove a sobrevivência celular, proliferação e invasão no câncer de próstata (GUTIERREZ-UZQUIZA et al., 2015; JIN et al., 2013; STAAL; BEYAERT, 2018). A ativação inadequada ou desregulação da via NF-kappa B pode impactar significativamente a hematopoiese e o sistema imunológico, levando a distúrbios hematopoiéticos e desequilíbrios na produção de células sanguíneas. Portanto, o controle preciso dessa via é crucial para manter a homeostase hematopoiética e uma resposta imunológica adequada.

Ao analisarmos as vias enriquecidas em progenitores, observamos um aumento notável na expressão de vias relacionadas ao processo de ciclo e respiração celular representados nas figuras 6 e 7. As células-tronco hematopoiéticas (HSCs) apresentam um perfil metabólico com baixo teor de NAD⁺/NADH quando residem em seu nicho hipóxico. Quando necessário, como na reconstituição do sistema hematopoiético após lesão ou transplante de medula óssea, as HSCs migram para a fosforilação oxidativa nas mitocôndrias, o que pode resultar em envelhecimento prematuro das HSCs (NAKAMURA-ISHIZU; ITO; SUDA, 2020).

As espécies reativas de oxigênio, geradas em resposta a estímulos endógenos e exógenos, desempenham um papel na sinalização celular em concentrações fisiológicas. No entanto, em concentrações mais altas, podem induzir morte celular, apoptose e senescência, ativando vias de sinalização, como a NF-Kappa B. A Figura 10 destaca as vias de enriquecimento de genes em amostras benignas e tumorais, revelando notáveis diferenças, principalmente nas vias de sinalização TNF, IL-17, diferenciação osteoclástica, NF kappa B e linhagem hematopoética. Essas vias, essenciais para a regulação da resposta inflamatória e imunológica, apresentam-se em maior quantidade na amostra tumoral, sugerindo uma possível relação com o desenvolvimento do tumor.

A via de sinalização do Fator de Necrose Tumoral (TNF) é crucial, transmitindo sinais para desencadear respostas biológicas. Produzido por células do sistema imunológico, como macrófagos e linfócitos T, o TNF desempenha papel fundamental na regulação da resposta inflamatória e imunológica do organismo. Similarmente, a via de sinalização da interleucina 17 (IL-17), produzida por células T

auxiliares e outras do sistema imunológico, desempenha papel importante na defesa contra infecções. A diferenciação osteoclástica, responsável pela formação de osteoclastos a partir de células precursoras, é crucial para a manutenção da homeostase óssea. O fator de transcrição NF-kappaB, ativado por citocinas inflamatórias como TNF e IL-17, é central na regulação da resposta inflamatória e imunológica. Além disso, a linhagem hematopoética, que origina células sanguíneas, pode indicar uma relação com a proliferação celular na amostra tumoral.

Além das células B, os macrófagos, com diversas etapas de formação e atuação no sistema imunológico, são cruciais. Alterações nesse grupo celular têm o potencial de propiciar a imunodeficiência, desafio significativo no tratamento do câncer metastático. Ao analisar as vias enriquecidas nessa população, observamos as vias FoxO e MAPK. A subfamília de fatores de transcrição FoxO exerce papel crucial em processos fisiológicos, incluindo regulação do ciclo celular e indução da apoptose, sendo indicativa de alterações hematopoiéticas neste contexto. A comunicação do tumor com sítios secundários ocorre de diversas formas, incluindo a preparação do nicho pré-metastático e manutenção da imunossupressão.

A via MAPK desempenha papel crucial ao promover a expressão da integrina $\alpha 4\beta 1$ nos osteoblastos, essencial na adesão das células cancerosas de próstata. Essa interação é crucial no desenvolvimento de metástases ósseas, destacando-se pela significativa adesão das células de câncer de próstata aos osteoblastos, mediada por VCAM-1 e integrina $\alpha 4\beta 1$. Diversas evidências indicam que as células de câncer de próstata produzem fatores pró-osteoblásticos (DAI et al., 2005; KELLER; BROWN, 2004), resultando em perturbação do balanceamento entre osteoblastos e osteoclastos, levando à metástase osteoblástica. A interação VCAM-1/integrina $\alpha 4\beta 1$ é central, permitindo adesão específica e possibilitando a colonização e proliferação das células cancerosas no tecido ósseo. O VCAM-1, presente nas células tumorais, serve como ligante para receptores em diversas categorias celulares, incluindo macrófagos, evidenciando a complexidade das interações. Osteoblastos, ao produzirem WISP-1, inibem a formação de osteoclastos, contribuindo para o desenvolvimento da metástase osteoblástica.

A análise da intensidade de ligação dos pares de ligantes e receptores revela a interação entre VCAM-1 e tecido tumoral e endotelial, ampliando nossa compreensão sobre o papel dessas moléculas na regulação da adesão das células de câncer de próstata aos osteoblastos. As moléculas de adesão desempenham

papel fundamental na invasão de tecidos circundantes pelas células cancerosas, fator-chave na disseminação do câncer para outras partes do corpo.

A colonização tecidual antecede a chegada das células tumorais circulantes, desencadeando a disrupção da homeostase no microambiente medular, culminando em alterações hematopoiéticas subsequentes (PINHO; FRENETTE, 2019). Este processo é crucial nas fases iniciais da metástase, premeditando a entrada das CTD na medula óssea e provocando alterações no ambiente hematopoiético.

Em situações de inflamação exacerbada, como em neoplasias e doenças crônicas, a VCAM-1 transcende sua expressão convencional nas células endoteliais, expandindo-se para outras células, incluindo macrófagos teciduais, células dendríticas, fibroblastos da medula óssea, mioblastos e até mesmo as próprias células cancerígenas (SHARMA et al., 2017). Esta ampla gama de células cria uma teia complexa de interações no microambiente tumoral, desempenhando um papel essencial nas etapas que culminam no desencadeamento da metástase.

Os efeitos do sistema imunológico na regeneração óssea podem ser entendidos sob dois aspectos fundamentais. Em um cenário, a inflamação aguda durante a regeneração óssea exerce influência anabólica, acelerando a formação óssea nas fases iniciais da recuperação de fraturas ósseas. Esse processo estimula a proliferação e a diferenciação das células progenitoras mesenquimais em células osteoblásticas (ONO; TAKAYANAGI, 2017). Em contrapartida, a inflamação crônica tem impacto negativo na reabsorção óssea.

Neste contexto intrincado, observamos uma rede complexa que envolve a formação de novas células, influenciada pela presença de CTD. Além disso, essa rede é afetada por processos de intravasão e angiogênese, regulados por comunicações celulares complexas, ainda em constante estudo e desenvolvimento. Essa perspectiva integrada destaca a interconexão entre a inflamação, a presença de CTD e os processos fundamentais na regulação do microambiente tumoral durante a metástase óssea.

CONCLUSÃO

Conclui-se, portanto, que este estudo sobre a análise de dados de RNA de célula única de amostras de medula óssea apresentou aspectos cruciais para compreender as alterações hematopoiéticas induzidas pela presença de CTCs. Ao explorar elementos essenciais do desenvolvimento metastático, como imunossupressão, angiogênese e permeabilidade vascular, identificamos um aumento significativo na expressão de vias relacionadas ao ciclo celular e respiração celular em progenitores, indicando possíveis mecanismos de envelhecimento prematuro das células-tronco hematopoiéticas em resposta à reconstituição do sistema hematopoiético após lesão.

Além disso, as diferenças significativas nas vias de sinalização entre amostras benignas e tumorais, especialmente nas vias TNF, IL-17 e NF-kappa B, sugerem uma possível associação com o desenvolvimento tumoral. A análise das interações e comunicação celular destacou padrões intensos entre osteoblastos, macrófagos, células endoteliais e pericitos, proporcionando insights valiosos sobre a biologia do câncer e o ambiente metastático medular.

A investigação da expressão gênica através de análises de Fold Change revelou genes associados a alterações hematopoiéticas, apresentando padrões de regulação positiva e negativa, potencialmente relacionados a processos patológicos e características específicas das células cancerosas. Essas descobertas oferecem uma compreensão mais profunda dos mecanismos biológicos subjacentes ao câncer de próstata metastático, fornecendo insights cruciais para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais direcionadas e eficazes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIRRE-GHISO, J. A. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. **Nat. Rev. Cancer**, v. 7, n. 11, p. 834–846, nov. 2007.

AHMADIYEH, N. et al. 8q24 prostate, breast, and colon cancer risk loci show tissue-specific long-range interaction with MYC. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 21, p. 9742–9746, 25 maio 2010.

AHMED, M.; EELES, R. Germline genetic profiling in prostate cancer: Latest developments and potential clinical applications. **Future Science OA**, v. 2, n. 1, 1 mar. 2016.

AZUBUIKE, U. F.; TANNER, K. Biophysical determinants of cancer organotropism. **Trends in cancer**, v. 9, n. 3, p. 188–197, 1 mar. 2023.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 1 nov. 2018.

BRINAS, F.; DANGER, R.; BROUARD, S. TCL1A, B Cell Regulation and Tolerance in Renal Transplantation. **Cells**, v. 10, n. 6, 1 jun. 2021.

BUBENDORF, L. et al. Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients. **Human pathology**, v. 31, n. 5, p. 578–583, 2000.

BUENROSTRO, D. et al. The Bone Microenvironment: A Fertile Soil for Tumor Growth. **Current osteoporosis reports**, v. 14, n. 4, p. 151, 1 ago. 2016.

CHU, P. G.; ARBER, D. A. CD79: a review. **Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM**, v. 9, n. 2, p. 97–106, jun. 2001.

COCHAIN, C. et al. Single-Cell RNA-Seq Reveals the Transcriptional Landscape and Heterogeneity of Aortic Macrophages in Murine Atherosclerosis. **Circulation research**, v. 122, n. 12, p. 1661–1674, 2018.

COLEMAN, R. et al. Bone health in cancer patients: ESMO Clinical Practice Guidelines. **Annals of Oncology**, v. 25, p. iii124–iii137, 1 set. 2014.

CRIPPA, S.; BERNARDO, M. E. Mesenchymal Stromal Cells: Role in the BM Niche and in the Support of Hematopoietic Stem Cell Transplantation. **HemaSphere**, v. 2, n. 6, 1 dez. 2018.

DAI, J. et al. Bone morphogenetic protein-6 promotes osteoblastic prostate cancer bone metastases through a dual mechanism. **Cancer Research**, v. 65, n. 18, p. 8274–8285, 15 set. 2005.

DEBNATH, P. et al. Epithelial-mesenchymal transition and its transcription factors. **Bioscience reports**, v. 42, n. 1, 1 jan. 2022.

DECKER, A. M. et al. The role of hematopoietic stem cell niche in prostate cancer bone metastasis. **Journal of Bone Oncology**, v. 5, n. 3, p. 117, 1 set. 2016.

FARES, J. et al. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, 1 dez. 2020.

FOLLAIN, G. et al. Hemodynamic Forces Tune the Arrest, Adhesion, and Extravasation of Circulating Tumor Cells. **Developmental cell**, v. 45, n. 1, p. 33–52.e12, 9 abr. 2018.

GENANT, H. K. et al. Noninvasive assessment of bone mineral and structure: state of the art. **Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 11, n. 6, p. 707–730, 1996.

GIANCOTTI, F. G. Mechanisms Governing Metastatic Dormancy and Reactivation. **Cell**, v. 155, n. 4, p. 750, 11 nov. 2013.

GUTIERREZ-UZQUIZA, A. et al. PKC ϵ Is an Essential Mediator of Prostate Cancer Bone Metastasis. **Molecular cancer research : MCR**, v. 13, n. 9, p. 1336–1346, 1 set. 2015.

HENSEL, J.; THALMANN, G. N. Biology of Bone Metastases in Prostate Cancer. **Urology**, v. 92, p. 6–13, 1 jun. 2016.

HEUMOS, L. et al. Best practices for single-cell analysis across modalities. **Nature Reviews Genetics 2023 24:8**, v. 24, n. 8, p. 550–572, 31 mar. 2023a.

HEUMOS, L. et al. Best practices for single-cell analysis across modalities. **Nature Reviews Genetics 2023 24:8**, v. 24, n. 8, p. 550–572, 31 mar. 2023b.

HIRAGA, T. Bone metastasis: Interaction between cancer cells and bone microenvironment. **Journal of Oral Biosciences**, v. 61, n. 2, p. 95–98, 1 jun. 2019.

HOFBAUER, L. C.; SCHOPPET, M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. **JAMA**, v. 292, n. 4, p. 490–495, 28 jul. 2004.

ITKIN, T. et al. Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate haematopoiesis. **Nature** 2016 **532:7599**, v. 532, n. 7599, p. 323–328, 13 abr. 2016.

JIN, F. et al. Regulation of prostate cancer cell migration toward bone marrow stromal cell-conditioned medium by Wnt5a signaling. **Molecular Medicine Reports**, v. 8, n. 5, p. 1486–1492, nov. 2013.

JIN, J. K.; DAYYANI, F.; GALLICK, G. E. Steps in prostate cancer progression that lead to bone metastasis. **International journal of cancer**, v. 128, n. 11, p. 2545–2561, 1 jun. 2011.

JIANG, Z. et al. Targeting the SLIT/ROBO pathway in tumor progression: molecular mechanisms and therapeutic perspectives. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v. 11, 1 jun. 2019.

KAPLAN, R. N.; PSAILA, B.; LYDEN, D. Bone marrow cells in the “pre-metastatic niche”: within bone and beyond. **Cancer metastasis reviews**, v. 25, n. 4, p. 521–529, dez. 2006.

KAUFFMAN, E. C. et al. Metastasis suppression: the evolving role of metastasis suppressor genes for regulating cancer cell growth at the secondary site. **J. Urol.**, v. 169, n. 3, p. 1122–1133, 1 mar. 2003.

KELLER, E. T.; BROWN, J. Prostate cancer bone metastases promote both osteolytic and osteoblastic activity. **Journal of cellular biochemistry**, v. 91, n. 4, p. 718–729, 2004.

KFOURY, Y. et al. Human prostate cancer bone metastases have an actionable immunosuppressive microenvironment. **Cancer cell**, v. 39, n. 11, p. 1464–1478.e8, 8 nov. 2021.

KIM, J.; XU, Z.; MARIGNANI, P. A. Single-cell RNA sequencing for the identification of early-stage lung cancer biomarkers from circulating blood. **NPJ Genomic Medicine**, v. 6, n. 1, 1 dez. 2021.

KINGSLEY, L. A. et al. Molecular biology of bone metastasis. **Molecular cancer therapeutics**, v. 6, n. 10, p. 2609–2617, 1 out. 2007a.

KINGSLEY, L. A. et al. Molecular biology of bone metastasis. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 6, n. 10, p. 2609–2617, 1 out. 2007b.

KOUTSI, A.; VERVESOU, E.-C. Diagnostic molecular techniques in haematology: recent advances. **Annals of Translational Medicine**, v. 6, n. 12, p. 242–242, jun. 2018.

LAMBERT, A. W.; PATTABIRAMAN, D. R.; WEINBERG, R. A. Emerging Biological Principles of Metastasis. **Cell**, v. 168, n. 4, p. 670–691, 9 fev. 2017.

LEE, D. et al. CCL4 enhances preosteoclast migration and its receptor CCR5 downregulation by RANKL promotes osteoclastogenesis. **Cell Death & Disease** **2018 9:5**, v. 9, n. 5, p. 1–12, 2 maio 2018.

LEONG, S. P. et al. Molecular mechanisms of cancer metastasis via the lymphatic versus the blood vessels. **Clinical & Experimental Metastasis** **2021 39:1**, v. 39, n. 1, p. 159–179, 12 nov. 2021.

LIU, Y. et al. Formation of pre-metastatic niches induced by tumor extracellular vesicles in lung metastasis. **Pharmacological Research**, v. 188, p. 106669, 1 fev. 2023.

LIU, Y.; CAO, X. Characteristics and Significance of the Pre-metastatic Niche. **Cancer cell**, v. 30, n. 5, p. 668–681, 14 nov. 2016.

LIU, Z.; WANG, F.; CHEN, X. Integrin $\alpha\beta 3$ -Targeted Cancer Therapy. **Drug development research**, v. 69, n. 6, p. 329, set. 2008.

LUMMERTZ DA ROCHA, E. et al. Reconstruction of complex single-cell trajectories using CellRouter. **Nature Communications** **2018 9:1**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 1 mar. 2018.

LUZZI, K. J. et al. Multistep Nature of Metastatic Inefficiency : Dormancy of Solitary Cells after Successful Extravasation and Limited Survival of Early Micrometastases. **The American Journal of Pathology**, v. 153, n. 3, p. 865, 1998.

MATHOT, L.; STENNINGER, J. Behavior of seeds and soil in the mechanism of metastasis: a deeper understanding. **Cancer science**, v. 103, n. 4, p. 626–631, abr. 2012.

MIN, J. W. et al. Identification of Distinct Tumor Subpopulations in Lung Adenocarcinoma via Single-Cell RNA-seq. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, 25 ago. 2015.

MITCHELL, S.; VARGAS, J.; HOFFMANN, A. Signaling via the NF κ B system. **Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine**, v. 8, n. 3, p. 227–241, 1 maio 2016.

NAKAMURA-ISHIZU, A.; ITO, K.; SUDA, T. Hematopoietic Stem Cell Metabolism during Development and Aging. **Developmental cell**, v. 54, n. 2, p. 239, 7 jul. 2020.

NEOPHYTOU, C. M. et al. The Role of Tumor-Associated Myeloid Cells in Modulating Cancer Therapy. **Frontiers in Oncology**, v. 10, p. 542646, 9 jun. 2020.

OLSEN, T. K.; BARYAWNO, N. Introduction to Single-Cell RNA Sequencing. **Current protocols in molecular biology**, v. 122, n. 1, 1 abr. 2018.

ONO, T.; TAKAYANAGI, H. Osteoimmunology in Bone Fracture Healing. **Current osteoporosis reports**, v. 15, n. 4, p. 367–375, 1 ago. 2017.

PATEL, A. P. et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. **Science (New York, N.Y.)**, v. 344, n. 6190, p. 1396, 6 jun. 2014.

PANTEL, K.; BRAKENHOFF, R. H. Dissecting the metastatic cascade. **Nat. Rev. Cancer**, v. 4, n. 6, p. 448–456, 2004.

PEREA PAIZAL, J.; AU, S. H.; BAKAL, C. Squeezing through the microcirculation: survival adaptations of circulating tumour cells to seed metastasis. **British Journal of Cancer**, v. 124, n. 1, p. 58, 1 jan. 2021.

PINHO, S.; FRENETTE, P. S. Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 20, n. 5, p. 303–320, 1 maio 2019.

POLASCIK, T. J. Bisphosphonates in oncology: evidence for the prevention of skeletal events in patients with bone metastases. **Drug design, development and therapy**, v. 3, n. 3, p. 27, 2009.

RAWLA, P. Epidemiology of Prostate Cancer. **World Journal of Oncology**, v. 10, n. 2, p. 63, 2019.

REBELLO, R. J. et al. Prostate cancer. **Nature Reviews Disease Primers** **2021 7:1**, v. 7, n. 1, p. 1–27, 4 fev. 2021.

REINSTEIN, Z. Z. et al. Overcoming immunosuppression in bone metastases. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 117, p. 114–127, 1 set. 2017.

ROTHENBERG, E. V. Transcriptional control of early T and B cell developmental choices. **Annual review of immunology**, v. 32, p. 283–321, 21 mar. 2014.

SENBANJO, L. T.; CHELLAIAH, M. A. CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 5, n. MAR, 23 mar. 2017.

SHARMA, R. et al. Breast cancer metastasis: Putative therapeutic role of vascular cell adhesion molecule-1. **Cellular Oncology**, v. 40, n. 3, p. 199–208, 1 jun. 2017.

SHIAO, S. L.; CHU, G. C. Y.; CHUNG, L. W. K. Regulation of Prostate Cancer Progression by the Tumor Microenvironment. **Cancer letters**, v. 380, n. 1, p. 340, 9 set. 2016.

STAAL, J.; BEYAERT, R. Inflammation and NF- κ B Signaling in Prostate Cancer: Mechanisms and Clinical Implications. **Cells**, v. 7, n. 9, 1 set. 2018.

VALASTYAN, S.; WEINBERG, R. A. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. **Cell**, v. 147, n. 2, p. 275–292, 14 out. 2011.

VAN ZIJL, F.; KRUPITZA, G.; MIKULITS, W. Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. **Mutation research**, v. 728, n. 1–2, p. 23–34, jul. 2011.

VINAY, D. S. et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. **Seminars in cancer biology**, v. 35 Suppl, p. S185–S198, 1 dez. 2015.

XU, J. et al. Using Machine Learning Modeling to Explore New Immune-Related Prognostic Markers in Non-Small Cell Lung Cancer. **Frontiers in oncology**, v. 10, 30 out. 2020.

ZHANG, X. Interactions between cancer cells and bone microenvironment promote bone metastasis in prostate cancer. **Cancer Communications**, v. 39, n. 1, 21 nov. 2019.