



Universidade Federal de São Carlos  
Departamento de Genética e Evolução  
Rodovia Washington Luis, km 235  
São Carlos - SP - BR  
CEP: 13565-905

---



**Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) - Afonso Martin Melazzo**

*Caracterização pan-câncer da expressão de genes relacionados ao adesoma em células únicas de tumores humanos*

**Candidato:** Afonso Martin Melazzo

**Orientadora:** Sarah Santiloni Cury

**Co-orientadora:** Andrea Soares da Costa Fuentes

**Fevereiro de 2024**



Universidade Federal de São Carlos  
Departamento de Genética e Evolução  
Rodovia Washington Luis, km 235  
São Carlos - SP - BR  
CEP: 13565-905



**TCC - Afonso Martin Melazzo**

*Caracterização pan-câncer da expressão de genes relacionados ao adesoma em células únicas de tumores humanos*

**Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Departamento de  
Genética e Evolução, UFSCar  
Campus São Carlos para obtenção  
de Bacharel em Biotecnologia.**

**Orientadora: Sarah Santiloni Cury**

**Co-orientadora: Andrea Soares da  
Costa Fuentes**

**Fevereiro de 2024**

## **Agradecimentos**

À minha família, que emocionalmente e financeiramente sempre apoiou meu desenvolvimento acadêmico.

À minha orientadora, Sarah Cury, que com cuidado, paciência e dedicação tornou a realização desse projeto não só possível como prazerosa.

À André Cruz e Paula Alves, que com amor e sabedoria me acolheram quando eu tive o primeiro contato com a pesquisa e com a academia em minha iniciação científica. Com vocês eu aprendi muito do que sei sobre dedicação e compromisso com a ciência.

Aos meus amigos Pedro, Matheus, Isadora, Lívia, Eduarda, Gabriel, Guilherme e Lucas. Ao time de Arremessos e Lançamentos da UFSCar. A companhia de vocês foi essencial para que esses anos fossem os melhores da minha vida. Vocês me inspiram e me movem.

Ao grupo do Laboratório CACAO, da UNESP de Botucatu. Vocês me acolheram e com todo companheirismo, seriedade e dedicação me lembraram que a ciência se constrói coletivamente e que esse processo é incrível.

Aos membros da Banca, Robson Carvalho e Paula Freire. Suas contribuições pessoais e profissionais foram inestimáveis.

Aos pacientes que participaram desse estudo.

À UFSCar e a todos os seus servidores públicos que contribuem com a ciência brasileira.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e Pró-reitoria de Pesquisa da Unesp (13/2022).

## Sumário

<b>1. Lista de Ilustrações</b>	<b>5</b>
<b>2. Lista de Tabelas</b>	<b>6</b>
<b>3. Resumo</b>	<b>7</b>
<b>4. Introdução</b>	<b>8</b>
<b>5. Objetivos</b>	<b>14</b>
<b>6. Materiais e Métodos</b>	<b>15</b>
<b>7. Resultados</b>	<b>17</b>
<b>8. Discussão</b>	<b>23</b>
<b>9. Perspectivas Futuras</b>	<b>28</b>
<b>10. Conclusões</b>	<b>28</b>
<b>11. Material Suplementar</b>	<b>29</b>
<b>12. Referências</b>	<b>30</b>

## 1. Lista de Ilustrações

**Figura 1** - Esquema representativo da composição do microambiente tumoral.

**Figura 2** - Associação dos Genes com Classes de Proteínas do Adesoma.

**Figura 3** - Caracterização do perfil transcricional de genes relacionados ao adesoma em tumores humanos.

**Figura 4** - Correlação de genes do adesoma com prevalência de caquexia.

## 2. Lista de Tabelas

**Tabela 1** - Lista de genes significativamente correlacionados com a prevalência de caquexia por tipo celular.

**Tabela 2** - Tipos tumorais e suas respectivas prevalências de caquexia.

### 3. Resumo

O câncer é um dos principais desafios para os sistemas de saúde pública em todo o mundo, com previsão de aumento significativo no número de casos no próximo triênio, inclusive no Brasil. O conjunto de moléculas de adesão, o adesoma, envolvido na doença têm se mostrado cada vez mais relevante para os *hallmarks* do câncer e também para o quadro de caquexia; seu estudo ainda traz desafios dadas as marcantes diversidades fenotípicas e genotípicas intra e inter tumorais. Este trabalho tem como objetivo caracterizar o perfil transcricional do adesoma em células únicas do microambiente tumoral de tumores humanos. Para isso, reanalisamos dados de sequenciamento de células únicas (*single-cell RNA-seq*; scRNA-Seq), disponíveis publicamente no banco de dados *Curated Cancer Cell Atlas*, utilizando o pacote de análises Seurat (v4.0.6). Através da análise de 231 amostras de tumores primários de pacientes não tratados previamente, avaliamos 758088 células únicas de nove tipos tumorais. Os dados de expressão média de 544 genes do adesoma foram avaliados em sete tipos celulares encontrados em comum nos dados pan-câncer. As células do microambiente tumoral apresentaram expressão de genes do adesoma, e identificamos padrões similares de expressão desses entre tipos celulares independentemente do tipo tumorais. Nós também identificamos genes expressos de forma célula-específica em fibroblastos, endoteliócitos, células mielóides e malignas. Além disso, observamos 55 genes significativamente correlacionados com a prevalência de caquexia, sendo seis deles correlacionados significativamente em múltiplos tipos celulares. Portanto, concluímos que o microambiente tumoral expressa genes do adesoma e que é possível identificar padrões de expressão associado a tipos celulares com potencial relevância para a progressão tumoral e caquexia. No geral, este trabalho contribui com a compreensão do conjunto de moléculas relacionadas à adesão no microambiente tumoral, que auxiliará em estudos futuros para determinar seus mecanismos subjacentes à caquexia e à formação de metástases.

**Palavras chave:** Câncer, Adesão, Single-Cell RNA-Seq, Caquexia, bioinformática.



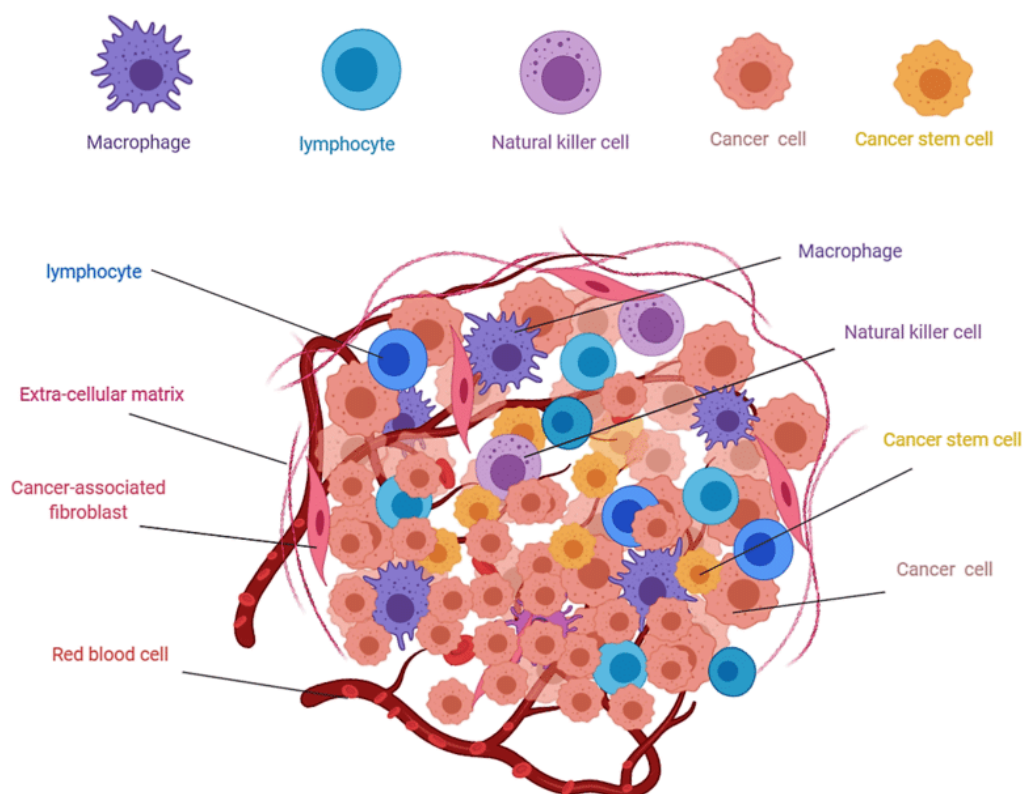
## 4. Introdução

O índice mundial de mortalidade (estimado em 10 milhões em 2020) juntamente com a previsão de aumento de ~50% dos casos nas próximas duas décadas, torna o câncer um dos principais problemas de saúde pública a ser enfrentado em todo o mundo (SUNG *et al.*, 2021). No Brasil, este cenário também é relevante. Estima-se que no triênio de 2023 a 2025 ocorrerão 704 mil casos novos de câncer, sendo o câncer de pele não melanoma o tipo mais prevalente, seguido de câncer de mama, próstata, colorretal e pulmão (SANTOS *et al.*, 2023). Apesar de serem classificados em tipos diferentes devido à sua origem histológica, o câncer é um tumor maligno que pode se originar de quase todos os 200 tipos de célula que compõem o corpo humano; das células epiteliais originam-se os carcinomas, das mesenquimais os sarcomas, e dos tecidos que produzem sanguíneas e linfóides surgem a leucemia e o linfoma (BUNZ, 2016). Todas essas neoplasias, que caracterizam a definição de um tumor, apresentam caráter genético e surgem pelo acúmulo de mutações em genes supressores tumorais ou oncogenes (BUNZ, 2016).

Independentemente do tipo tumoral, o câncer é caracterizado pelo crescimento celular maligno autônomo, invasão de tecidos adjacentes e disseminação de clones somáticos (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Entretanto, a heterogeneidade entre e até mesmo dentro dos tipos de câncer é vasta: os tumores humanos consistem em células que diferem em características fenotípicas clinicamente importantes. Essa heterogeneidade é resultado da interação entre fatores genéticos e não genéticos que moldam a diversidade de fenótipos celulares, que por sua vez se relaciona com dificuldades no diagnóstico preciso e escolha da melhor estratégia terapêutica (ANDRIY MARUSYK; ALMENDRO; KORNÉLIA POLYÁK, 2012).

Mesmo diante dessa diversidade e disparidade fenotípica e genotípica das células cancerígenas, foram concebidos por Hanahan e Weinberg os *Hallmarks*, “princípios fundamentais do câncer”, para sugerir uma fundamentação conceitual que unifica os diferentes aspectos dessa mesma doença. Esses *Hallmarks*

compreendem funcionalidades adquiridas pelas células neoplásicas malignas, como: manutenção de sinalização para proliferação, evasão de supressão do crescimento, resistência à morte celular, imortalidade replicativa, promoção da formação de vasos sanguíneos, invasão e disseminação para outras áreas do corpo, modificação do metabolismo celular e evasão do sistema imunológico (HANAHAN; COUSSENS, 2012 e HANAHAN; WEINBERG, 2011). Mais recentemente foram adicionadas a plasticidade fenotípica, reprogramação epigenética, células senescentes e microbiomas polimórficos (HANAHAN, 2022). Isso demonstra que a complexidade do câncer vai além das células malignas. De fato, tem sido cada vez mais consolidada a participação do microambiente tumoral (MAT) no estabelecimento destes *hallmarks* (HANAHAN; COUSSENS, 2012). O MAT é a estrutura dinâmica que promove a interação de células do tumor, permitindo seu desenvolvimento (**Figura 1**), e apesar de possuir composição variável, é usualmente composto pelas células neoplásicas, células hospedeiras residentes e recrutadas, produtos secretados dessas células e os componentes não celulares dispostos na matriz extracelular (MEC) (ANDERSON, M. CELESTE SIMON, 2020; NIKOLOPOULOU, KOUFAKI, KOSTOUROU, 2021).



**Figura 1. Esquema representativo da composição do microambiente tumoral.** O MAT pode consistir em: células neoplásicas malignas (*cancer cell*); células estromais: fibroblastos (*cancer-associated fibroblast*) e endoteliócitos; células imunes: linfócitos (*lymphocyte*), NK (*natural killer cell*), e macrófagos (*macrophage*) e componentes acelulares da matriz extracelular (*extra-celullar matrix*). Ilustração criada por Hassan e Seno, 2020.

A ancoragem de células à MEC e suas interações ocorrem em tecidos normais e desempenham um papel crucial na regulação do fenótipo e comportamento celular. Através de processos contínuos de remodelação, a MEC modula as vias de sinalização celular, influenciando assim as respostas celulares (SAINIO; JÄRVELÄINEN, 2020). Os locais em que ocorrem as interações células-MEC são chamados de sítios de adesão células-matriz e constituem uma interface interativa entre o ambiente físico-químico extracelular e o suporte celular e maquinário de sinalização (GEIGER; YAMADA, 2011). Essa regulação dinâmica e bidirecional dos processos intercelulares, intracelulares e da matriz é mediada por proteínas como as integrinas e as caderinas, bem como por outros componentes que compõem o chamado adesoma: o conjunto de proteínas que atua na adesão celular (NIKOLOPOULOU, KOUFAKI, KOSTOUROU, 2021; KASZAK *et al.*, 2020).

No câncer, as células presentes no MAT interagem com a matriz extracelular de forma a contribuir na remodelação do tecido, na invasão celular e nas sinalizações que promovem a proliferação, sobrevivência e migração das células do tumor (PICKUP; MOUW; WEAVER, 2014). Quaisquer perturbações na adesão célula-célula e célula-matriz estão relacionadas à progressão tumoral e permitem que as células cancerígenas se tornem mais móveis, degradem a matriz extracelular, entrem nos vasos sanguíneos e formem metástases distantes (SOUSA; PEREIRA; PAREDES, 2019). Ou seja, a MEC e as interações celulares estão diretamente relacionadas com as capacidades fundamentais dos tumores (PICKUP; MOUW; WEAVER, 2014), inclusive contribuindo na formação de metástases (OKEGAWA;PONG;LI;HSIEH, 2004). Pacientes com caquexia associada ao câncer, síndrome multifatorial que leva a perda significativa de peso e massa muscular (KENNETH; FEARON *et al.*, 2011), usualmente ocorre em pacientes com câncer avançado e metastático (LIM *et al.*, 2020; BISWAS, SWARNALI ACHARYYA, 2020). Além disso, estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa demonstraram papel fundamental das células do microambiente tumoral para o desenvolvimento da

síndrome (FREIRE *et al.*, 2020; CURY *et al.*, 2023). No entanto, pouco sabemos sobre os padrões de interações entre células tumorais e matriz e sua relação com caquexia associada ao câncer.

Como mencionado, essas interações bidirecionais entre células e matriz são mediadas pelas moléculas de adesão como as integrinas e as caderinas. Imprescindíveis para a homeostase celular, as integrinas são um grupo de heterodímeros transmembranares importantes para que as células se prendam à matriz ao desempenhar o papel de conectores transmembrana, facilitando as interações entre o citoesqueleto e proteínas da MEC como colágenos, fibronectina e lamininas. A maioria das integrinas está associada a agrupamentos de filamentos de actina (ALBERTS, 2024). A literatura sobre câncer e integrinas sugere que esses receptores de adesão desempenham papéis significativos na proliferação, migração e sobrevivência das células tumorais (MITRA; SCHLAEPFER, 2006). Por atuarem na conexão celular com a MEC, integrinas apresentam funções na migração e invasão celular, facilitando assim a motilidade e invasão tecidual. Também, essas proteínas podem afetar a proliferação celular e influenciam diretamente a remodelação da MEC, regulando a atividade de proteases (ASSOIAN; KLEIN, 2008). É importante notar que as integrinas não desempenham funções apenas quando em ligação, mesmo integrinas não ligadas podem afetar a sobrevivência de células tumorais, dessa forma impactando a capacidade de metástase e também o crescimento do tumor. Portanto, tanto quando ligadas quanto não ligadas é fundamental compreender o comportamento desses receptores no adesoma para entender a eficácia dos tratamentos a eles direcionados (DESGROSELLIER; CHERESH, 2010).

As caderinas, por sua vez, são glicoproteínas transmembranares responsáveis pela adesão célula-célula e manutenção da arquitetura normal dos tecidos (SHAPIRO; WEIS, 2009). Essas proteínas participam das adesões dependentes de cálcio através de seus domínios extracelulares, promovendo interações homotípicas entre células, enquanto sua cauda citoplasmática se conecta a diversas moléculas adaptadoras para transmitir sinais físicos e bioquímicos para o interior da célula (BRUNER; PATRICK; DERKSEN, 2017). Por conta da alta incidência de tumores com origem epitelial em humanos, as moléculas de adesão nas junções entre células epiteliais são de especial interesse. Apesar de alguns estudos terem descrito a função da caderina epitelial (E-Caderina) como supressora

de tumores (SHIMADA *et al.*, 2011; CERESA *et al.*, 2019), a literatura recente também tem demonstrado que a E-caderina, especialmente em cânceres em estágios avançados, pode também promover a migração celular, invasão e até mesmo a progressão tumoral (LABERNADIE *et al.*, 2017; SHAMIR, EWALD, 2015). Doravante, alguns estudos descreveram o processo que ocorre durante a colonização metastática com a reexpressão de caderinas, chamado transição mesenquimal para epitelial (MET), que se apresenta como uma adaptação crítica do microambiente tumoral que promove a proliferação do câncer, disseminação e resistência à quimioterapia (GURRAPU *et al.*, 2019; YEON *et al.*, 2018). Dessa forma, a compreensão dos efeitos das caderinas no comportamento celular pode ser utilizada para desenvolver potenciais abordagens terapêuticas visando regular sua atividade, com o objetivo de inibir o crescimento, invasão e disseminação das células tumorais (PAL *et al.*, 2018).

Para compreender os mecanismos subjacentes a essas diversas respostas ligadas ao adesoma, grupos já se dedicaram à caracterização de proteínas individuais e vias específicas, bem como à coleta de informações sobre múltiplos componentes que, em conjunto, formam o adesoma humano (Zaidel-Bar *et al.*, 2007). Porém, dadas as marcantes diversidades fenotípicas e genotípicas presentes no microambiente tumoral, se faz necessária uma abordagem que permita caracterização do repertório global do adesoma de células individuais do MAT em diferentes tipos tumorais (pan-câncer). Diversos estudos já foram conduzidos utilizando a estratégia de sequenciamento de RNAs convencional (bulk RNA-seq), entretanto essas informações ômicas de conjuntos de células são dominadas pelas populações celulares mais abundantes, normalmente as células neoplásicas, e mascaram os perfis ômicos das populações de baixa abundância ou raras, incluindo os diversos tipos celulares do MAT (VALDES-MORA *et al.*, 2018).

Neste contexto, caracterizações de perfil de expressão em células únicas (single-cell RNA-seq - scRNA-seq) de tumores culminam em um maior detalhamento dos dados ômicos obtidos de forma a contribuir para a estratificação mais precisa dos pacientes de acordo com informações de célula individual, além de potencialmente contribuir para o desenvolvimento de terapias moleculares novas e direcionadas ao adesoma, de forma a frear a progressão tumoral (VALDES-MORA *et al.*, 2018). No entanto, ainda não há uma caracterização global do perfil de

expressão de genes do adesoma, à nível de célula única, demonstrando a contribuição desses genes para a intercomunicação de células do MAT e matriz.

Portanto, neste trabalho focamos em investigar o perfil de expressão de genes do adesoma em dados de scRNA-seq publicamente disponíveis de sete tipos celulares: Células Malignas, Células B, Células T, Dendríticas, Fibroblastos, Macrófagos e Endoteliais de 9 tipos tumorais: Câncer de mama, Colorretal, de pele, Neuroendócrino, de Pâncreas, de Pulmão, de Ovário, de Próstata e de Rim.

## **5. Objetivos**

### 5.1. Objetivos gerais

Caracterizar o perfil transcricional do adesoma de células únicas do microambiente tumoral em análise pan-câncer de tipos tumorais com diferentes prevalências de caquexia.

### 5.2. Objetivos específicos

- 1) Gerar uma lista de genes pertencentes ao adesoma relacionados às classes de integrinas e caderinas;
- 2) Avaliar padrões de expressão de genes do adesoma nas células individuais de diferentes tipos tumorais humanos;
- 3) Identificar e enriquecer os genes com padrão célula-específico;
- 4) Determinar os genes correlacionados com a prevalência de caquexia.

## 6. Materiais e Métodos

### 6.1. Lista de Genes relacionados ao Adesoma

Essa lista baseou-se em 5 referências literárias, que foram selecionadas utilizando a base de dados Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) com as palavras-chave “*adhesion*” e “*adhesome*”: o estabelecimento do adesoma consenso de integrinas por Horton *et al.* (2015), a lista de componentes do adesoma de integrinas usada por Winograd-Katz *et al.* (2014), o atlas funcional do adesoma de integrinas por Zaidel-Bar *et al.* (2007), o conjunto de proteínas ligadas ao adesoma utilizada por Olegs Borodins *et al.* (2023) e o adesoma de caderinas estabelecido por Zaidel-Bar (2013). O trabalho de Horton e colegas integrou sete proteomas de complexo de adesão envolvendo integrinas e gerou uma lista de 2.412 proteínas. Deste trabalho, selecionamos apenas aquelas proteínas e seus respectivos genes presentes em 4 ou mais datasets. Ao fim, todos os genes da lista aqui apresentada foram divididos em genes relacionados às integrinas, genes relacionados às caderinas ou que apresentam relação com ambas.

### 6.2. Análise de dados de scRNA-Seq

Os dados de scRNA-Seq foram obtidos a partir de estudos publicamente disponíveis no 3CA (Curated Cancer Cell Atlas, <https://www.weizmann.ac.il/sites/3CA/>). Foram selecionados 9 tipos tumorais: cânceres pulmão, rim, próstata, mama, pâncreas, neuroendócrino, colorretal, ovário e pele. Selecionamos para essa análise apenas tumores primários de pacientes sem histórico de terapia antitumoral antes da biópsia e preparados pela plataforma 10X Genomics (Califórnia, USA). Ao final, incluímos 231 amostras tumorais e 758088 células sequenciadas. Os dados em *counts* foram processados utilizando o pacote Seurat (v4.0.6) (RAHUL SATIJA *et al.*, 2015) no software RStudio (versão 4.2.3 2023-03-15 ucr). Para tipos de câncer com mais de um estudo disponível, realizamos a integração entre conjuntos de dados utilizando o *IntegrateData* do Seurat (STUART *et al.*, 2019). A identificação dos tipos celulares foi manualmente anotada com base na expressão de genes marcadores estabelecidos tanto pelos estudos originais quanto pela literatura especializada. Esses conjuntos de dados foram filtrados de forma a englobar apenas tipos celulares comumente identificados em pelo menos oito tipos tumorais. Os dados de expressão média dos genes



pertencentes ao adesoma foram obtidos pela função *AverageExpression* e utilizado nas análises subsequentes.

Esses genes enriquecidos foram submetidos a uma filtragem baseada no adesoma utilizando uma lista composta por genes que participam das adesões integrina e caderina mediadas previamente descritas. Em seguida, o perfil de expressão desses genes ligados à adesão foram empregados em análises de clusterização hierárquica usando os pacotes *circlize* (v.0.4.15) e *dendextend* (v1.17.1) no R e algoritmos disponíveis na ferramenta Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>).

### 6.3. Enriquecimentos

Os genes que apresentaram um perfil célula-específico após a clusterização hierárquica foram submetidos a análises, além de enriquecimento funcional utilizando a ferramenta EnrichR (KULESHOV *et al.*, 2016) (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>). Desta plataforma foram utilizados os dados da biblioteca GO Enrichment Analysis (ALEKSANDER *et al.*, 2023) avaliando os componentes celulares e processos biológicos associados ao conjunto de genes.

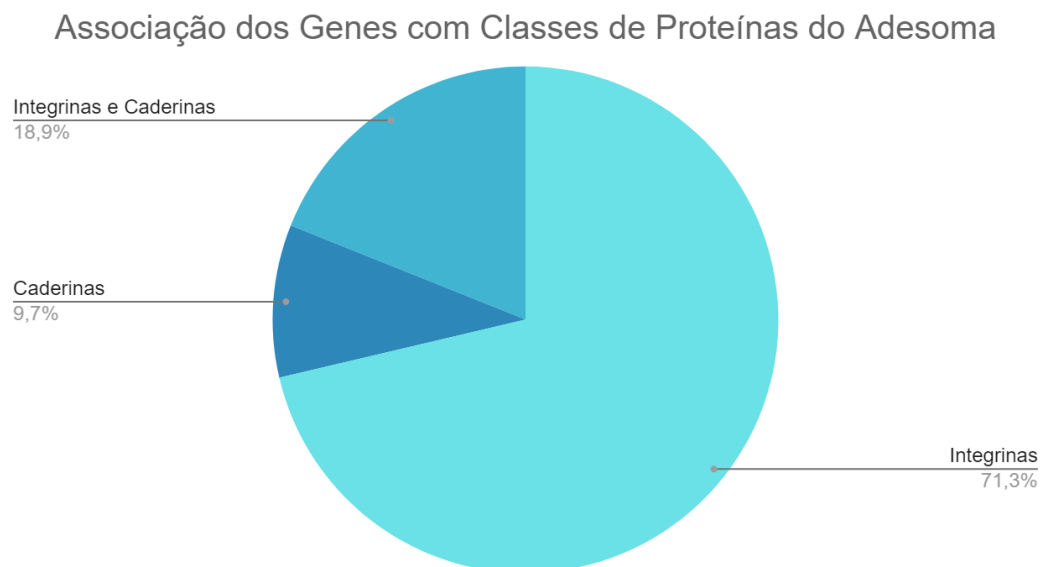
### 6.4. Correlações

Os níveis de expressão dos genes do adesoma em cada tipo celular de cada câncer foram examinados em relação à prevalência de caquexia para cada tipo de tumor utilizando dados de estudos prévios (POISSON *et al.*, 2021). Para esta análise de correlação utilizou-se o teste de correlação de Pearson pela função *cor.test* do pacote *stats* (v4.2.3) no software R, e foram filtrados os genes com correlação estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) e  $r > |0,7|$ .

## 7. Resultados

### 7.1. Lista de genes relacionados ao adesoma

A partir da curadoria dos 5 trabalhos mencionados, obteve-se a lista de genes relacionados ao adesoma que está disponível como material suplementar (**Tabela Suplementar 1**). Na lista observam-se 544 genes, dos quais 388 (71,3%) associam-se às integrinas, 53 (9,7%) às caderinas e 103 (18,9%) a ambas (**Figura 2**), indicando portanto uma notável presença na literatura de genes associados às integrinas.



**Figura 2. Associação dos Genes com Classes de Proteínas do Adesoma.** Gráfico de pizza representando as proporções de genes investigados relacionados com a classe de caderinas, integrinas ou ambas as classes de moléculas. Lista gerada a partir de dados disponíveis na literatura.

### 7.2. Análise transcricional do adesoma em diferentes tipos tumorais humanos

A fim de explorar a heterogeneidade do microambiente tumoral quanto à expressão de genes do adesoma, efetuamos análises dos dados publicamente disponíveis no Curated Cancer Cell Atlas (3CA), onde obtivemos nos 9 tipos tumorais os dados de expressão do adesoma de 7 tipos celulares: Células malignas, células T, células B, macrófagos, células dendríticas, células endoteliais e fibroblastos. Utilizando-se a distância euclidiana como parâmetro foi feita uma

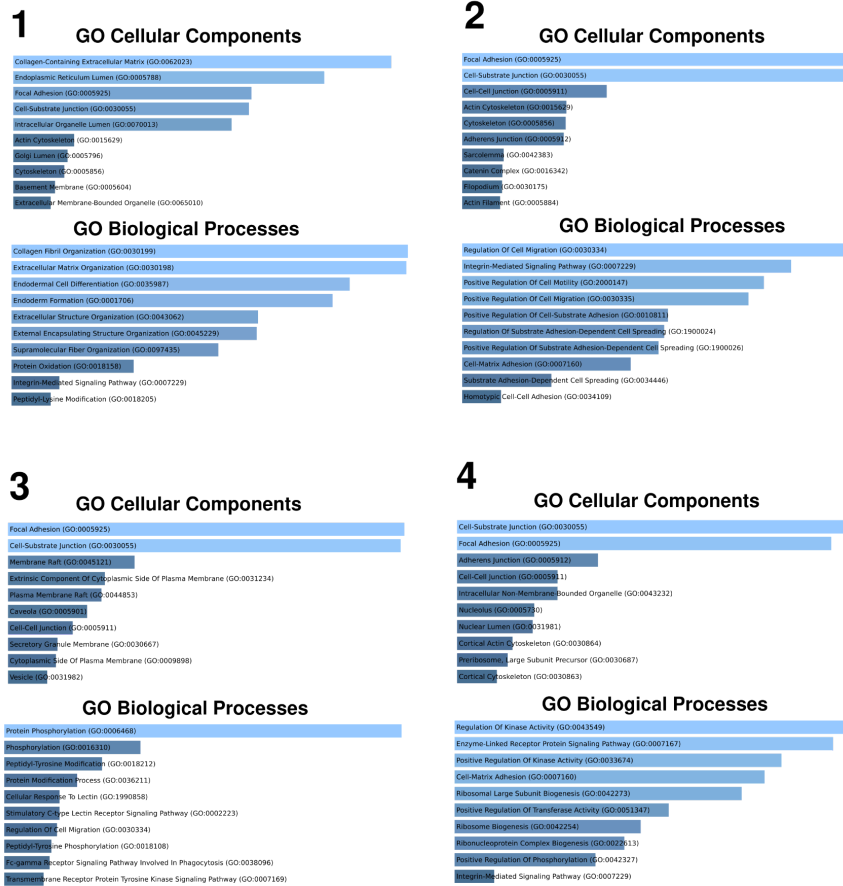
clusterização hierárquica nos dados de expressão média, gerado o dendrograma que se observa na **Figura 3A**. No dendrograma circular observa-se a tendência clusterização das células dendríticas com macrófagos, das células T com as células B e das células endoteliais com fibroblastos, demonstrando uma similaridade dos perfis de expressão do adesoma nessas células.

Para evidenciar os perfis célula-específico e compartilhado, foi gerado o heatmap, a partir da utilização de valores de expressão relativa (**Figura 3B**). Neste heatmap foi feita a clusterização hierárquica usando-se médias de expressão pelo método de correlação *one minus Pearson*, e na imagem é possível observar as mesmas tendências de agrupamento presentes no dendrograma circular. Observamos que os genes do adesoma são expressos por todas as células do MAT, no entanto, é possível identificar alguns genes que são enriquecidos em um conjunto específico de células. Quatro principais conjuntos de genes célula específico estão em destaque na imagem; compreendendo *clusters* de genes enriquecidos em fibroblastos (**Figura 3B-1**), células endoteliais (**Figura 3B-2**), células dendríticas e macrófagos (**Figura 3B-3**) e células malignas (**Figura 3B-4**), independentemente do tipo tumoral.

Esses conjuntos de gene foram enriquecidos na plataforma EnrichR, gerando os gráficos dos componentes e processos biológicos do Gene Ontology que são observados na **Figura 3C**. O cluster 1 apresentou 44 genes, seu enriquecimento de componentes celulares teve como principal termo *Collagen-Containing Extracellular Matrix* (GO:0062023), com valor p ajustado (padj) de 2.457e-15 e seu enriquecimento de processos biológicos teve como principal termo *Collagen Fibril Organization* (GO:0030199; padj 9.260e-10). Já o *cluster 2*, com 102 genes, apresentou enriquecimento de componentes associados ao termo *Focal Adhesion* (GO:0005925) (padj 2.483e-67) e do enriquecimento de processos *Regulation Of Cell Migration* (GO:0030334; padj 3.620e-14). O cluster 3, com 56 genes, teve como principal termo os componentes associados à *Focal Adhesion* (GO:0005925; padj 7.987e-25) e de processos *Protein Phosphorylation* (GO:0006468; padj 5.607e-14). Por fim, o cluster 4 apresentou 87 genes, e teve respectivamente como principais termos de componentes celulares e processos biológicos: *Cell-Substrate Junction* (GO:0030055; padj 1.286e-16) e *Regulation Of Kinase Activity* (GO:0043549; padj 3.136e-9).



C

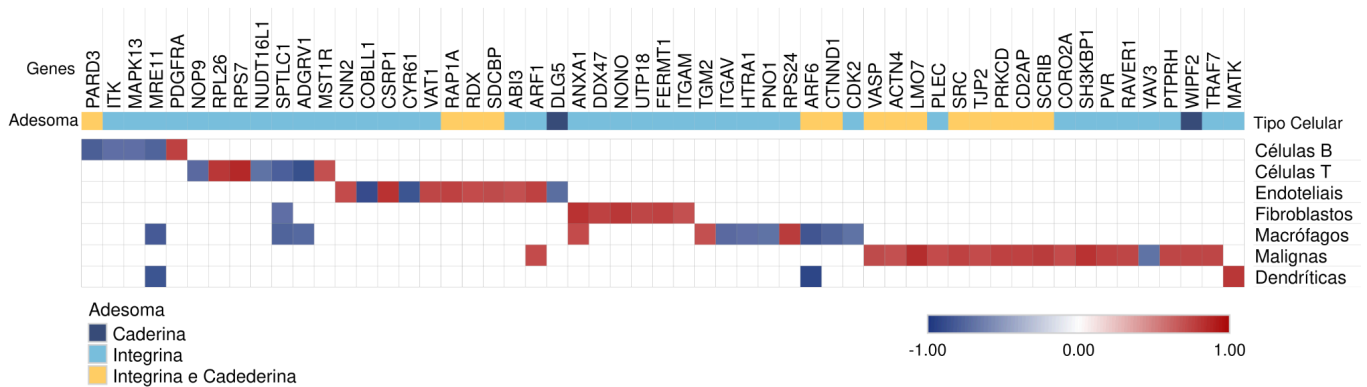


**Figura 3. Caracterização do perfil transcricional de genes relacionados ao adesoma em tumores humanos.** A) Dendograma circular gerado com análise de distância euclidiana nos dados de scRNA-Seq. B) Heatmap do perfil transcricional com clusterização feita pelo método de *One Minus Pearson* aplicada às linhas e colunas. Heatmap gerado pela ferramenta Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>). C) Gráfico de barras demonstrando principais termos enriquecidos dos *clusters* gênicos destacados no heatmap. Figura gerada automaticamente pela ferramenta EnrichR (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>) apresentando termos com valor de p significativos. A tonalidade do azul indica significância: quanto mais claro, mais significativo.

### 7.3. Correlação com prevalência de caquexia

Em seguida, analisamos se haveria correlações dos mesmos com a prevalência de caquexia. Foi gerado um heatmap (**Figura 4**) com os genes que apresentaram correlação estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), e para filtrar apenas as correlações mais relevantes colocamos também o limiar de  $r > |0,7|$ . Os 55 genes que atendem os critérios de valor p e valor r podem ser observados na **Tabela 1**. Para fibroblastos e células malignas, identificamos genes com correlação positiva

com a prevalência de caquexia. Interessante notar que as células malignas apresentam maior número de genes correlacionados com a prevalência de caquexia, enquanto que as células dendríticas apresentaram menor número de genes. Esses dados apontam uma principal contribuição do adesoma expresso por células malignas para a caquexia. Os tipos tumorais e suas prevalências de caquexia associadas são encontrados na **Tabela 2**.



**Figura 4. Correlação de genes do adesoma com prevalência de caquexia.** Heatmap das correlações entre expressão de genes do adenoma e prevalência de caquexia em nove tipos de câncer humanos. Heatmap gerado pela ferramenta Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>). A cor vermelha indica uma correlação de Pearson (valor de r) positiva e a cor azul indica uma correlação negativa entre expressão gênica e prevalência de caquexia.

**Tabela 1.** Lista de genes significativamente correlacionados com a prevalência de caquexia por tipo celular.

<b>Tipo Celular</b>	<b>Genes Correlacionados com Prevalência de Caquexia</b>
	<p><b>Correlação Positiva</b></p>
<b>Células B</b>	<i>PDGFRA</i>
<b>Células T</b>	<i>RPS7, RPL26, MST1R</i>
<b>Endoteliais</b>	<i>ARF1, CSRP1, VAT1, RAP1A, RDX, SDCBP, ABI3, CNN2, DLG5</i>
<b>Fibroblastos</b>	<i>ANXA1, DDX47, NONO, UTP18, FERMT1, ITGAM</i>
<b>Macrófagos</b>	<i>ANXA1, TGM2, RPS24</i>
<b>Malignas</b>	<i>ARF1, ACTN4, VASP, LMO7, PLEC, SRC, TJP2, PRKCD, CD2AP, SCRIB, CORO2A, SH3KBP1, PVR, RAVR1, PTPRH, WIPF2, TRAF7</i>
<b>Dendríticas</b>	<i>MATK</i>
	<p><b>Correlação Negativa</b></p>
	<i>MRE11, ITK, MAPK13, PARD3</i>
	<i>NOP9, NUDT16L1, SPTLC1, ADGRV1</i>
	<i>COBLL1, CYR61</i>
	<i>SPTLC1</i>
	<i>ADGRV1, SPTLC1, MRE11, ITGAV, HTRA1, PNO1, ARF6, CTNND1, CDK2</i>
	<i>VAV3</i>
	<i>ARF6, MRE11</i>

**Tabela 2.** Tipos tumorais e suas respectivas prevalências de caquexia.

<b>Tipo Tumoral</b>	<b>Mama</b>	<b>Colorretal</b>	<b>Rim</b>	<b>Pulmão</b>	<b>Ovário</b>	<b>Pâncreas</b>	<b>Próstata</b>	<b>Pele</b>	<b>Neuroendócrino</b>
<b>Prevalência de Caquexia (%)</b>	30	75	33	65	55	80	44	40	50

## 8. Discussão

Neste trabalho compilamos uma lista de genes relacionados ao adesoma, classificando-os com base nos componentes de adesão com os quais se relacionam: classes das integrinas e caderinas. Usando os dados publicamente disponíveis de scRNA-seq pudemos então averiguar padrões de expressão entre as células e tipos tumorais investigados, o que culminou na primeira análise transcriptômica destes genes em tumores humanos. Nossos resultados revelaram padrões transcricionais e vias envolvidas nas comunicações do microambiente tumoral com a matriz extracelular, fornecendo novas informações sobre essa interação que se mostra cada vez mais importante para os *hallmarks* do câncer (HANAHAN, COUSSENS, 2012; SAINIO; JÄRVELÄINEN, 2020). Também avaliamos correlações estatisticamente relevantes de 55 desses genes com prevalência de caquexia.

Apesar da relevância das moléculas de adesão celulares, ainda há uma carência na literatura de trabalhos que tentam sistematizar a lista de genes envolvidos, principalmente incluindo mais de uma classe de moléculas (ZHONG *et al.*, 2015) A formação de adesões baseadas em integrina tem sido objeto de estudo há mais de 30 anos, e pesquisas identificaram as principais proteínas adaptadoras e quinases que participam direta e indiretamente da formação do complexo associado às integrinas (MICHAEL; PARSONS, 2020). No entanto, diversas outras famílias de proteínas de adesão como caderinas, imunoglobulinas, fibronectinas, lamininas, proteínas CUB, e cateninas não têm recebido tanta atenção, mesmo com evidências que as relacionam com doenças importantes para a saúde pública, como o câncer (ZHONG *et al.*, 2015). Portanto, nosso estudo demonstrou um conjunto de 544 genes que já foram descritos por estudos anteriores como importantes para uma definição do adesoma.

Quanto à caracterização do perfil transcricional do adesoma, foi possível notar tanto no dendograma quanto no heatmap a clusterização de alguns grupos de células que apresentam expressão gênica semelhante, independentemente do tipo tumoral. Fibroblastos e células endoteliais possuem um perfil de expressão de genes do adesoma mais próximo que de outras células. Ao investigar como os fibroblastos associados ao câncer conferem resistência à quimioterapia no câncer de ovário, o trabalho de LEUNG; YEUNG *et al.*, (2018) demonstrou que essas



células regulam positivamente genes como o lipoma-preferred partner (LPP), que está expresso em células endoteliais microvasculares, e que essa maior expressão gênica correlaciona-se com a sobrevivência e a resistência à quimioterapia. Mecanicamente, essa interação aumentou a formação de adesões focais e fibras de estresse para promover a motilidade e a permeabilidade das células endoteliais, o que reforça a importância do *crosstalk* entre fibroblastos e células endoteliais no câncer (LEUNG; YEUNG *et al.*, 2018). Outro exemplo de interação entre estes tipos celulares está relacionado à evasão à apoptose. Nas células endoteliais, o *crosstalk* entre a integrina  $\alpha\beta3$  e o receptor do fator de crescimento de fibroblastos impede a apoptose através de sua via intrínseca, enquanto a integrina  $\alpha\beta5$  e o receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR2) funcionam juntos para inibir a apoptose extrínseca e para permitir que a angiogênese continue ocorrendo (HOOD *et al.*, 2003) Mais estudos serão necessários para demonstrar como os genes do adesoma aqui descritos participam da comunicação entre esses dois tipos celulares.

As células imunes de origem mielóide aqui identificadas (macrófagos e dendríticas) também apresentaram um perfil de expressão que as agruparam. Tanto macrófagos quanto as células dendríticas (DC) são membros do sistema fagocitário mononuclear, com os monócitos como células precursoras comuns. As células desse sistema fagocitário são capazes de captar, processar e apresentar antígenos aos linfócitos T, induzindo assim uma resposta imune. As moléculas de adesão são de crucial importância para a interação das células apresentadoras de antígenos com as células imunes, especialmente os linfócitos T (AMMON *et al.*, 2000). O trabalho de Ammon e colegas comparou o perfil de expressão de integrinas em macrófagos e DCs, concluindo que ambas as células apresentam baixa expressão das cadeias  $\alpha$  de integrinas CD49a, CD49b e CD49d e alta expressão das integrinas CD11a, CD11b, CD11c e CD18, com este último achado sendo inclusive reforçado em 2017 pelo trabalho de Morrison e colegas (AMMON *et al.*, 2000; SCHITTENHELM; HILKENS; MORRISON, 2017). As integrinas CD11b, CD11c e CD18 são produtos, respectivamente, dos genes ITGAM, ITGAX e ITGB2, os quais encontram-se no cluster 3 (predominantemente relacionado aos macrófagos e células dendríticas).

Também, chama a atenção no heatmap os genes com padrão célula-específico de expressão. O primeiro cluster de genes, enriquecido nos fibroblastos (**Figura 3C-1**), apresentou como principais enriquecimentos

*Collagen-Containing Extracellular Matrix* para componente celular e *Collagen Fibril Organization* para processo biológico. Durante a progressão do tumor, os fibroblastos são os principais responsáveis pela regulação disfuncional da remodelação do colágeno, resultando em fibrose tumoral (desmoplasia) caracterizada por deposições excessivas de colágeno no entorno do tumor (PANKOVA, *et al.*, 2016). O *crosslink* e a linearização de colágenos durante a progressão tumoral leva a um aumento na rigidez do tecido que, por sua vez, desencadeia efeitos comportamentais nas células tumorais circundantes, regulando a proliferação celular, diferenciação, expressão gênica, migração, invasão, metástase e sobrevivência, afetando diretamente os *hallmarks* do câncer (PICKUP; MOUW; WEAVER, 2014). Ainda, tecidos tumorais contendo uma grande quantidade desses colágenos estromais derivados de fibroblastos estão diretamente correlacionados a um pior prognóstico para o paciente (NISSEN, N.I., KARSDAL, M., WILLUMSEN, 2019)

O segundo cluster (**Figura 3C-2**) foi identificado em células endoteliais e, com 102 genes, se mostrou o maior dos clusters destacados. O enriquecimento de componentes e processos mostrou, respectivamente, termos relacionados à adesão focal (*Focal Adhesion*) e migração celular (*Regulation Of Cell Migration*) como os principais achados. Foi demonstrado que a hipóxia, que é uma das características fundamentais do MAT, estimula a produção de fatores pró-angiogênicos pelas células tumorais, especialmente o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), resultando na proliferação e migração das células endoteliais, que por sua vez levam à formação de novos vasos sanguíneos que suprem essa deficiência de oxigênio (LOPES-COELHO, MARTINS, SERPA, 2020; JING *et al.*, 2019). Dessa forma, foi sugerido que a sinalização do VEGF altera o ambiente tumoral ao aumentar de forma indireta a migração das células tumorais, sua intravasação e sobrevivência, além de promover a metástase tumoral e a permeabilidade vascular (YANG; CAO, 2022). Por sua vez, o VEGF e seu papel na migração se relacionam diretamente com o adesoma: além do gene promover diretamente a expressão de moléculas de adesão (VERHEUL *et al.*, 2020; KIM, *et al.*, 2001), a integridade da barreira das células endoteliais é regulada por caderinas e integrinas (GIANNOTTA, TRANI, DEJANA, 2013; SÖKELAND; SCHUMACHER, 2019). Também, para se desprender do tumor primário, as células neoplásicas precisam diminuir a expressão das moléculas de adesão célula-a-célula, como as caderinas, que as mantêm

ligadas às células cancerígenas vizinhas. E além desse processo redução das moléculas de adesão célula-a-célula no tumor primário, as células cancerígenas em processo metastático aumentam a expressão de outros tipos de moléculas de adesão célula-a-célula, que permitem que elas se prendam ao endotélio no órgão da futura metástase (SÖKELAND; SCHUMACHER, 2019).

O terceiro cluster (**Figura 3C-3**), associado predominantemente às células dendríticas e macrófagos, teve como principal enriquecimento de componentes (Focal Adhesion) e de fosforilação de proteínas (*Protein Phosphorylation*). O citoesqueleto celular apresenta diversas proteínas que são alvo de quinases, alterando seu comportamento e interações em comparação com seus estados não fosforilados. A fosforilação regula a montagem, desmontagem e dinâmica das proteínas do citoesqueleto, influenciando as propriedades dos polímeros que elas formam. Além disso, a fosforilação afeta a rede de interações envolvendo essas proteínas, impactando assim a estabilidade e função das estruturas poliméricas (LLORENTE-GONZÁLEZ, GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, VICENTE-MANZANARES, 2021). Não é clara na literatura se há um papel dos macrófagos e das DCs com essas fosforilações no contexto do câncer, e mais estudos serão necessários para investigar essa possível associação.

Já o cluster 4 foi identificado predominantemente em células malignas e teve, respectivamente, como primeiro *hit* de componentes celulares e processos biológicos junção célula-substrato (*Cell-Substrate Junction*) e quinases (*Regulation Of Kinase Activity*). A Focal Adhesion Kinase (FAK) é uma quinase de tirosina não associada a receptores e é principalmente regulada pela sinalização de integrinas (MURPHY, JEONG, RODRIGUEZ *et al.*, 2019) A FAK desempenha um papel crucial na regulação de processos celulares essenciais, incluindo adesão, migração, proliferação e sobrevivência, e também promove características malignas importantes durante a progressão do câncer, como a formação de células-tronco cancerígenas, a transição epitelial para mesenquimal, angiogênese tumoral, resistência à quimioterapia e fibrose estromal (SULZMAIER, JEAN, SCHLAEPFER, 2014; LEE; TIMPSON; HORVATH; DALY, 2015)

Células tumorais, por meio da secreção de fatores de crescimento e da ativação de receptores específicos de células endoteliais, induzem a ativação conformacional da FAK por meio de múltiplos mecanismos (SULZMAIER; JEAN; SCHLAEPFER, 2014). Não foram encontradas na literatura fontes que sugerem um

papel das células malignas na regulação dessas FAKs, e novos estudos podem ser conduzidos com o intuito de elucidar essa possível associação.

Por fim, a análise de correlação de genes do adesoma com prevalência de caquexia revelou 55 genes, com 6 deles significativamente correlacionados em mais de um tipo celular: *MRE11*, *ADGRV1*, *SPTLC1*, *ARF1*, *ANXA1*, *ARF6* (**Figura 4**). Um estudo investigando a expressão gênica de *SPTLC1* em modelos murinos de caquexia associada ao câncer colorretal (C26) demonstrou que a expressão deste gene diminui em diferentes órgão afetados na caquexia (MORIGNY *et al.*, 2020). Além disso, a citocina pró-inflamatória TNF, importante indutor de caquexia derivado das células tumorais, induz secreção de IL-15 utilizando ADP-ribosylation factor 6 (ARF6) (OUYANG *et al.*, 2013). No entanto, pouco sabemos atualmente sobre o envolvimento desses genes no microambiente tumoral de pacientes com caquexia.

O gene *MRE11*, que apareceu negativamente correlacionado com a prevalência de caquexia, participa do complexo Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN), que desempenha um papel importante na resposta ao dano no DNA e na via de reparo de quebras de fita dupla (KANAAR; WYMAN, 2008). O trabalho de Situ *et al.*, 2019, destaca que uma função defeituosa e baixa expressão do complexo MRN e de seus componentes levam a uma maior propensão para a desestabilização celular, acúmulo de danos no DNA e transformação maligna (SITU *et al.*, 2019). Por sua vez, a alta expressão de *ARF1*, que apareceu positivamente correlacionado com a prevalência de caquexia, foi associada a estágios avançados e baixa sobrevida do câncer colorretal. *ARF1* promoveu a tumorigênese do cólon e subsequente ativação da sinalização quinase extracelular sinal regulada (ERK) e fissão mitocondrial (SITU *et al.*, 2019). Por fim, o gene *ANXA1* já foi extensamente ligado ao câncer e sua progressão. O estudo de Pessolano *et al.*, 2018 sugere que *ANXA1* relacionado a vesículas extracelulares é capaz de promover migração celular, invasão e angiogênese, confirmando a relevância dessa proteína na progressão de câncer pancreático (PESSOLANO *et al.*, 2018).

## **9. Perspectivas Futuras**

Dada a clara importância do adesoma para processos como resistência terapêutica, metástase e caquexia, fica evidente a necessidade de que sejam conduzidos mais estudos, principalmente aqueles que abordem tópicos pouco explorados na área, como análises em resolução de célula única e outras classes de moléculas de adesão para além das integrinas e caderinas. Quanto a este trabalho, pretende-se continuar seu desenvolvimento com a perspectiva de demonstrar a interação das células do microambiente tumoral mediada pelo adesoma e validar os achados em dados de RNA-Seq, utilizando amostras de tecidos normais para controle e incorporando informações clínicas sobre os pacientes.

## **10. Conclusões**

Conclui-se que a técnica de scRNA-Seq é eficaz para caracterizar o perfil de expressão de genes do adesoma em resolução de célula única. Essa abordagem mostra que as células do microambiente tumoral expressam genes do adesoma. Além disso, nossos resultados apontam para padrões de expressão associados a tipos celulares com potencial relevância para a progressão tumoral e caquexia.

## 11. Material Suplementar

[Tabela Suplementar 1. Lista Final dos 544 Genes Relacionados ao Adesoma](#)

## 12. Referências

- 1) ALBERTS, Bruce. Fundamentos da biologia celular. 4 Porto Alegre: Artmed Editora LTDA, 2017.
- 2) ANDERSON, N.; M. CELESTE SIMON. The tumor microenvironment. *Current Biology*, v. 30, n. 16, p. R921–R925, 1 ago. 2020.
- 3) ANDRIY MARUSYK; ALMENDRO, V.; KORNÉLIA POLYÁK. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nature Reviews Cancer*, v. 12, n. 5, p. 323–334, 19 abr. 2012.
- 4) ALEKSANDER, S. A. et al. The Gene Ontology knowledgebase in 2023. *Genetics*, v. 224, n. 1, 3 mar. 2023.
- 5) ANNELE SAINIO; HANNU JÄRVELÄINEN. Extracellular matrix-cell interactions: Focus on therapeutic applications. *Cellular Signalling*, v. 66, p. 109487–109487, 1 fev. 2020.
- 6) AMMON, C., MEYER, S.P., SCHWARZFISCHER, L., KRAUSE, S. W., R. ANDREESSEN, R., KREUTZ, R. M. Comparative analysis of integrin expression on monocyte-derived macrophages and monocyte-derived dendritic cells. *Immunology Insights into immunity in health and disease*. Volume 100, Issue 3. Pages: 269-404, July 2000.
- 7) ASSOIAN, R. K.; KLEIN, E. A. Growth control by intracellular tension and extracellular stiffness. *Trends in Cell Biology*, v. 18, n. 7, p. 347–352, 1 jul. 2008.
- 8) BISWAS, A. K.; SWARNALI ACHARYYA. Understanding cachexia in the context of metastatic progression. *Nature Reviews Cancer*, v. 20, n. 5, p. 274–284, 31 mar. 2020.
- 9) BRUNER, Heather C., DERKSEN, Patrick W. B., Loss of E-Cadherin-Dependent Cell–Cell Adhesion and the Development and Progression of Cancer. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017.
- 10) BUNZ F. Principles of Cancer Genetics. Springer Netherlands: Dordrecht; 2016.
- 11) CERESA, D. et al. Cdh4 Down-Regulation Impairs in Vivo Infiltration and Malignancy in Patients Derived Glioblastoma Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 16, p. 4028–4028, 18 ago. 2019.

- 12) CURY, SARAH SANTILONI et al. Low muscle mass in lung cancer is associated with an inflammatory and immunosuppressive tumor microenvironment. *Journal of Translational Medicine*, v. 21, n. 1, 11 fev. 2023.
- 13) DESGROSELLIER, J., CHERESH, D. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 10, 9–22 (2010).
- 14) FREIRE, PAULA PACCIELLI et al. The expression landscape of cachexia-inducing factors in human cancers. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, v. 11, n. 4, p. 947–961, 3 mar. 2020.
- 15) GEIGER, B.; YAMADA, K. Molecular Architecture and Function of Matrix Adhesions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 3, n. 5, p. a005033–a005033, 9 mar. 2011.
- 16) GIANNOTTA, Monica, TRANI, Marianna, DEJANA, Elisabetta VE-Cadherin and Endothelial Adherens Junctions: Active Guardians of Vascular Integrity. *Developmental Cell* 26, September 16, 2013, Elsevier Inc.
- 17) GURRAPU, Sreeharsha et al. Reverse signaling by semaphorin 4C elicits SMAD1/5- and ID1/3-dependent invasive reprogramming in cancer cells. *SCIENCE SIGNALING*, 20 Aug 2019. Vol 12, Issue 595. 9.
- 18) HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646–674, 1 mar. 2011.
- 19) HANAHAN, D.; COUSSENS, L. M. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*, v. 21, n. 3, p. 309–322, 1 mar. 2012.
- 20) HANAHAN, Douglas Hallmarks of Cancer: New Dimensions . Volume 12, Issue 1, 1 January 2022.
- 21) HASSAN, G.; SENO, M. Blood and Cancer: Cancer Stem Cells as Origin of Hematopoietic Cells in Solid Tumor Microenvironments. *Cells*, v. 9, n. 5, p. 1293–1293, 22 maio 2020.
- 22) HOOD, John D., FRAUSTO, Ricardo, KIOSSES, William B., SCHARTZ, Martin A., CHERESH, David A. Differential  $\alpha$ v integrin–mediated Ras-ERK signaling during two pathways of angiogenesis. *J Cell Biol* (2003) 162 (5): 933–943.
- 23) JU HUN YEON et al. Cancer-derived exosomes trigger endothelial to mesenchymal transition followed by the induction of cancer-associated fibroblasts. *Acta Biomaterialia*, v. 76, p. 146–153, 1 ago. 2018.



- 24) KANAAR, R.; WYMAN, C. DNA Repair by the MRN Complex: Break It to Make It. *Cell*, v. 135, n. 1, p. 14–16, 1 out. 2008.
- 25) KASZAK, Ilona, Olga Witkowska-Piłaszewicz, Zuzanna Niewiadomska, Bożena Dworecka-Kaszak, Felix Ngosa Toka, and Piotr Jurka. "Role of Cadherins in Cancer—A Review" *International Journal of Molecular Sciences* 21, no. 20: 7624, 2020.
- 26) KENNETH CH. FEARON et al. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *The Lancet Oncology*, v. 12, n. 5, p. 489–495, 1 maio 2011.
- 27) KIM, Injune et al. Vacular Endothelial Growth Factor Expression of Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1), Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1) and E-selectin through Nuclear Factor-kB Activation in Endothelial Cells. *Mechanisms of Signal Transduction*, Volume 276, Issue 10, P 7614-7620, March, 2001.
- 28) KULESHOV, M. V. et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Research*, v. 44, n. W1, p. W90–W97, 3 maio 2016.
- 29) LABERNADIE, A., KATO, T., BRUGUÉS, A. et al. A mechanically active heterotypic E-cadherin/N-cadherin adhesion enables fibroblasts to drive cancer cell invasion. *Nat Cell Biol* 19, 224–237 (2017).
- 30) LEE, Brian Y., TIMPSON, Paul, HORVATH, Lisa G., DALY, Roger J. FAK signaling in human cancer as a target for therapeutics. *Pharmacology & Therapeutics*. Volume 146, February 2015, Pages 132-149.
- 31) LEUNG, Cecilia S. YEUNG, Tsz-Lun et al. Cancer-associated fibroblasts regulate endothelial adhesion protein LPP to promote ovarian cancer chemoresistance. *J Clin Invest*. 2018;128(2):589-606.
- 32) LIM, S. et al. Development and progression of cancer cachexia: Perspectives from bench to bedside. *Sports Medicine and Health Science*, v. 2, n. 4, p. 177–185, 1 dez. 2020.
- 33) LLORENTE-GONZÁLEZ, Clara, GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, Marta, VICENTE-MANZANARES, Marta Targeting cytoskeletal phosphorylation in câncer. *Exploration Targeted Antitumor Therapy*. 2021;2:292–308.
- 34) LOPES-COELHO, Filipa, MARTINS, Filipa, SERPA, Jacinta Endothelial Cells (ECs) Metabolism: A Valuable Piece to Disentangle Cancer Biology. In: Serpa,

- J. (eds) Tumor Microenvironment . Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 1219, 2020. Springer, Cham.
- 35) MICHAEL, Magdalene, PARSONS, Maddy New perspectives on integrin-dependent adhesions. *Current Opinion in Cell Biology*, Volume 63, April 2020, Pages 31-37.
  - 36) MITRA, Satyajit K., SCHLAEPFER David D.,Integrin-regulated FAK–Src signaling in normal and cancer cells. *Current Opinion in Cell Biology*. Volume 18, Issue 5, October 2006, Pages 516-523
  - 37) MORIGNY, P. et al. High levels of modified ceramides are a defining feature of murine and human cancer cachexia. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, v. 11, n. 6, p. 1459–1475, 8 out. 2020.
  - 38) MURPHY, J.M., JEONG, K., RODRIGUEZ, Y.A.R. et al. FAK and Pyk2 activity promote TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ -mediated pro-inflammatory gene expression and vascular inflammation. *Sci Rep* 9, 7617 (2019).
  - 39) NIKOLOPOULOU, P. A.; KOUFAKI, M. A.; VASSILIKI KOSTOUROU. The Adhesome Network: Key Components Shaping the Tumour Stroma. *Cancers*, v. 13, n. 3, p. 525–525, 30 jan. 2021.
  - 40) NISSEN, N.I., KARSDAL, M., WILLUMSEN, N. Collagens and Cancer associated fibroblasts in the reactive stroma and its relation to Cancer biology. *J Exp Clin Cancer Res* 38, 115 (2019).
  - 41) OKEGAWA T; PONG RC;LI Y; HSIEH JT. The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy. *Acta biochimica Polonica*, v. 51, n. 2, 2004.
  - 42) PAL, Mintu, BHATTACHARYA, Sourya , KALYAN Gazal, HAZRA, Saugata Cadherin profiling for therapeutic interventions in Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) and tumorigenesis. *Experimental Cell Research*. Volume 368, Issue 2, 15 July 2018, Pages 137-146.
  - 43) PANKOVA, Daniela et al. Cancer-Associated Fibroblasts Induce a Collagen Cross-link Switch in Tumor Stroma. *Mol Cancer Res* (2016) 14 (3): 287–295. MCR-15-0307.
  - 44) PICKUP, M. W.; MOUW, J. K.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Reports*, v. 15, n. 12, p. 1243–1253, 10 nov. 2014.

- 45) POISSON, J. et al. Prevalence and prognostic impact of cachexia among older patients with cancer: a nationwide cross-sectional survey (NutriAgeCancer). *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, v. 12, n. 6, p. 1477–1488, 14 set. 2021.
- 46) RAHUL SATIJA et al. Spatial reconstruction of single-cell gene expression data. *Nature Biotechnology*, v. 33, n. 5, p. 495–502, 13 abr. 2015.
- 47) SANTOS, M. DE O. et al. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 69, n. 1, 6 fev. 2023.
- 48) SCHITTENHELM, Leonie, HILKENS, Catharien M., MORRISON, Vicky L.  $\beta_2$  Integrins As Regulators of Dendritic Cell, Monocyte, and Macrophage Function. *Front. Immunol.*, 20 December 2017. Sec. Immunological Tolerance and Regulation, Volume 8 – 2017.
- 49) SHAMIR, Elisha, EWALD, Andrew J. Adhesion in Mammary Development: Novel Roles for E-Cadherin in Individual and Collective Cell Migration. *Current Topics in Developmental Biology*. Volume 112, 2015, Pages 353-382.
- 50) SHAPIRO, L.; WEIS, W. I. Structure and Biochemistry of Cadherins and Catenins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 1, n. 3, p. a003053–a003053, 19 ago. 2009.
- 51) SHIMADA, Shu, MIMATA, Ayako, SEKINE, Masaki, MOGUSHI, Kaoru, AKIYAMA, Yoshimitsu, FUKAMACHI, Hiroshi, JONKERS, Jos, TANAKA, Hiroshi, EISHI, Yoshinobu, YUASA, Yasuhito Synergistic tumour suppressor activity of E-cadherin and p53 in a conditional mouse model for metastatic diffuse-type gastric cancer. *GUT*, Volume 61, Issue 3, 2011.
- 52) SÖKELAND, G., SCHUMACHER, U. The functional role of integrins during intra- and extravasation within the metastatic cascade. *Mol Cancer* 18, 12 (2019).
- 53) SOUSA B., PEREIRA, J., PAREDES, J. The Crosstalk Between Cell Adhesion and Cancer Metabolism. *Int J Mol Sci*. 2019 Apr 19;20(8):1933.
- 54) STUART, T. et al. Comprehensive Integration of Single-Cell Data. *Cell*, v. 177, n. 7, p. 1888-1902.e21, 1 jun. 2019.
- 55) SULZMAIER, F., JEAN, C. & SCHLAEPFER, D. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nat Rev Cancer* 14, 598–610 (2014).

- 56) SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 71, n. 3, p. 209–249, 4 fev. 2021.
- 57) VALDES-MORA, F. et al. Single-Cell Transcriptomics in Cancer Immunobiology: The Future of Precision Oncology. *Frontiers in Immunology*, v. 9, 12 nov. 2018.
- 58) VERHEUL, Henk M. W. et al. Vascular endothelial growth factor–stimulated endothelial cells promote adhesion and activation of platelets. *Blood* (2000) 96 (13): 4216–4221.
- 59) ZAIDEL-BAR, Ronen, ITZKOVITZ, Shalev, MA'AYAN, Avi, IYENGAR, R. and GEIGER, B. (2007). Functional atlas of the integrin adhesome. *Nature Cell Biology*, [online] 9(8), pp.858–867.
- 60) ZHONG, Xiaoming, DRGONOVA, Jana, LI, Chuan-Yun, UHL, Gerge R. Human cell adhesion molecules: annotated functional subtypes and overrepresentation of addiction-associated genes. *Annals of the New York Academy of Science*, 2015.
- 61) YANG, Yunlong, CAO, Yihai The impact of VEGF on cancer metastasis and systemic disease. *Seminars in Cancer Biology*. Volume 86, Part 3, November 2022, Pages 251-261.