

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

JÚLIA CAROLINE MARCOLIN

**AVALIAÇÃO DA HETEROGENEIDADE DE VIAS DE SINALIZAÇÃO ATIVADAS
POR RECEPTORES DE TIROSINA QUINASE EM CÂNCER DE MAMA**

DOIS VIZINHOS

2025

JÚLIA CAROLINE MARCOLIN

**AVALIAÇÃO DA HETEROGENEIDADE DE VIAS DE SINALIZAÇÃO ATIVADAS
POR RECEPTORES DE TIROSINA QUINASE EM CÂNCER DE MAMA**

**Evaluation of the heterogeneity of signaling pathways activated by tyrosine
kinase receptors in breast cancer**

Trabalho de conclusão de curso de Especialização
apresentado como requisito para obtenção do título
de Especialização em Biologia Molecular –
Habilitação Bioinformática da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientadora: Prof^a Dr^a Betty Cristiane Kuhn

DOIS VIZINHOS

2025



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Esta licença permite download e compartilhamento do trabalho desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es), sem a possibilidade de alterá-lo ou utilizá-lo para fins comerciais. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

JÚLIA CAROLINE MARCOLIN

**AVALIAÇÃO DA HETEROGENEIDADE DE VIAS DE SINALIZAÇÃO ATIVADAS
POR RECEPTORES DE TIROSINA QUINASE EM CÂNCER DE MAMA**

Trabalho de conclusão de curso de Especialização apresentado como requisito para obtenção do título de Especialização em Biologia Molecular – Habilitação Bioinformática da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 24 de março de 2025

Betty Cristiane Kuhn
Doutora em Genética e Melhoramento
Universidade Estadual de Maringá

Martina Lichtenfels
Doutora em Ciências Médicas
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Alice Laschuk Herlinger
Doutora em Biotecnologia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

DOIS VIZINHOS

2025

RESUMO

Os Receptores de Tirosina Quinase (RTKs) são receptores presentes na membrana celular que medeiam a transição e ativação de diversos sinais intracelulares. Entre as vias de sinalização ativadas por RTKs estão a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), Janus quinase (JAK) e fosfoinosítídeo 3-quinase (PI3K), responsáveis pelo crescimento, proliferação, sobrevivência e migração celular. Devido à sua participação na regulação de processos fundamentais da célula, alterações nas vias ativadas por RTKs estão frequentemente relacionadas ao câncer. O câncer de mama é a neoplasia mais comum entre mulheres no mundo todo, e muitas pacientes apresentam resistência às drogas utilizadas no tratamento, o que impacta negativamente as respostas à terapia. Diversos mecanismos estão envolvidos no processo de resistência, entre eles a heterogeneidade tumoral. A heterogeneidade pode ser inter ou intratumoral, resultando na adaptação e sobrevivência das células aos estímulos recebidos, como a quimioterapia, por exemplo. Portanto, a investigação da heterogeneidade tumoral é essencial na identificação e desenvolvimento de melhores tratamentos para o câncer. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a heterogeneidade de vias de sinalização ativadas por RTKs em câncer de mama, a partir da análise bioinformática de banco de dados disponíveis. Os resultados demonstram que a expressão gênica dentro de um mesmo tumor é altamente variável, com algumas células apresentando alta expressão enquanto outras exibem expressão ausente, evidenciando a heterogeneidade intratumoral. Tumores ER+ apresentaram maior homogeneidade na expressão gênica, enquanto os subtipos HER2+ e triplo-negativo exibiram padrões mais variados, refletindo diferenças na biologia tumoral. Além disso, a ativação diferencial dessas vias sugere seu potencial papel na progressão tumoral e na resistência terapêutica. Assim, conclui-se que a análise da heterogeneidade tumoral é fundamental para compreender a complexidade do câncer de mama, e que abordagens como o sequenciamento de células únicas podem contribuir para o desenvolvimento de terapias mais eficazes e personalizadas.

Palavras-chave: câncer; mama; heterogeneidade; sinalização; tratamento.

ABSTRACT

Tyrosine Kinase Receptors (RTKs) are cell membrane receptors that mediate the transition and activation of various intracellular signals. Among the signaling pathways activated by RTKs are mitogen-activated protein kinase (MAPK), Janus kinase (JAK), and phosphoinositide 3-kinase (PI3K), which are responsible for cell growth, proliferation, survival, and migration. Due to their role in regulating fundamental cellular processes, alterations in RTK-activated pathways are frequently associated with cancer. Breast cancer is the most common neoplasm among women worldwide, and many patients exhibit resistance to the drugs used in treatment, negatively impacting therapeutic responses. Various mechanisms are involved in the resistance process, among them tumor heterogeneity. Heterogeneity can be inter- or intratumoral, resulting in the adaptation and survival of cells to received stimuli, such as chemotherapy, for example. Therefore, investigating tumor heterogeneity is essential in identifying and developing better treatments for cancer. Thus, the aim of this study is to evaluate the heterogeneity of signaling pathways activated by RTKs in breast cancer, through bioinformatic analysis of available databases. The results demonstrate that gene expression within the same tumor is highly variable, with some cells exhibiting high expression while others show absent expression, highlighting intratumoral heterogeneity. ER+ tumors displayed greater homogeneity in gene expression, whereas HER2+ and triple-negative subtypes exhibited more diverse patterns, reflecting differences in tumor biology. Moreover, the differential activation of these pathways suggests their potential role in tumor progression and therapeutic resistance. Therefore, it is concluded that analyzing tumor heterogeneity is essential for understanding the complexity of breast cancer, and that approaches such as single-cell sequencing may contribute to the development of more effective and personalized therapies.

Keywords: cancer; breast; heterogeneity; signaling; treatment.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	6
1.1	Objetivos	7
1.1.1	Objetivo Geral	7
1.1.2	Objetivos Específicos	7
2	REVISÃO DE LITERATURA	8
2.1	Câncer de mama	8
2.2	Receptores de tirosina quinase	10
2.2.1	MAPK	11
2.2.2	JAK/STAT	12
2.2.3	PI3K/AKT	12
2.3	Heterogeneidade tumoral	13
2.4	Bioinformática	15
2.4.1	Banco de dados	16
2.4.2	Análise de sequenciamento de RNA de células únicas	16
3	METODOLOGIA	19
3.1	Coleta de dados	19
3.2	Análise da heterogeneidade tumoral	19
3.3	Heterogeneidade entre subtipos de câncer de mama	20
3.4	Comparação de amostras tumorais com controle saudável	20
4	RESULTADOS	21
4.1	Seleção dos dados de células tumorais	21
4.2	Avaliação da heterogeneidade intratumoral	22
4.3	Avaliação da heterogeneidade entre subtipos tumorais	26
4.4	Comparação de amostras tumorais com controle saudável	27
5	DISCUSSÃO	29
6	CONCLUSÃO	32
	REFERÊNCIAS	33

1. INTRODUÇÃO

Os Receptores de Tirosina Quinase (RTKs) compõem uma família de receptores de membrana celular responsáveis por regular diversas funções e pela transdução de sinais em resposta a estímulos intra e extracelulares (Jaradat *et al.*, 2024). Diversas vias são ativadas pela ação de RTKs, entre as quais se destacam a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), Janus quinase (JAK)/transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT) e fosfoinosítideo 3-quinase (*phosphoinositide 3-kinase* - PI3K)/proteína quinase B (AKT) (Eroles *et al.*, 2012). Em razão de seu envolvimento em processos essenciais para as células, mutações e desregulação nas vias MAPK, JAK/STAT e PI3K/AKT costumam estar relacionadas com o desenvolvimento e progressão de diversos tipos de câncer, incluindo o câncer de mama (Butti *et al.*, 2018).

O câncer de mama é o tipo mais comum entre as mulheres no mundo, com previsão de 73.610 novos casos no Brasil entre 2023 e 2025 (INCA, 2022). Sua origem envolve fatores genéticos e ambientais, e sua classificação molecular considera a presença de receptores hormonais, receptores de crescimento e taxa de proliferação (Clusan *et al.*, 2023; Perou *et al.*, 2000). Os subtipos incluem Luminal A, Luminal B, Luminal B HER2-positivo, HER2-positivo e Basal. Enquanto os tumores luminais são mais frequentes e apresentam melhores prognósticos, o subtipo Basal é mais agressivo e frequentemente associado a mutações no gene BRCA1 (Perou *et al.*, 2000; Eroles *et al.*, 2012; Bauer *et al.*, 2007).

O tratamento envolve quimioterapia, radioterapia e cirurgia, mas a resistência ao tratamento é um desafio, comprometendo a resposta terapêutica e o prognóstico (Saatci; Huynh-Dam; Sahin, 2021). A heterogeneidade tumoral, comum no câncer, pode ocorrer entre pacientes (intertumoral) ou dentro do mesmo tumor (intratumoral), sendo influenciada por fatores genéticos e epigenéticos que garantem a adaptação das células cancerígenas (Zardavas *et al.*, 2015; Assidy, Caldas, Bruna, 2016; Cornwell *et al.*, 2016; Lenz, 2024). Assim, diferentes células podem responder de forma desigual ao tratamento, permitindo a sobrevivência de populações resistentes (Swanton, Burrell, Futreal, 2011; Bergenfelz *et al.*, 2015).

A compreensão da heterogeneidade tumoral é essencial para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Técnicas de análise de células únicas, combinadas com ferramentas bioinformáticas, têm se mostrado fundamentais para avançar nos estudos sobre heterogeneidade (Navin *et al.*, 2011;

Yuan *et al.*, 2019). Portanto, unificar os conhecimentos biológicos da carcinogênese com as metodologias avançadas de informática é fundamental para avançar no diagnóstico, tratamento e prognóstico de pacientes com câncer.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a heterogeneidade de vias de sinalização ativadas por Receptores de Tirosina Quinase (RTKs) em câncer de mama através de uma abordagem bioinformática.

1.1.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a heterogeneidade intratumoral de genes relacionados às vias de sinalização ativadas por RTKs com dados de sequenciamento de células únicas de pacientes com câncer de mama.

2. Construir e comparar perfis de expressão de vias de sinalização de pacientes com diferentes subtipos de câncer de mama.

3. Comparar a expressão gênica dos subtipos tumorais de câncer de mama com amostras de controle saudável.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer de mama

Atualmente, o câncer de mama é a neoplasia mais comum entre as mulheres no mundo todo, conforme relatado pelo Observatório Global do Câncer (*The Global Cancer Observatory* – GLOBOCAN 2022). Projeta-se que, em 2030, ocorrerão 2,74 milhões de novos diagnósticos de câncer de mama mundialmente, resultando em mais de 850 mil óbitos (GLOBOCAN 2022). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2022) estima a ocorrência de 73.610 novos casos para o triênio de 2023 a 2025. Os mecanismos biológicos que direcionam o surgimento do câncer de mama são complexos e podem ser causados por diversos fatores de risco como genética, exposição hormonal, estilo de vida, alimentação, consumo de álcool, obesidade e ambiente (Clusan *et al.*, 2023). Em relação à histologia, a maioria dos cânceres de mama são adenocarcinomas, dos quais 85% são originados nos ductos mamários, e 15% no epitélio lobular (Feng *et al.*, 2018).

Além disso, o câncer de mama é classificado molecularmente com base na expressão de três marcadores principais: receptores hormonais, receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (*Human Epidermal growth factor Receptor-type 2* – HER2) e índice de proliferação celular medida através de Ki67. Os subtipos moleculares são denominados como Luminal A, Luminal B, Luminal B HER2-positivo, HER2-positivo e triplo negativo (Figura 01) (Perou *et al.*, 2000; Eroles *et al.*, 2012). Luminal A, o subtipo mais comum, representa cerca de 50-60% dos casos e possui expressão positiva para receptores hormonais, como receptores de estrogênio (ER) e/ou receptores de progesterona (PR). Ademais, não possui expressão de HER2 e apresenta baixos níveis de Ki67, o que caracteriza um crescimento lento do tumor e melhor prognóstico para a doença. O tratamento é baseado em inibidores de aromatase e moduladores seletivos do receptor de estrogênio, como o tamoxifeno (Perou *et al.*, 2000; Eroles *et al.*, 2012).

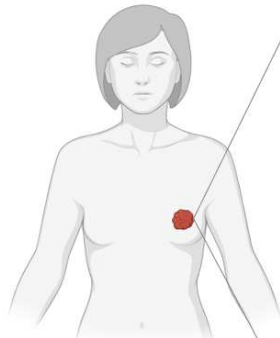
O subtipo Luminal B também possui expressão positiva para ER e/ou PR e altos níveis de Ki67, o que torna seu crescimento mais rápido em comparação ao Luminal A (Perou *et al.*, 2000; Eroles *et al.*, 2012). Em alguns casos, tumores Luminais B também podem apresentar expressão positiva de HER2, sendo denominado Luminal B HER2. Tumores com o perfil molecular de HER2-positivos

representam de 15 a 20% dos tumores malignos de mama e são caracterizados pela alta expressão de HER2 e ausência de receptores hormonais. Embora possuam um prognóstico desfavorável, pacientes com tumor HER2+ contam com tratamento específico com o uso de trastuzumabe, um medicamento anti-HER2 que beneficia a resposta a terapia (Perou *et al.*, 2000; Piccart- Gebhart *et al.*, 2005).

Tumores triplo negativos, estão entre 10-15% dos casos e não expressam ER, PR e HER2. São considerados tumores mais agressivos e com pior prognóstico, estando associados também a mutações em *BRCA1*, um gene fundamental para reparo de DNA. Nesses casos, o uso de inibidores de poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) pode ser benéfico, uma vez que leva ao acúmulo de quebras de duplas fitas de DNA e morte celular (Eroles *et al.*, 2012; Bauer *et al.*, 2007).

Os tratamentos de rotina para câncer de mama consistem em cirurgia, radioterapia, quimioterapia, hormônio terapia e terapia alvo (PDQ *Adult Treatment Editorial Board* 2016). A quimioterapia é parte fundamental no tratamento do câncer de mama e tem como padrão o regime AC-T, composto pela combinação das drogas adriamicina, ciclofosfamida e um taxano (NCCN 2015; Fujii *et al.*, 2015). Ademais, a quimioterapia neoadjuvante, realizada antes da cirurgia de retirada do tumor, vem apresentando boa eficiência e vantagens adicionais (Mauri; Pavlidis; Ioannidis, 2005; Rastogi *et al.*, 2008). Com a quimioterapia neoadjuvante é possível, por exemplo, monitorar a resposta tumoral e intervir caso o tratamento seja ineficaz (Rigter *et al.*, 2013), além de permitir uma cirurgia mais conservadora devido à redução do tamanho tumoral (Mieog; Van Der Hage; Van De Velde, 2007).

Figura 01. Incidência e classificação molecular do câncer de mama com base na presença ou ausência de expressão de receptores hormonais, HER2 e pelo índice de proliferação celular Ki67.



SUBTIPOS MOLECULARES	%	RH	HER2	Ki67
LUMINAL A	50-60	+	-	BAIXO
LUMINAL B	10-20	+	-	ALTO
LUMINAL B HER2	10	+	+	ALTO
HER2	15-20	-	+	ALTO
TRIPLO NEGATIVO	10-15	-	-	ALTO

RH, Receptores Hormonais (estrogênio e/ou progesterona)

MELHOR PROGNÓSTICO ↑
↓ PIOR PROGNÓSTICO

Fonte: Autoria própria, baseada em Perou et al., 2000 e Eroles et al., 2012.

Apesar dos benefícios, um dos grandes desafios da quimioterapia é a resistência tumoral ao tratamento. Esta resistência pode ser intrínseca, por alterações que a paciente já apresenta, ou adquirida, pelo contato com a droga (Wein; Loi, 2017; Saatci; Huynh-Dam; Sahin, 2021). Os mecanismos envolvidos no processo de resistência são diversos e podem variar entre cada subtipo tumoral (An *et al.*, 2021; Wein; Loi, 2017; Saatci; Huynh-Dam; Sahin, 2021). Em geral, fatores como a atividade de enzimas metabolizadoras e a expressão aumentada de transportadores no sistema de efluxo de drogas podem causar piores respostas ao tratamento quimioterápico (An *et al.*, 2021).

2.2 Receptores de Tirosina Quinase

Os Receptores de Tirosina Quinase (do inglês *Receptor Tyrosine Kinases* - RTKs) são uma família de quinases ligadas à membrana das células, cuja estrutura é composta por um domínio extracelular de ligação e um domínio intracelular citoplasmático (Butti *et al.*, 2018; Ségaliny *et al.*, 2015). Em humanos, são conhecidos 58 RTKs, agrupados em 20 classes de acordo com sua topologia,

estando expressos em diversos tipos celulares (Lemmon, Schlessinger, 2010). A ligação de ligantes no RTK gera alterações conformacionais que desencadeiam a ativação de moléculas de sinalização intracelulares.

Entre as diversas vias de sinalização que são ativadas por RTKs estão a proteína quinase ativada por mitógeno (*mitogen-activated protein kinase* - MAPK), Janus quinase (JAK) / transdutor de sinal e ativador de transcrição (*signal transducer and activator of transcription* - STAT) e fosfoinosítídeo 3-quinase (*phosphoinositide 3-kinase* - PI3K) / proteína quinase B (*protein kinase B* - AKT) (BUTTI et al., 2018). Essas três vias, MAPK, JAK/STAT e PI3K/AKT participam de funções celulares como crescimento, sobrevivência, proliferação, divisão, metabolismo, apoptose e migração celular (Eroles et al., 2012). Um esquema de RTKs e vias de sinalização está expresso na Figura 02. A superexpressão de diversos tipos de RTKs está presente em diferentes tipos de câncer, incluindo o de mama, desempenhando papel importante na progressão do câncer (Butti et al., 2018). Nesse sentido, os níveis elevados de RTKs em tumores de mama estão associados à agressividade do câncer e à redução da sobrevida das pacientes (Templeton et al., 2014).

Devido a sua relação com o câncer, os RTKs têm sido candidatos para o desenvolvimento de terapias alvo e já possui inibidores aprovados para o tratamento do câncer de mama, como o lapatinibe, trastuzumabe e bevacizumabe (Butti et al., 2018). Contudo, apesar dos benefícios alcançados com uso de inibidores de RTK, células tumorais costumam desenvolver resistências ao tratamento, limitando o sucesso da terapia (Huang, Fu, 2015).

2.2.1 MAPK

A cascata de sinalização MAPK é ativada através de diversos fatores, incluindo os RTKs. A sequência de ativação da via inclui as quinases RAS, RAF, MEK e ERK, que por fim é translocada para o núcleo da célula, modulando processos de proliferação, diferenciação, migração e sobrevivência celular. Frequentemente, alterações na sinalização de MAPK estão envolvidas com o desenvolvimento do câncer (Dhillon et al., 2007). Componentes da família RAS, por exemplo, costumam estar entre os oncogenes mais mutados em neoplasias humanas (Johnson, Burkhart, Haigis, 2022). Ademais, a via de sinalização MAPK

também pode estar superativada em tumores, incluindo o câncer de mama, mesmo sem possuir alterações genômicas que afetem diretamente a via (Santen *et al.*, 2002).

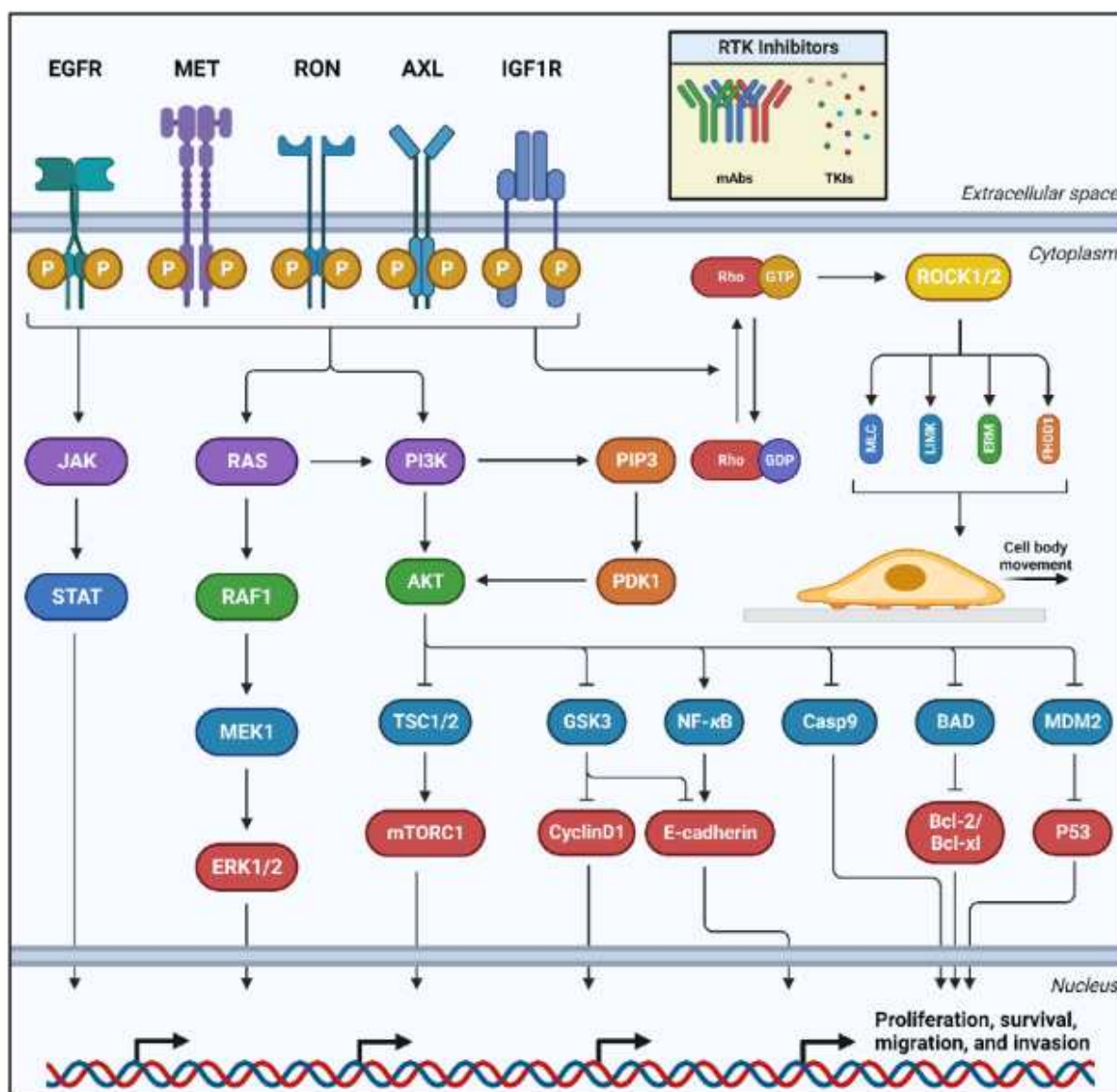
2.2.2 JAK/STAT

A ativação da via JAK se inicia com a ação dos receptores, incluindo os RTKs. Uma vez ativa, JAK desencadeia a formação de dímeros funcionais de STAT, os quais são translocados até o núcleo celular e participam da regulação da expressão gênica (Lu *et al.*, 2019). A família STAT possui diversos membros que atuam na regulação da proliferação, diferenciação, apoptose e resposta imune do organismo (Verhoeven *et al.*, 2020; Manore *et al.*, 2022). Devido ao seu importante papel regulatório, a função de STAT é frequentemente alterada em diversos tipos de câncer (Manore *et al.*, 2022). Entre os membros da família STAT, STAT3 é o mais estudado no câncer de mama, estando frequentemente superativado nas células tumorais e contribuindo para o crescimento e agressividade da doença (Chung *et al.*, 2014; Ma, Qin, Li 2020).

2.2.3 PI3K/AKT

A via PI3K/AKT recebe sinais de ativação através de receptores como os RTKs, e, uma vez ativa, recruta a proteína AKT, que, então, é ativada por mTOR e resulta no estímulo de sobrevivência e crescimento nas células (Lim, Mayer, Pawson, 2015). A família PI3K possui três classes, sendo a classe I a mais estudada e relacionada com transformação e crescimento tumoral (Engelman, Luo, Cantley, 2006; Engelman 2009). A sinalização de PI3K/AKT é superativada em cerca de 70% dos tumores mamários, e PTEN, um gene supressor tumoral regulador da via, está mutado em cerca de 40% dos casos (Hinz, Jücker, 2009).

Figura 02. Alguns dos Receptores de Tirosina Quinase e suas principais vias envolvidas na tumorigênese: JAK/STAT, MAPK (RAS/RAF/MEK/ERK) e PI3K/AKT.



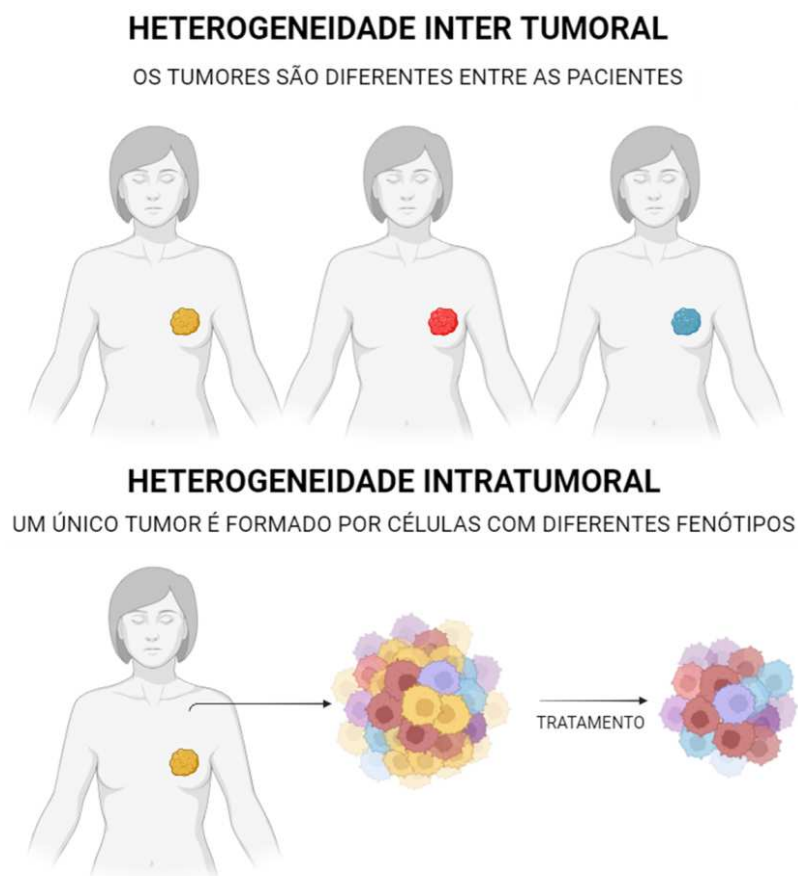
Fonte: Jaradat et al., 2024.

2.3 Heterogeneidade tumoral

Um fator comum ao câncer é a heterogeneidade, isto é, células tumorais exibem características distintas entre si, podendo ser inter ou intra tumoral (Figura 03). A heterogeneidade intertumoral implica que cada câncer de mama pode ser diferente em cada paciente, o que impede a adoção de uma abordagem terapêutica única para todos os casos. Nesse sentido, o desenvolvimento de terapias direcionadas e personalizadas para cada indivíduo vem se tornando cada vez mais

relevantes para a área oncológica (Zardavas *et al.*, 2015). Já a heterogeneidade intratumoral refere-se à variação existente entre as células de um mesmo tumor, em um único paciente. Mutações genéticas e/ou modificações epigenéticas são fontes de heterogeneidade intratumoral (Assidy, Caldas, Bruna, 2016).

Figura 03. Tipos de heterogeneidade.



Fonte: Autoria própria, baseada em Januškevičienė, Petrikaitė, 2019.

Assim, as alterações e flutuações dos componentes celulares e do microambiente tumoral geram variabilidade fenotípica para células únicas, o que não depende apenas da variedade genética (Cornwell *et al.*, 2016). Em vista disso, a geração contínua de heterogeneidade torna-se essencial para a adaptação das células cancerígenas às adversidades e à resposta ao tratamento (Lenz, 2024). Nesse sentido, a população celular que compõem o tumor pode apresentar características moleculares distintas, o que resulta em diferentes comportamentos frente a um estímulo. O tratamento quimioterápico, por exemplo, pode não ser

efetivo contra todo o tumor, resultando em uma subpopulação tumoral remanescente com perfil resistente (Swanton, Burrell, Futreal, 2011; Bergenfelz *et al.*, 2015). De fato, 90% das recorrências de câncer de mama são localizadas e se iniciam no estágio primário, indicando que a doença se desenvolve a partir de células cancerígenas residuais (Lu *et al.*, 2019). Além disso, no câncer de mama, a heterogeneidade reforça as diferentes características histológicas, moleculares e de sensibilidade, sendo um dos impedimentos para alcançar um diagnóstico e tratamento efetivos (Leary *et al.*, 2010; Almendro, Fuster, 2011).

Sendo assim, a investigação e compreensão da heterogeneidade tanto intra quanto inter tumorais são essenciais para atingir tratamentos personalizados e melhores prognósticos para as pacientes. Atualmente, uma das abordagens mais confiáveis para o estudo da heterogeneidade tumoral é a análise de células únicas (Navin *et al.*, 2011). A partir disso, a análise proteômica, genômica e metabolômica de perfis tumorais, especialmente em nível de células individuais, pode contribuir com o desenvolvimento e aplicação da medicina de precisão (Cai, Allam, Coskun, 2020).

2.4 Bioinformática

A bioinformática surgiu na década de 1980 trazendo novas abordagens para a análise e apresentação de dados biológicos (Lesk, 2008). Assim, a bioinformática tornou-se uma estratégia valiosa para a análise abrangente de grandes bancos de dados, os quais contêm diversas informações genéticas (Zeng *et al.*, 2021). Dentre as metodologias oferecidas pela bioinformática, a análise de sequenciamento de células únicas (*Single cell sequencing*) permite adquirir genomas, transcriptomas e epigenomas de células individuais. Essa abordagem vem possibilitando a re-investigação de grandes questionamentos da biologia do câncer, como metástase, heterogeneidade e evolução (Huang *et al.*, 2018). De acordo com Yuan (2019), a tecnologia do sequenciamento de células únicas contribuiu fortemente para os estudos de heterogeneidade tumoral, possibilitando identificar os diversos tipos celulares que compõem o tumor, as transições entre os estágios da doença e as interações célula-célula (Yuan *et al.*, 2019).

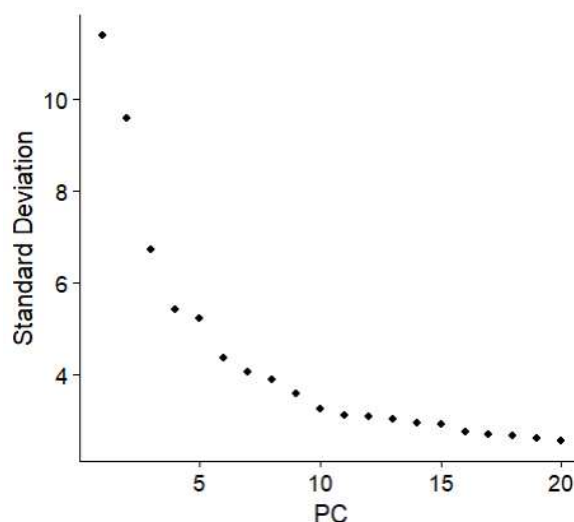
2.4.1 Banco de dados

O *Gene Expression Omnibus* (GEO) é um repositório público de dados genômicos funcionais. O banco de dados escolhido foi o GSE161529, disponibilizado em 2021 (Pal *et al.*, 2021). O banco de dados conta com o sequenciamento de RNA de células únicas de 52 pacientes, totalizando 421.761 células, abrangendo amostras normais de tecido mamário, tecido mamário com mutação de *BRCA1* e os principais subtipos de câncer de mama. No total, o banco inclui o perfil de 4 tumores triplo negativos, 4 tumores triplo negativos com mutação *BRCA1*, 6 tumores HER2 positivos, 16 tumores com expressão positiva de receptores de estrogênio, dos quais 7 também apresentam dados de linfonodos acometidos pelas células tumorais e 13 pacientes normais sem câncer de mama. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>, GSE161529).

2.4.2 Análise de sequenciamento de RNA de células únicas

A análise de sequenciamento de RNA de células únicas (do inglês *single-cell RNA sequencing* - scRNA-seq) é comumente realizada através do pacote “Seurat” do programa R, o qual permite a identificação e interpretação de heterogeneidade de células únicas (Butler *et al.*, 2018). Para garantir a qualidade dos dados, as células são filtradas com base na contagem de genes e percentual de genes mitocondriais adequados (Chen *et al.*, 2022a). Também é realizada a normalização da matriz de expressão de todas as células com o método “LogNormalize” e, para reduzir as dimensões dos dados, é conduzida uma análise de componentes principais (PCA) (Figura 04). Através da análise de um gráfico de cotovelo é possível selecionar os componentes principais (CPs), garantindo a redução da dimensionalidade dos dados, o foco nas variações significativas e a redução do ruído (Slovin *et al.*, 2021). A partir dos dados selecionados pode ser feita a clusterização das células com base em seus genes marcadores (Slovin *et al.*, 2021).

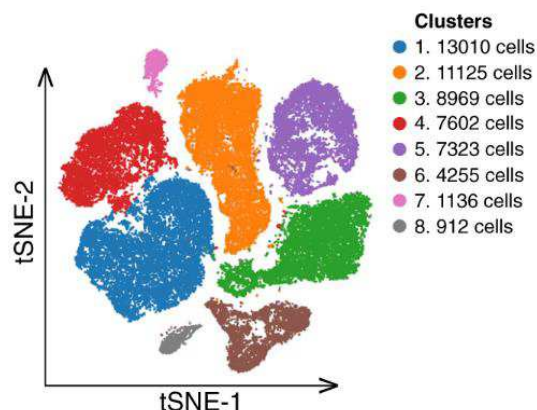
Figura 04. Exemplo de um gráfico de cotovelo obtido através da análise de componentes principais (PCA). Os primeiros componentes principais (PCs) capturam a maior quantidade de variância, enquanto os PCs subsequentes capturam variações menores.



Fonte: Autoria própria, obtido durante a análise de dados deste trabalho.

Funções inclusas no pacote Seurat permitem a identificação de agrupamentos (clusters) de células que possuem perfis de expressão gênica similares (Slovin *et al.*, 2021). Para a visualização dos padrões, é realizada a técnica de redução de dimensionalidade através do t-SNE (do inglês, t-distributed stochastic neighbour embedding), a qual mapeia o conjunto de dados em duas dimensões (Kobak, Berens, 2019). Sendo assim, cada célula corresponde a um ponto no gráfico de t-SNE, e a distância entre elas reflete seu nível de similaridade em relação a expressão gênica (Figura 05). Dessa forma, é possível visualizar a distribuição dos dados em formatos de clusters (Linderman, 2021). Para a caracterização dos clusters, os genes diferencialmente expressos (DEGs) são identificados utilizando o teste estatístico de Wilcox (Chen *et al.*, 2022a).

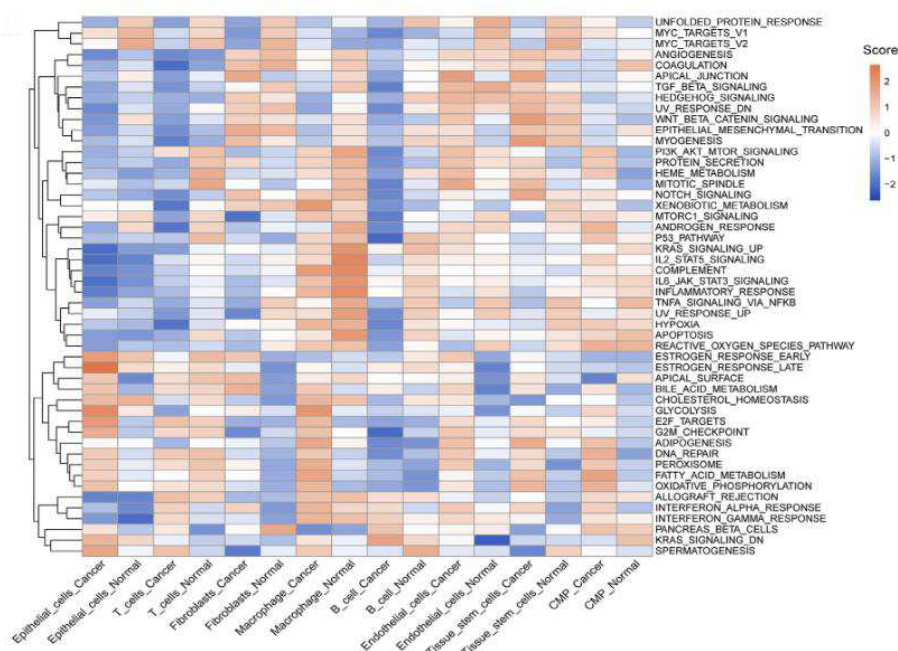
Figura 05. Exemplo de um gráfico tSNE com a distribuição de clusters de acordo com a similaridade dos dados. Cada ponto no gráfico representa uma célula.



Fonte: Pal et al., 2021

A visualização da heterogeneidade tumoral a partir dos dados de sequenciamento de células únicas de tumores pode ser realizada através de um heatmap (Figura 06). Esse tipo de gráfico reúne os níveis de expressão de genes de interesse nas amostras analisadas com base em uma escala de cor (Calura; Martini., 2021). Portanto, é possível avaliar e comparar a expressão gênica de diferentes amostras e condições.

Figura 06. Exemplo de um heatmap, demonstrando o nível de expressão de funções biológicas (linhas) em diferentes tipos celulares (colunas).



Fonte: Chen et al., 2022a.

3. METODOLOGIA

3.1 Coleta de dados

Os dados analisados estão disponíveis no banco GSE161529, o qual está depositado no repositório *Gene Expression Omnibus* (GEO). O banco conta com dados de sequenciamento de RNA mensageiro de células únicas de pacientes com diferentes subtipos de câncer de mama e tecido mamário saudável. Além disso, Chen e colaboradores (2022b) disponibilizaram arquivos derivados do mesmo banco de dados já processados, normalizados e agrupados de acordo com as características celulares e o subtipo tumoral. O câncer de mama se origina de células epiteliais na mama (Ding *et al.*, 2019). Sendo assim, visando especificar a análise para esse grupo celular e evitar variações que ocorrem em outros componentes do microambiente tumoral, apenas o RNA mensageiro de células epiteliais tumorais foram selecionados para as análises. Os arquivos contendo os dados de células epiteliais tumorais e saudáveis foram baixados e analisados através do programa RStudio versão 2024.12.0+467.

3.2 Análise da heterogeneidade intratumoral

A partir dos dados de células epiteliais tumorais e saudáveis, foi realizada a análise da expressão de genes de vias de sinalização ativadas por RTKs. Tendo em vista os dados disponíveis no banco e os genes mais relevantes no contexto das vias de sinalização, foram definidos quinze genes específicos para o seguimento da análise: *KRAS*, *HRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *MAP2K1*, *MAP2K2*, *MAPK3*, *MAPK1*, *JAK1*, *STAT3*, *MTOR*, *PTEN*, *PIK3CA*, *AKT1* e *AKT2*. A expressão de cada um desses em cada célula tumoral das pacientes está ilustrada em um gráfico, demonstrando os diferentes fenótipos celulares presentes dentro do mesmo tumor, isto é, a heterogeneidade intratumoral. A expressão média de cada gene foi calculada considerando todas as células epiteliais de cada paciente.

3.3 Heterogeneidade entre subtipos de câncer de mama

Para verificar a heterogeneidade inter tumoral, os dados de expressão dos genes selecionados das pacientes serão comparados entre si. Atentando para os diferentes subtipos moleculares do câncer de mama e seus impactos no prognóstico da doença, os dados de expressão média de todas as pacientes de cada subtipo foram agrupados entre si. A partir disso, as variações de expressão de genes entre os subtipos tumorais foram comparadas.

3.4 Comparação de amostras tumorais com controle saudável

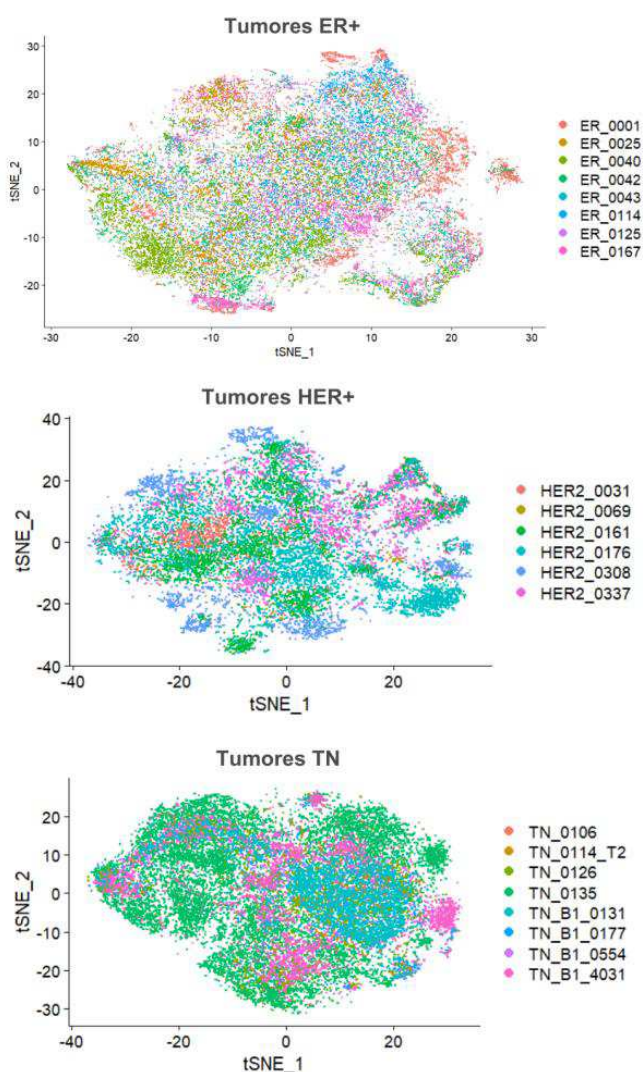
A fim de verificar e comparar as expressões gênicas de cada subtipo tumoral com tecido mamário normal, oito amostras celulares saudáveis foram incluídas na análise. A média de expressão de cada gene para cada subtipo específico foi calculada a partir dos valores individuais de expressão de cada paciente de um mesmo subtipo. O mesmo processo foi realizado com amostras controle, gerando um valor médio de expressão a partir de dados de mulheres saudáveis. A expressão média de cada gene entre os subtipos tumorais e o controle foi comparada estatisticamente através do teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para múltiplas comparações. Foram considerados valores de $p < 0,05$ como estatisticamente significativos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,002$; *** $p < 0,0002$; **** $p < 0,0001$).

4. RESULTADOS

4.1 Seleção dos dados de células tumorais

A seleção foi previamente realizada por Chen e colaboradores (2022b), que disponibilizaram arquivos específicos contendo apenas células epiteliais tumorais de cada subtipo de câncer de mama. Além disso, para cada subtipo de câncer de mama, foram incluídas de seis a oito amostras tumorais derivadas de diferentes pacientes. Os gráficos de tSNE demonstrando as células epiteliais tumorais e as respectivas pacientes incluídas no estudo estão demonstrados na Figura 07.

Figura 07. Gráficos de tSNE indicando os dados incluídos na avaliação. Cada ponto no gráfico representa uma célula epitelial tumoral de uma respectiva paciente (indicadas por cores).



Fonte: autoria própria com base na análise dos dados disponíveis no banco GSE161529.

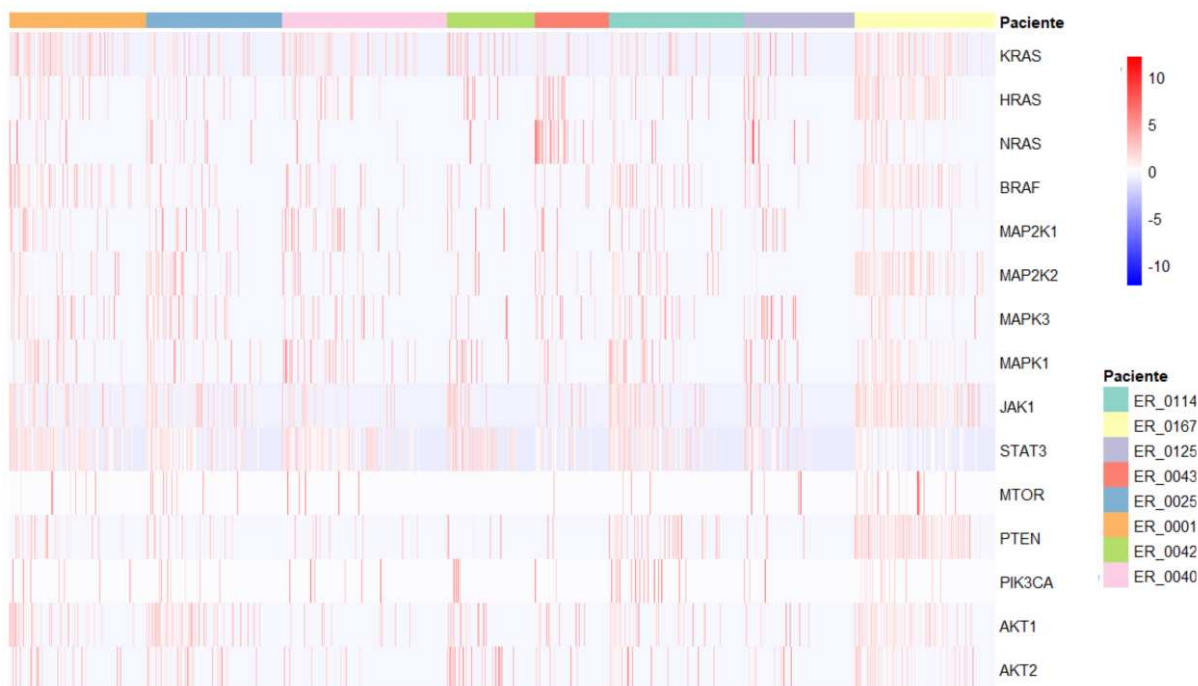
4.2 Avaliação da heterogeneidade intratumoral

Após acessar os dados de expressão de RNA mensageiro de células únicas, as pacientes foram categorizadas de acordo com o diagnóstico do subtipo molecular do tumor. Assim, pacientes com iniciais ER representam pacientes com subtipo Luminal com expressão de receptores de estrogênio; pacientes com iniciais HER indicam as pacientes com tumores positivos para expressão de HER2 e iniciais TN referem-se a pacientes com tumores triplo negativos.

Foram avaliadas oito pacientes do subtipo luminal com ER+: ER0001, ER0025, ER0040, ER0042, ER0043, ER0114, ER0125 e ER0167 (Figura 08). Em todas as amostras, observou-se a presença de células com expressão ausente, isto é, níveis de expressão zero para os genes avaliados. Entre as células com expressão positiva, os níveis variaram amplamente, desde valores próximos de zero até níveis mais elevados. Notavelmente, em todos os genes analisados, um pequeno subgrupo de células apresentou expressão consideravelmente superior ao restante da população, sugerindo a existência de subpopulações celulares com perfis de expressão gênica distintos dentro do mesmo tumor. Como consequência dessa distribuição assimétrica, a média de expressão de cada gene permaneceu baixa, refletindo a predominância de células com valores reduzidos ou ausentes. No entanto, a presença de células com alta expressão sugere que a média isoladamente pode não refletir adequadamente a complexidade e a heterogeneidade da população celular tumoral, uma vez que não evidencia a existência de pequenos subgrupos celulares com níveis de expressão elevados.

Dentre os genes avaliados, *STAT3* e *JAK1* demonstraram níveis de expressão consistentemente mais elevados em todas as pacientes, enquanto *MTOR* apresentou os menores valores. Os demais genes não demonstram um padrão uniforme de expressão, variando entre as pacientes. Em geral, é possível notar que a paciente ER0167 exibiu os níveis de expressão gênica mais altos, enquanto a paciente ER0125 apresentou os mais baixos. A heterogeneidade, portanto, é representada pelas variações presentes não apenas dentro de um mesmo tumor, mas também entre as diferentes pacientes. Juntos, esses dados indicam a presença de grupos celulares com diferentes níveis de expressão gênica dentro do mesmo tumor, o que contribui para a heterogeneidade intratumoral e pode impactar nos desfechos celulares dessa população.

Figura 08. Heatmap com a distribuição dos níveis de expressão gênica em células tumorais de pacientes com câncer de mama do subtipo ER+ (colunas indicadas pelas cores) em relação aos genes relacionados às vias de sinalização (linhas). Tons avermelhados indicam alta expressão e tons azulados baixa expressão. Cada traço representa uma célula individual.

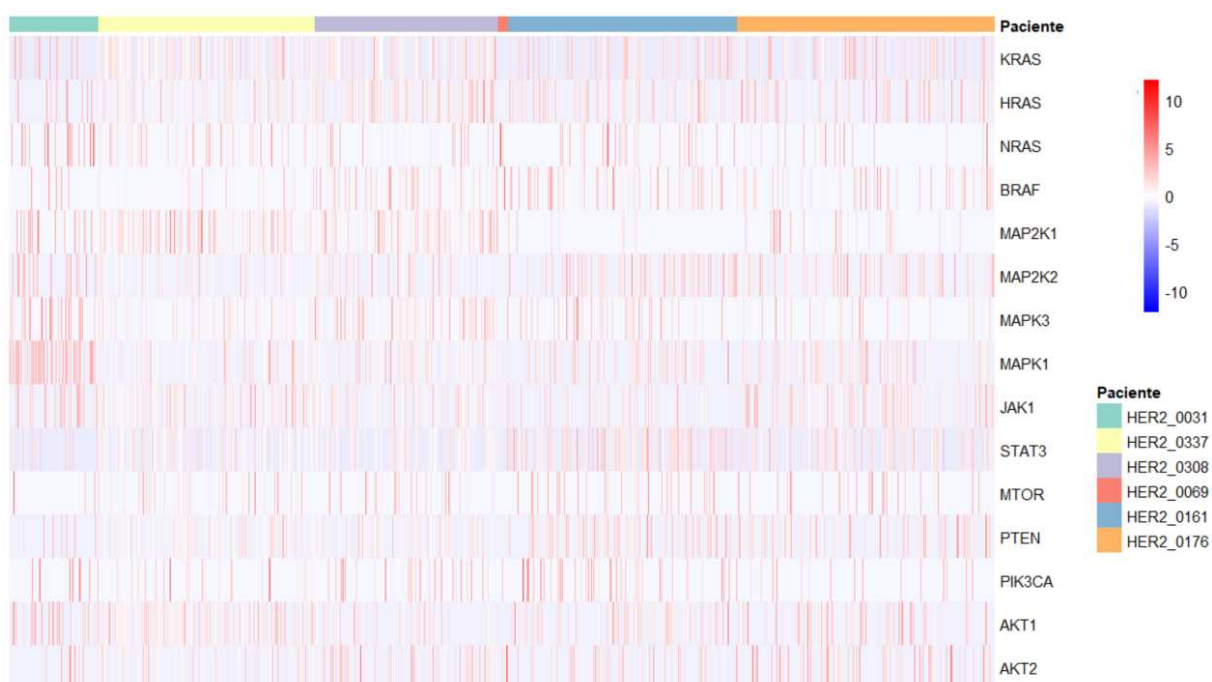


A análise dos tumores com expressão positiva para HER2 incluiu amostras de seis pacientes: HER0031, HER0069, HER0161, HER0176, HER0308 e HER0337 (Figura 09). De maneira semelhante ao observado nas amostras de tumores luminais ER+, a expressão gênica nos tumores HER2+ apresentou um padrão caracterizado pela presença de muitas células com níveis de expressão nulos ou próximos de zero para os genes avaliados. Entretanto, dentro de cada amostra, é possível identificar subpopulações de células com níveis elevados de expressão, evidenciando a heterogeneidade intratumoral. Essa distribuição heterogênea sugere que, dentro do mesmo tumor, diferentes grupos celulares podem apresentar perfis de sinalização distintos.

Observa-se, ainda, uma variabilidade nos níveis de expressão média dos genes avaliados, com diferenças notáveis entre as pacientes, porém sem um padrão consistente em todas as amostras. Genes como *MAPK1* e *STAT3*, por exemplo, destacam-se nas pacientes HER0031 e HER0161, respectivamente, mas não apresentam o mesmo comportamento para o restante das pacientes. Por outro lado, as pacientes HER0308 e HER0337 demonstraram um perfil de expressão mais

homogêneo, com menores variações entre os genes. Essa variabilidade entre as amostras sugere que tumores HER2+ não compartilham um perfil de expressão padronizado, possuindo características moleculares distintas em relação aos genes avaliados.

Figura 09. Heatmap com a distribuição dos níveis de expressão gênica em células tumorais de pacientes com câncer de mama do subtipo HER2+ (colunas indicadas pelas cores) em relação aos genes relacionados às vias de sinalização (linhas). Tons avermelhados indicam alta expressão e tons azulados baixa expressão. Cada traço representa uma célula individual.

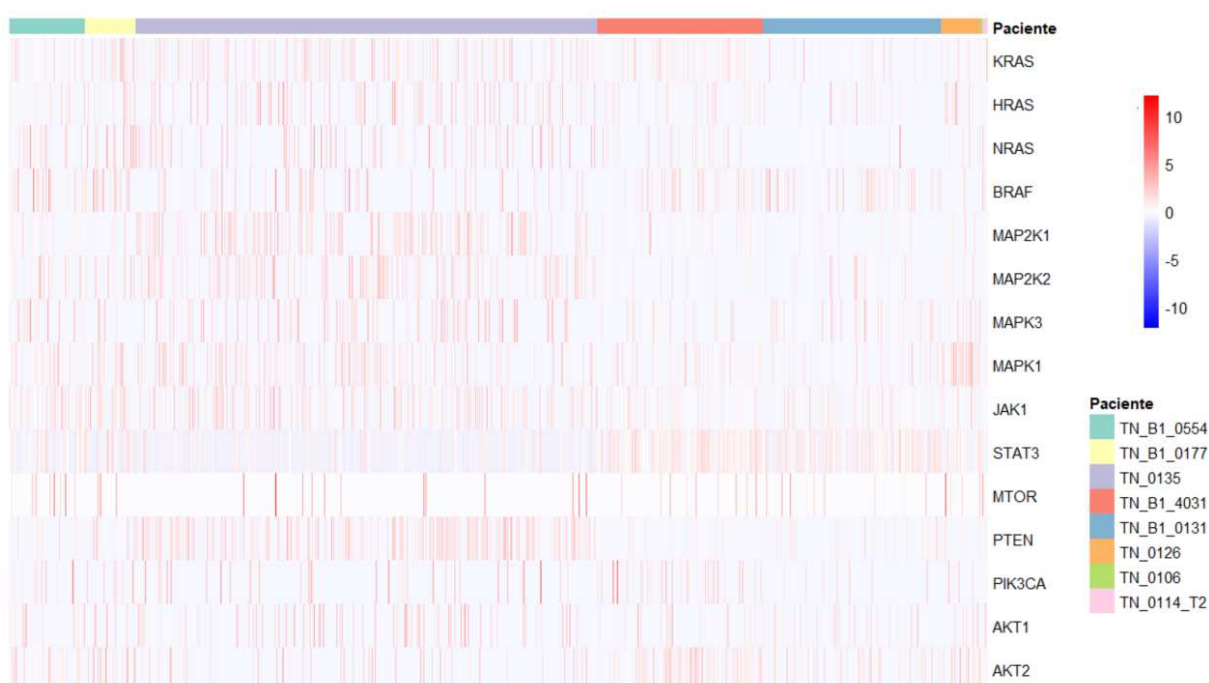


Por fim, os tumores triplo-negativos (TN) analisados incluem oito pacientes: TN0106, TN0114, TN0126, TN0177, TN0131, TN0135, TN0554 e TN4031 (Figura 10). Consistente com o que foi observado em tumores ER+ e HER2+, as amostras dos tumores triplo negativos apresentam uma alta heterogeneidade na expressão dos genes analisados. Grande parte das células em todas as amostras apresenta ausência ou níveis muito baixos de expressão para os genes avaliados, tornando a média de expressão baixa. Todavia, observa-se que algumas células individuais demonstram níveis elevados de expressão gênica, destoando da média, o que reforça a variabilidade intratumoral dentro desse grupo de amostras.

Enquanto o gene *STAT3* apresentou níveis elevados de expressão, *MTOR* exibiu uma expressão média baixa, ambos consistentes em todas as amostras. O restante

dos genes demonstrou valores variados entre as pacientes, sem padrão definido, refletindo os perfis únicos de cada tumor. No geral, esses resultados indicam que os tumores triplo-negativos possuem um padrão de expressão altamente variável para os genes analisados, sem grandes semelhanças entre as diferentes pacientes. Essa heterogeneidade pode refletir diferenças na biologia tumoral entre os casos e sugere que esses genes podem desempenhar papéis distintos de acordo com o contexto do tumor.

Figura 10. Heatmap com os níveis de expressão gênica em células tumorais de pacientes com câncer de mama do subtipo triplo negativo (colunas indicadas pelas cores) em relação aos genes relacionados às vias de sinalização (linhas). Tons avermelhados indicam alta expressão e tons azulados baixa expressão. Cada traço representa uma célula individual.



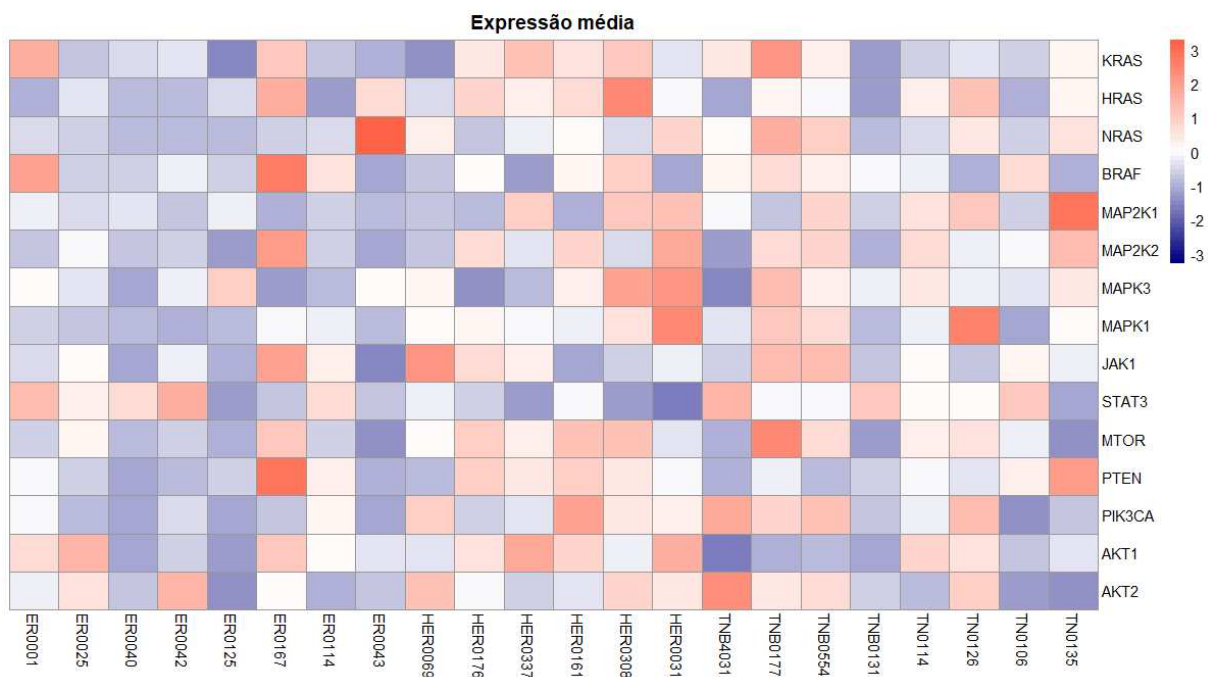
A análise comparativa dos perfis de expressão gênica nos tumores dos subtipos ER+, HER2+ e triplo-negativos revelou uma heterogeneidade intratumoral expressiva em todos os grupos. Em cada subtipo, a maioria das células apresentou níveis baixos ou nulos de expressão dos genes avaliados, enquanto subpopulações de células demonstraram níveis mais elevados. Esse padrão, observado independentemente do subtipo, evidencia que a média aritmética dos níveis de expressão pode mascarar a complexidade dos perfis celulares, uma vez que não reflete a existência de células com comportamentos atípicos ou com maior atividade

transcricional. Em síntese, os dados demonstram que a heterogeneidade intratumoral é uma característica comum a todos os subtipos analisados, refletindo não apenas variações entre diferentes pacientes, mas também diferenças na expressão gênica entre células dentro do mesmo tumor.

4.3 Avaliação da heterogeneidade entre subtipos tumorais

A fim de observar e encontrar padrões gênicos nos diferentes subtipos de câncer de mama, a atividade média dos genes de interesse de todas as pacientes foi avaliada em conjunto (Figura 11). O resultado revela um padrão heterogêneo de expressão gênica entre os diferentes subtipos tumorais, porém sem particularidades específicas. Em geral, tumores HER2+ e triplo negativos tendem a apresentar mais genes com alta expressão, representados pela região mais avermelhada do heatmap, em comparação com tumores ER+.

Figura 11. Heatmap representando a expressão média de genes associados às vias de sinalização MAPK/ERK, JAK/STAT e PI3K/AKT/mTOR em amostras de diferentes pacientes. Cada linha corresponde a um gene e cada coluna a uma amostra de paciente, sendo os subtipos tumorais representados pelos prefixos: "ER" para tumores luminiais, "HER" para tumores HER2 positivos e "TN" para tumores triplo-negativos. A escala de cores varia de azul (baixa expressão) a vermelho (alta expressão).

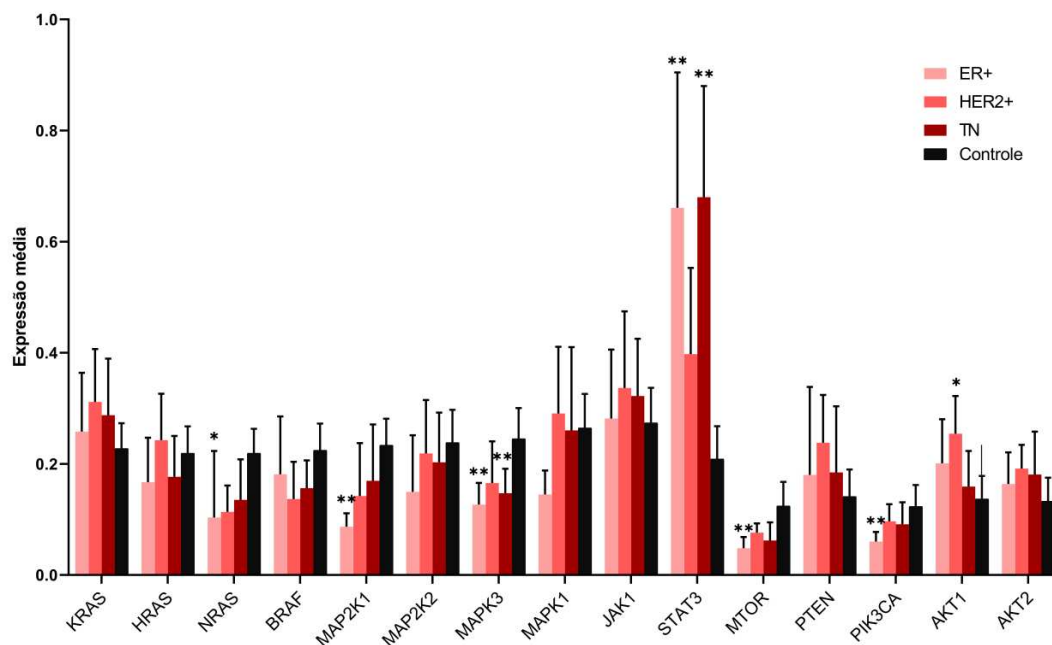


Ademais, é notável que pacientes pertencentes ao mesmo subtipo podem exibir perfis de expressão drasticamente distintos, como pode ser observado entre as pacientes ER0125 e ER0167 e TN4031 e TN0177. Esse resultado sugere que a classificação molecular do tumor, embora seja essencial para o diagnóstico e tratamento, não captura toda a complexidade biológica da doença, evidenciando a grande diversidade e heterogeneidade tumoral em relação aos genes avaliados.

4.4 Comparação de amostras tumorais com controle saudável

Os resultados da análise da média de expressão revelam diferenças significativas entre os grupos tumorais e de controle saudável avaliados (Figura 12). Para os genes *NRAS*, *MAP2K1*, *MTOR* e *PIK3CA*, a expressão média nas células saudáveis foi superior à observada nos tumores do subtipo ER+ ($p = 0,0072$; $p = 0,0042$; $p = 0,005$; $p = 0,0069$, respectivamente). Além disso, o gene *MAPK3* apresentou maior expressão no controle saudável tanto em comparação aos tumores ER+ ($p = 0,0025$) quanto aos tumores triplo negativos ($p = 0,031$). Por outro lado, células tumorais dos subtipos ER+ e triplo negativo exibiram níveis de expressão significativamente mais elevados de *STAT3* ($p = 0,0016$; $p = 0,0013$, respectivamente). Já o subtipo HER2+ demonstrou maior expressão em relação ao controle apenas para o gene *AKT1* ($p = 0,0366$).

Figura 12. Comparação da média de expressão gênica entre tumores de mama e células saudáveis. O valor de expressão média de cada tumor foi obtido através das amostras avaliadas durante o estudo, sendo oito tumores para ER+, seis tumores HER2+ e oito tumores triplo negativos (TN). O controle saudável foi obtido através de amostras de oito indivíduos saudáveis. Todas as comparações estatísticas foram realizadas com o controle utilizando o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para múltiplas comparações. Foram considerados valores de $p < 0,05$ como estatisticamente significativos.



Esses achados reforçam que, como células saudáveis também apresentam atividades de sinalização relacionadas aos genes avaliados, é esperado que possuam níveis de expressão consideráveis. Entretanto, genes que apresentam expressão aumentada nos tumores podem estar associados a funções mais relevantes no contexto tumoral, sugerindo um papel potencialmente mais ativo na progressão da doença.

5. DISCUSSÃO

A capacidade de uma célula de alterar seu comportamento do restante da população gera a heterogeneidade intratumoral (Barzgar Barough *et al.*, 2021). Dessa forma, a expressão gênica variada dentro de um mesmo tumor, isto é, subpopulações celulares com comportamentos distintos entre si, reflete a heterogeneidade intratumoral presente nas pacientes. Além disso, as variações tumorais observadas entre diferentes pacientes com câncer de mama caracterizam a heterogeneidade intertumoral, a qual está associada com diferentes subtipos histológicos, resposta ao tratamento e desfechos clínicos (Fumagalli, Barberis, 2021). A heterogeneidade pode surgir a partir de alterações a nível de genoma, epigenoma, transcriptoma e proteoma, sendo refletida em diversos aspectos tumorais como biomarcadores, metabolismo, ciclo celular e microambiente (Guo *et al.*, 2023). Nesse sentido, o sequenciamento de células únicas torna-se uma ferramenta poderosa para explorar, mensurar e compreender a heterogeneidade tumoral (Guo *et al.*, 2023).

A avaliação da heterogeneidade de genes relacionados a vias de sinalização ativadas por RTKs em câncer de mama fornece diversos conceitos relevantes para a compreensão da complexidade tumoral. Os dados apresentados neste trabalho demonstram a existência da heterogeneidade intratumoral em diferentes níveis para todos os tumores de mama analisados (Figuras 08, 09 e 10). Os resultados de todos os genes avaliados revelam grande distribuição nos níveis de expressão gênica, variando desde células com expressão ausente até células individuais com valores elevados. Sendo assim, a população tumoral possui plasticidade epigenética, constituindo-se de múltiplos estados celulares que coexistem, o que permite mudanças reversíveis e dinâmicas que contribuem para a heterogeneidade intratumoral (Naffar-Abu Amara *et al.*, 2020; Ivanov, Lashin, 2023).

A heterogeneidade intertumoral, por sua vez, representa as variações existentes entre diferentes pacientes e seus respectivos tumores. Portanto, pacientes com tumores mamários do mesmo subtipo molecular e recebendo o mesmo tratamento podem apresentar respostas clínicas diferentes (EBCTCG *et al.*, 2011). Aqui, pode-se observar a diversidade gênica entre os tumores, tanto entre paciente do mesmo subtipo tumoral quanto em subtipos diferentes (Figura 11). Para os tumores com expressão positiva de receptores de estrogênio (ER+), foi possível

notar mais homogeneidade na expressão dos genes de interesse, enquanto tumores HER2+ e triplo-negativos apresentaram níveis mais variados (Figura 11). Na prática clínica, tumores ER+ representam o grupo mais bem sucedido em relação a previsão de comportamento biológicos e respostas terapêuticas, sendo HER2+ e triplo negativos os mais agressivos (Zhang, 2023). Ademais, estudos indicam que a heterogeneidade presente em tumores triplo negativos consiste em um fator determinante para a doença, sugerindo que pacientes precisam ser analisadas individualmente (Koren, Bentires, 2015; Shah *et al.*, 2012).

Por fim, a expressão média dos genes de interesse dos subtipos tumorais em comparação com amostras de pacientes saudáveis também contribui para a compreensão do comportamento celular (Figura 12). De maneira geral, os genes *KRAS*, *HRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *MAP2K1*, *MAP2K2*, *MAPK3* e *MAPK1*, que constituem a via de sinalização de RAS/RAF/MEK/ERK, estão significativamente mais ativos ou com expressão média muito similar aos subtipos tumorais de câncer de mama. O gene *MAPK3*, o qual corresponde a proteína ERK1, possui maior expressão na amostra controle tanto em relação ao subtipo tumoral ER+ quanto triplo negativo. De fato, MAPKs correspondem às proteínas efetoras dessa via de sinalização, isto é, são as proteínas responsáveis pela associação com fatores de transcrição que promovem a manutenção de diversas funções celulares (Martin-Vega, Cobb, 2023). Sendo assim, é esperado que células saudáveis apresentem expressão de MAPKs. Em células tumorais, por outro lado, a ativação da via de MAPKs está mais relacionada com tumores que apresentam receptores de fatores de crescimento, como HER2, o que também foi observado neste trabalho (Figura 12) (Von Lintig *et al.*, 2000).

A via de sinalização JAK/STAT demonstrou expressão significativamente mais alta em tumores do subtipo ER+ e triplo negativos em comparação ao controle saudável (Figura 12). Em condições normais, a ativação de *STAT3* é controlada por diversos inibidores intrínsecos, e seu papel no tecido mamário está relacionado com a involução da glândula mamária (Qin *et al.*, 2019; Watson, 2001). No câncer de mama, *STAT3* atua como um ativador transcricional, regulando diversos alvos oncogênicos e afetando a progressão, proliferação, apoptose, metástase e resistência da doença (Ma, Qin, Li, 2020). A alta expressão de *STAT3* em todos os subtipos tumorais de câncer de mama está relacionada com resistência ao tratamento e pior prognóstico (Manore *et al.*, 2022). Ademais, tratamentos baseados

em inibidores de *STAT3* têm demonstrado eficácia no controle de crescimento e metástases de tumores triplo negativos (Qin *et al.*, 2019).

Por fim, genes relacionados a via PI3K/AKT/MTOR apresentaram diferenças significativas em relação ao controle. Em tumores ER+, os genes *MTOR* e *PIK3CA* demonstram expressão média inferior às células saudáveis. Contudo, de maneira similar à via de sinalização de MAPKs, a via de PI3K/AKT/MTOR também possui papel fundamental na manutenção e controle de processos celulares como crescimento, metabolismo e autofagia (Asati, Mahapatra, Bharti, 2016; Popova, Jücker, 2021). Entretanto, o gene *AKT1* demonstrou maior expressão média em tumores HER2+ em comparação ao controle. Dados apontam que a expressão de HER2+ presente em tumores de mama resulta na ativação da via de sinalização AKT, que por sua vez atua no estímulo de proliferação e sobrevivência nas células tumorais (Tokunaga *et al.*, 2006). Ademais, a relação entre a expressão de HER2 e AKT revela um potencial uso de *AKT1* como fator prognóstico especificamente para pacientes com tumores de mama do subtipo HER2+ (Kim *et al.*, 2022).

Os resultados obtidos neste trabalho revelam aspectos da heterogeneidade intra e intertumoral do câncer de mama através da avaliação de genes relacionados a vias de sinalização ativadas por RTKs. Contudo, devido às limitações bioinformáticas e o número reduzido de pacientes analisadas, mais estudos são necessários para validar e aprofundar os resultados.

6. CONCLUSÃO

Este estudo destaca a complexidade da heterogeneidade intra e intertumoral no câncer de mama por meio da análise de genes envolvidos em vias de sinalização ativadas por RTKs. Os resultados evidenciam a diversidade de perfis de expressão gênica entre subtipos tumorais e entre pacientes, refletindo variações na biologia tumoral. Apesar das limitações, esses achados reforçam a importância do sequenciamento de células únicas para um entendimento mais detalhado da heterogeneidade tumoral, permitindo avanços no desenvolvimento de terapias personalizadas e prognósticos mais precisos para pacientes com câncer de mama. Além disso, a identificação de assinaturas moleculares específicas pode ser explorada em testes clínicos para a seleção de biomarcadores preditivos de resposta terapêutica, viabilizando a personalização do tratamento com maior eficácia. Dessa forma, o uso de tecnologias avançadas, como o sequenciamento de células únicas, possibilita não apenas a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes ao câncer, mas também a aplicação desses conhecimentos na prática clínica, favorecendo estratégias terapêuticas mais direcionadas e eficazes. Assim, a ampliação dessas investigações poderá contribuir significativamente para a otimização das abordagens terapêuticas e para uma melhor resposta ao tratamento do câncer de mama.

REFERÊNCIAS

ALMENDRO, V.; FUSTER, G. Heterogeneity of breast cancer: etiology and clinical relevance. **Clinical & translational oncology: official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico**, v. 13, n. 11, p. 767–773, 2011.

AN, Junsha et al. New advances in the research of resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 17, p. 9644, 2021.

ASATI, V.; MAHAPATRA, D. K.; BHARTI, S. K. PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: Structural and pharmacological perspectives. **European journal of medicinal chemistry**, v. 109, p. 314–341, 2016.

BARZGAR BAROUGH, N. et al. Understanding breast cancer heterogeneity through non-genetic heterogeneity. **Breast cancer** (Tokyo, Japan), v. 28, n. 4, p. 777–791, 2021.

BAUER, K. R. et al. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: A population-based study from the California cancer Registry. **Cancer**, v. 109, n. 9, p. 1721–1728, 2007.

BERGENFELZ, C. et al. Systemic monocytic-MDSCs are generated from monocytes and correlate with disease progression in breast cancer patients. **PloS one**, v. 10, n. 5, p. e0127028, 2015.

BUTLER, A. et al. Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. **Nature biotechnology**, v. 36, n. 5, p. 411–420, 2018.

BUTTI, R. et al. Receptor tyrosine kinases (RTKs) in breast cancer: signaling, therapeutic implications and challenges. **Molecular cancer**, v. 17, n. 1, 2018.

CAI, S.; ALLAM, M.; COSKUN, A. F. Multiplex spatial bioimaging for combination therapy design. **Trends in cancer**, v. 6, n. 10, p. 813–818, 2020.

CALURA, E.; MARTINI, P. Summarizing RNA-seq data of differentially expressed genes using gene set, network, or pathway analysis. Em: **Methods in Molecular Biology**. New York, NY: Springer US, 2021. p. 147–179.

CASSIDY, J. W.; CALDAS, C.; BRUNA, A. Maintaining tumor heterogeneity in patient-derived tumor xenografts. **Cancer research**, v. 75, n. 15, p. 2963–2968, 2015.

CHEN, H. et al. Identification of differentially expressed genes at the single-cell level and prognosis prediction through bulk RNA sequencing data in breast cancer. **Frontiers in genetics**, v. 13, 2022a.

CHEN, Y.; SMYTH, G. **Data, R code and output Seurat Objects for single cell RNA-seq analysis of human breast tissues**. figshare, 3 fev. 2022b.

CHUNG, S. S. et al. STAT3 activation in HER2-overexpressing breast cancer promotes epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell traits. **International journal of oncology**, v. 44, n. 2, p. 403–411, 2014.

CHUNG, W. et al. Single-cell RNA-seq enables comprehensive tumour and immune cell profiling in primary breast cancer. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 15081, 2017.

CLUSAN, L. et al. A basic review on estrogen receptor signaling pathways in breast cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 7, p. 6834, 2023.

CORNWELL, J. A. et al. Quantifying intrinsic and extrinsic control of single-cell fates in cancer and stem/progenitor cell pedigrees with competing risks analysis. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, 2016.

DHILLON, A. S. et al. MAP kinase signalling pathways in cancer. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3279–3290, 2007.

DING, L. et al. Deletion of Cdkn1b in ACI rats leads to increased proliferation and pregnancy-associated changes in the mammary gland due to perturbed systemic endocrine environment. **PLoS genetics**, v. 15, n. 3, p. e1008002, 2019.

EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP (EBCTCG) et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. **Lancet**, v. 378, n. 9793, p. 771–784, 2011.

ENGELMAN, J. A. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nature reviews*. **Cancer**, v. 9, n. 8, p. 550–562, 2009.

ENGELMAN, J. A.; LUO, J.; CANTLEY, L. C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. **Nature reviews**. *Genetics*, v. 7, n. 8, p. 606–619, 2006.

EROLE, P. et al. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. **Cancer treatment reviews**, v. 38, n. 6, p. 698–707, 2012.

FENG, Y. et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. **Genes & diseases**, v. 5, n. 2, p. 77–106, 2018.

FUJII, Takeo *et al.* Effectiveness of an adjuvant chemotherapy regimen for early-stage breast cancer: A systematic review and network meta-analysis: A systematic review and network meta-analysis. **JAMA oncology**, v. 1, n. 9, p. 1311–1318, 2015.

FUMAGALLI, C.; BARBERIS, M. Breast cancer heterogeneity. **Diagnostics** (Basel, Switzerland), v. 11, n. 9, p. 1555, 2021.

GUERRERO-ZOTANO, A.; MAYER, I. A.; ARTEAGA, C. L. PI3K/AKT/mTOR: role in breast cancer progression, drug resistance, and treatment. **Cancer metastasis reviews**, v. 35, n. 4, p. 515–524, 2016.

GUO, L. et al. Breast cancer heterogeneity and its implication in personalized precision therapy. **Experimental hematology & oncology**, v. 12, n. 1, p. 3, 2023.

HINZ, N.; JÜCKER, M. Distinct functions of AKT isoforms in breast cancer: a comprehensive review. **Cell communication and signaling: CCS**, v. 17, n. 1, 2019.

HUANG, L.; FU, L. Mechanisms of resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. **Acta pharmaceutica Sinica. B**, v. 5, n. 5, p. 390–401, 2015.

HUANG, X. et al. High throughput single cell RNA sequencing, bioinformatics analysis and applications. Em: Single Cell Biomedicine. Singapore: **Springer Singapore**, 2018. v. 1068p. 33–43.

IVANOV, R. A.; LASHIN, S. A. Intratumor heterogeneity: models of malignancy emergence and evolution. **Vavilovskii zhurnal genetiki i selektsii**, v. 27, n. 7, p. 815–819, 2023.

INCA - **Instituto Nacional de Câncer** (Brasil). Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil – Rio de Janeiro, 2022.

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

JOHNSON, C.; BURKHART, D. L.; HAIGIS, K. M. Classification of KRAS-activating mutations and the implications for therapeutic intervention. **Cancer discovery**, v. 12, n. 4, p. 913–923, 2022.

KIM, J. Y. et al. The significance of p-AKT1 as a prognostic marker and therapeutic target in patients with hormone receptor-positive and human epidermal growth factor receptor-2-positive early breast cancer. **Journal of breast cancer**, v. 25, n. 5, p. 387–403, 2022.

KOBAK, D.; BERENS, P. The art of using t-SNE for single-cell transcriptomics. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 5416, 2019.

KOREN, S.; BENTIREN-ALJ, M. Breast tumor heterogeneity: Source of fitness, hurdle for therapy. **Molecular cell**, v. 60, n. 4, p. 537–546, 2015.

LEARY, R. J. et al. Development of personalized tumor biomarkers using massively parallel sequencing. **Science translational medicine**, v. 2, n. 20, 2010.

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

LENZ, G. Heterogeneity generating capacity in tumorigenesis and cancer therapeutics. *Biochimica et biophysica acta*. **Molecular basis of disease**, v. 1870, n. 5, p. 167226, 2024.

LESK AM. **Introdução à bioinformática**. Porto Alegre: Artmed; 2008.

LIM, W.; MAYER, B.; PAWSON, T. Cell signaling. [s.l.] **Garland Science**, 2014.

LINDERMAN, G. C. Dimensionality reduction of single-cell RNA-seq data. Em: *Methods in Molecular Biology*. New York, **NY: Springer US**, 2021. v. 2284p. 331–342.

LU, H. et al. Mitogen-activated protein kinase (MAPK): New insights in breast cancer. **Journal of environmental pathology, toxicology and oncology: official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer**, v. 38, n. 1, p. 51–59, 2019.

MA, J.-H.; QIN, L.; LI, X. Role of STAT3 signaling pathway in breast cancer. **Cell communication and signaling: CCS**, v. 18, n. 1, p. 33, 2020.

MANORE, S. G. et al. IL-6/JAK/STAT3 signaling in breast cancer metastasis: Biology and treatment. **Frontiers in oncology**, v. 12, p. 866014, 2022.

MARONPOT, R. Mutations in the ras proto-oncogene: clues to etiology and molecular pathogenesis of mouse liver tumors. **Toxicology**, v. 101, n. 3, p. 125–156, 1995.

MARTIN-VEGA, A.; COBB, M. H. Navigating the ERK1/2 MAPK cascade. **Biomolecules**, v. 13, n. 10, p. 1555, 2023.

MAURI D, PAVLIDIS N, IOANNIDIS JP. Neoadjuvant versus adjuvant systemic treatment in breast cancer: a meta-analysis. **J Natl Cancer Inst**, 97(3):188-194, 2005.

MIEOG JS, VAN DER HAGE JA, VAN DE VELDE CJ. Preoperative chemotherapy for women with operable breast cancer. **Cochrane Database Syst Rev**. 2007;2007(2).

NAFFAR-ABU AMARA, S. et al. Transient commensal clonal interactions can drive tumor metastasis. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 5799, 2020.

NAVIN, N. et al. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. **Nature**, v. 472, n. 7341, p. 90–94, 2011.

NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) for Breast Cancer 2015. ©National Comprehensive Cancer Network.

PAL, B. et al. A single-cell RNA expression atlas of normal, preneoplastic and tumorigenic states in the human breast. **The EMBO journal**, v. 40, n. 11, 2021.

PDQ Adult Treatment Editorial Board, 2002–2016. **Breast Cancer Treatment (PDQ®): Health Professional Version**. PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US).

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747–752, 2000.

PICCART-GEBHART, M. J. et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. **The New England journal of medicine**, v. 353, n. 16, p. 1659–1672, 2005.

POPOVA, N. V.; JÜCKER, M. The role of mTOR signaling as a therapeutic target in cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 4, p. 1743, 2021.

QIN, J.-J. et al. STAT3 as a potential therapeutic target in triple negative breast cancer: a systematic review. **Journal of experimental & clinical cancer research: CR**, v. 38, n. 1, p. 195, 2019.

RASTOGI P, et al. Preoperative chemotherapy: updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocols B-18 and B-27 [published correction appears in J Clin Oncol. 2008 Jun 1;26(16):2793]. **J Clin Oncol**, 26(5):778-785, 2008.

RIGTER LS, et al. Neoadjuvant chemotherapy adaptation and serial MRI response monitoring in ER-positive HER2-negative breast cancer. **Br J Cancer**, 109(12):2965-2972, 2013.

SAATCI O, HUYNH-DAM KT, SAHIN O. Endocrine resistance in breast cancer: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. **J Mol Med (Berl)**, 99(12):1691-1710, 2021.

SANTEN, R. J. et al. The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase in breast cancer. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 80, n. 2, p. 239–256, 2002.

SÉGALINY, A. I. et al. Receptor tyrosine kinases: Characterisation, mechanism of action and therapeutic interests for bone cancers. **Journal of bone oncology**, v. 4, n. 1, p. 1–12, 2015.

SHAH, S. P. et al. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. **Nature**, v. 486, n. 7403, p. 395–399, 2012.

SLOVIN, S. et al. Single-cell RNA sequencing analysis: A step-by-step overview. Em: **Methods in Molecular Biology**, v. 2284p. 343–365, 2021.

SWANTON, C.; BURRELL, R. A.; FUTREAL, P. A. Breast cancer genome heterogeneity: a challenge to personalised medicine? **Breast cancer research: BCR**, v. 13, n. 1, 2011.

TEMPLETON, A. J. et al. Prognostic relevance of receptor tyrosine kinase expression in breast cancer: A meta-analysis. **Cancer treatment reviews**, v. 40, n. 9, p. 1048–1055, 2014.

TOKUNAGA, E. et al. Akt is frequently activated in HER2/neu-positive breast cancers and associated with poor prognosis among hormone-treated patients. **International journal of cancer**. Journal international du cancer, v. 118, n. 2, p. 284–289, 2006.

VERHOEVEN, Y. et al. The potential and controversy of targeting STAT family members in cancer. **Seminars in cancer biology**, v. 60, p. 41–56, 2020.

VON LINTIG, F. C. et al. Ras activation in human breast cancer. **Breast cancer research and treatment**, v. 62, n. 1, p. 51–62, 2000.

WATSON, C. J. Stat transcription factors in mammary gland development and tumorigenesis. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 6, n. 1, p. 115–127, 2001.

WEIN L, Loi S. Mechanisms of resistance of chemotherapy in early-stage triple negative breast cancer (TNBC). **Breast**, 34 Suppl 1:S27-S30, 2017.

YUAN, D. et al. Systematic expression analysis of ligand-receptor pairs reveals important cell-to-cell interactions inside glioma. **Cell communication and signaling: CCS**, v. 17, n. 1, 2019.

ZARDAVAS, D. et al. Clinical management of breast cancer heterogeneity. **Nature reviews. Clinical oncology**, v. 12, n. 7, p. 381–394, 2015.

ZENG, X. et al. Screening and predicted value of potential biomarkers for breast cancer using bioinformatics analysis. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, 2021.

ZHANG, X. Molecular classification of breast cancer: Relevance and challenges. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 147, n. 1, p. 46–51, 2023.